

Padronização de um teste ELISA indireto para diagnóstico da cinomose canina*

Standardization of an indirect ELISA test for canine diagnosis diagnosis

Bruno Passos Fernandes,** Robson Bahia Cerqueira***

Resumo

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus Canine Distemper Virus (CDV). Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal à óbito. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um teste ELISA indireto com antígeno de superfície para o diagnóstico da cinomose utilizando amostras de soro canino. Para padronização da técnica, fez-se necessário o estudo da diluição do antígeno para identificar a melhor concentração para sensibilização da placa. O teste foi aplicado primeiramente com diferentes diluições do antígeno para detecção do melhor desempenho do antígeno. Feito isso, foi testado em um banco de soro de 45 animais comprovadamente positivos no teste ELISA comercial e em soro de 45 animais comprovadamente negativos no teste ELISA comercial, posteriormente foi calculado o ponto de corte, especificidade e sensibilidade do teste. O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se ponto de corte de densidade óptica de 0,229, sensibilidade de 95,5% e especificidade de 84,4%.

Palavras-chaves: CDV, enfermidades infecciosas, imunodiagnóstico.

Abstract

distemper is a disease or the disease by the CDV virus, Distemper Virus. This disease mainly affects dogs, but also affects other domestic and wild species. The animal's immunity is related to the degree to which it will reach the individual's organism. It affects the animal's breathing, can cause vomiting, diarrhea, convulsions, and can lead to death. The aim of the present work test was to standardize an indirect ELISA for distemper diagnosis in experiments using a surface antigen. For the study of technical identification, it was necessary to specify the antigen for the best concentration of plaque sensitization. The test was initially applied with different dilutions of the antigen to detect the best performance of the antigen. This was tested in a serum bank of 45 animals proven positive in the commercial ELISA test and in the serum of 45 animals proven negative in the commercial ELISA test, later it was tested on the cut-off point, specificity and sensitivity of the test. The indirect ELISA test proved to be excellent as a diagnostic test for canine distemper, with an optical density cut-off of 0.229, sensitivity of 95.5% and specificity of 84.4% being obtained.

Keywords: CDV, infectious diseases, immunodiagnosis.

Introdução

A cinomose é uma enfermidade causada pelo vírus *Canine Distemper Virus (CDV)*. Essa doença afeta principalmente cães, mas também acomete outras espécies domésticas e selvagens. A imunidade do animal está relacionada ao grau que a esse patógeno vai atingir o organismo do indivíduo. Ela afeta a respiração do animal, pode causar vômito, diarreia, convulsões, podendo levar o animal a óbito. A transmissão do vírus da cinomose se dá através de aerossóis, alimentos, água e fômites contaminados, podendo ser eliminado durante meses no ambiente pelas urinas, fezes, saliva e secreções (Correa et al., 1991). Quanto ao sexo, os machos se mostraram menos predispostos à doença que as fêmeas, com respectivamente 42,16% e 57,84% dos animais doentes. Quanto à idade, os

animais jovens e adultos se mostraram mais predispostos que animais mais velhos, com respectivamente 57,83%, 28,65% e idosos com 13,52%. O CDV consegue se replicar em vários tipos de células, porém as células linfóides e os macrófagos se mostram, quando comparada às outras, mais susceptíveis. Quando o vírus infecta essas células, é disseminado para os órgãos linfóides como baço, timo, linfonodos e medula óssea, onde neste, infecta os linfócitos maduros e promove a apoptose e consequentemente diminuição da imunidade do animal (BARBOSA et al., 2011). O exame clínico é o primeiro a ser realizado, a anamnese, analisando os sinais clínicos e evolução da doença. A PCR é um teste cada vez mais em ascensão devido a sua alta sensibilidade e especificidade para inúmeras enfermidades, esse teste de diagnóstico detecta o RNA viral na amostra testada (Bento et al., 2013), e sua eficácia na fase

*Recebido em 9 de junho de 2022 e aceito em 13 de março de 2023.

**Graduando em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Autor para correspondência: brunofernandesnv@gmail.com.

***Professor Doutor na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

crônica da doença se mostra melhor. Na fase aguda, o exame de imunofluorescência se mostrou mais eficaz para diagnosticar a cinomose canina (Greene & Vandevelde, 2015). O teste ELISA indireto também é utilizado para detectar anticorpos do CDV em amostras de sangue, plasma ou líquido do animal. O mais utilizado para o diagnóstico desta enfermidade é o teste ELISA comercial. A falta de teste de diagnóstico rápido, de baixo custo, sensível e eficaz para essa enfermidade demanda pesquisas na produção de técnicas laboratoriais no sentido de desenvolver métodos mais eficientes e confiáveis para o diagnóstico da doença. O objetivo do presente trabalho foi padronizar um teste ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose em cães utilizando um antígeno de superfície.

Materiais e métodos

Características do antígeno, diluições e determinação do protocolo ELISA indireto

O antígeno faz parte do acervo de antígenos do laboratório de doenças infecciosas do hospital universitário de medicina veterinária da UFRB. O isolado Snyder Hill (ATCC VR-526 – Manassas, EUA) do vírus da cinomose foi utilizado como antígeno para testes imunodiagnósticos. O vírus foi propagado em células MDCK na 255ª passagem e mantido em Meio Essencial Mínimo (Cultilab), suplementado com 0,2g/L de estreptomicina, 0,15g/L de penicilina G potássica e 10% SFB, em pH 7,2. A 3ª passagem do vírus nestas células foi alicotada e armazenada em temperatura -18°C. A caracterização desse antígeno foi considerada como proteínas de superfície.

Diluição do antígeno e determinação do protocolo ELISA indireto

Para determinar a concentração de antígeno a ser utilizado no teste ELISA indireto para diagnóstico da cinomose em cães, foi sensibilizada uma placa de poliestileno com 96 poços (KASVI), utilizando tampão carbonato-bicarbonato e diferentes diluições do antígeno, sendo na coluna 1 e 2, 1:50, na coluna 3 e 4, 1:100, na coluna 5 e 6, 1:200, na coluna 7 e 8, 1:400, na coluna 9 e 10, 1:800, e na coluna 11 e 12, 1:1600, conforme a **Figura 1**.

Figura 1: Mapa com a diagramação das diluições e padronizações quantitativas por poço da utilização do antígeno do teste ELISA indireto no diagnóstico da cinomose canina.

TITULAÇÃO DO ANTÍGENO

DILUIÇÃO EM:

	1:50		1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Branco 50µl	Branco 100µl										
B	Branco 50µl	Branco 100µl										
C	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
D	Negat. 50µl	Negat. 100µl										
E	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
F	Posit. 50µl	Posit. 100µl										
G	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										
H	Soro Teste 50µl	Soro Teste 100µl										

A placa foi deixada na geladeira overnight, por 18 horas em uma câmara úmida. Posteriormente foi lavada duas vezes com PBS-T20, foi realizado o bloqueio da placa, com leite desnatado em pó (molico) diluído em PBS-T20 à 7% e deixada na estufa à 37°C por duas horas. Após esse tempo, a placa foi lavada novamente duas vezes, posteriormente foi distribuído na placa em duplicatas o branco (meio de diluição do soros - fileira A e B), soro comprovadamente negativo (fileiras C e D), soro comprovadamente positivo (fileiras E e F) e soro teste (fileiras G e H). A placa foi deixada na estufa à 37°C por uma hora, foi lavada com PBS-T20 cinco vezes, foi distribuído 50 microlitros para colunas ímpares e 100 microlitros para colunas pares do conjugado (imunoglobulina de coelho anti-IgG [molécula inteira - H+L] de cão marcado com peroxidase - Sigma) por poço. A placa foi deixada na estufa à 37°C por uma hora e meia. E retirada, lavada por cinco vezes com PBS-T20. Foi adicionada a Solução reveladora (10 ML Ácido cítrico + 60 microlitros H2O2 (30 volume) + 60mg de OPD). A reação foi freada com ácido sulfúrico (H2SO4) e lida no espectrofotômetro com filtro de 492 nm.

Amostras submetidas à padronização

O respectivo teste foi aplicado em 90 amostras de soro canino, sendo 45 mostras de animais comprovadamente negativos e 45 amostras de animais comprovadamente positivos. Essas amostras fazem parte de um banco de soro armazenado no laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Foram utilizadas amostras de animais clinicamente positivos e animais clinicamente negativos submetidos a exames laboratoriais e sorologia de kit comercial para pesquisa de anticorpo chamado de Accuвет CDV/CPV Ac Test. Esse kit apresenta desempenho de sensibilidade e especificidade de 99,10% e 98% respectivamente.

Estudo do Ponto de corte, sensibilidade e especificidade

O ponto de corte foi determinado através do cálculo da média de animais não reagentes acrescido de três vezes o desvio padrão populacional (Média aritmética de não reagentes + 3 • Desvio padrão populacional) baseada em Frey, A.; DI Canzio, J.; Zurakowski, D, (1998). Para o estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia foram calculados com as fórmulas preconizadas por Soares et. al., (2012), **Tabela 1**.

Tabela 1: Representação do cálculo da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia.

Condição do paciente	Doentes	Não-doentes	Total
Resultado do teste			
Positivo	a	b	a+b
Negativo	c	d	c+d
Total	a+c	b+d	a+b+c+d (N)

Fórmulas: Sensibilidade: $a/(a+c) \times 100$

Especificidade: $d/(b+d) \times 100$

Determinação do gradiente de coloração

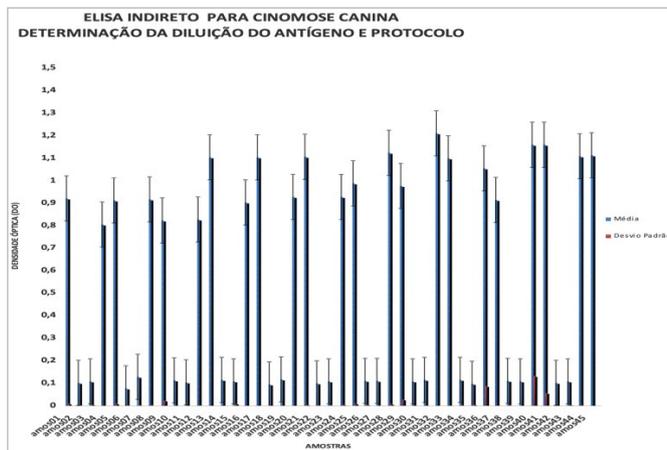
Com a finalidade de diminuir o custo e facilitar a leitura para as localidades na qual não tenha um leitor de microplacas, foi criada um gradiente de cor com a placa freada com H₂SO₄ e com a placa sem frear. Para determinação do gradiente de cor foram avaliadas as densidades ópticas das amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas, na qual se calculou a média de densidade óptica e variação no tom da cor.

Resultados

Com relação a diluição do antígeno

Os resultados obtidos no estudo da diluição do antígeno foram satisfatórios para todas as diluições com destaque e definição para as diluições do antígeno em 1:800 e 1:1600 e 100 microlitros das respectivas diluições distribuído por poço. Na titulação do antígeno por não haver diferença significativa entre as diluições, o critério de escolha obedeceu à utilização da menor quantidade de antígeno por teste realizado. A diluição escolhida a de 1600 para diluição do antígeno e 100 microlitro por poço da referida diluição conforme se observa na **Figura 2**.

Figura 2: Resultados da titulação do antígeno utilizado para padronização do ELISA indireto para o diagnóstico da cinomose canina. Nessa etapa foi determinado também diluição do conjugado e diluição da amostra teste, sendo o conjugado 1:15000 e soro teste 1:200.



Com relação as amostras positivas e negativas para estudo do ponto de corte, sensibilidade e especificidade.

Para validação do teste foram calculados os valores do ponto de corte, sensibilidade e especificidade. O ponto de corte determinado com a variação da densidade óptica das amostras comprovadamente negativas foi o valor de 0,229. Com relação a sensibilidade e especificidade obteve-se resultados de 95,6% e 84,4% respectivamente, fórmula abaixo:

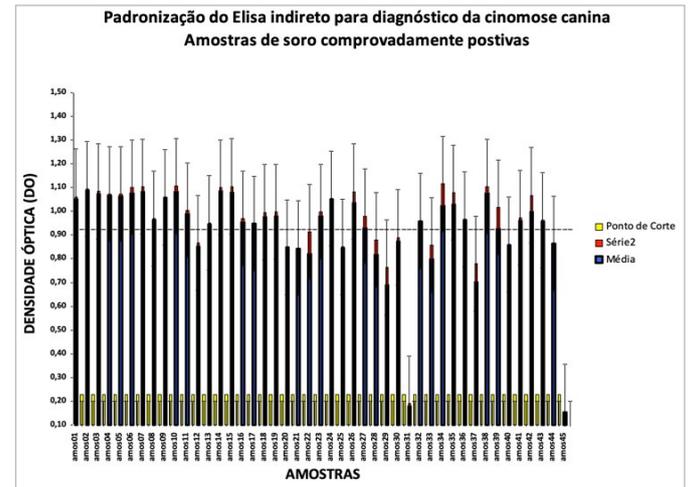
$$\text{Sensibilidade: } a/(a+c) = 43/(43+2) \times 100 = 95,6\%$$

$$\text{Especificidade: } d/b+d = 38/(7+38) \times 100 = 84,4\%$$

As amostras comprovadamente positivas tiveram valores de densidade óptica oscilando acima do ponto de corte como

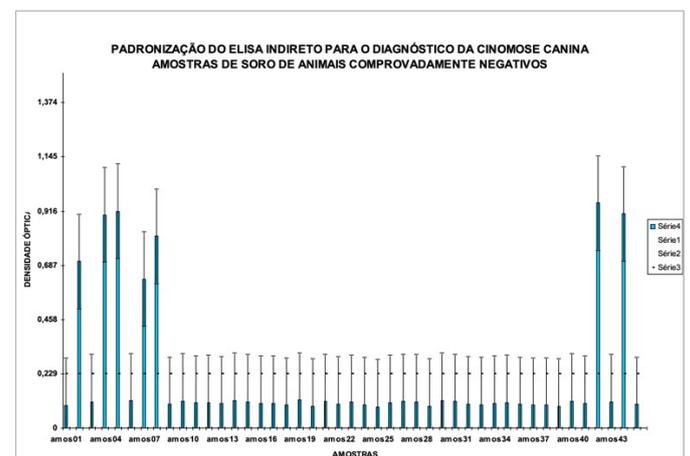
0,688 e 1,077. Considerando o ponto de corte de 0,229 das 45 amostras comprovadamente positiva, duas apresentaram valores de densidade óptica abaixo do ponto de corte, oscilando entre 0,168 e 0,153, **Figura 3**.

Figura 3: Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados como positivos para cinomose canina clínica e sorologicamente utilizando um teste ELISA comercial.



Na placa na qual foram testados 45 soros dos animais diagnosticados negativos, obtive-se sete amostras com densidade óptica oscilando entre 0,629, e 0,950, considerados falso-positivos. As demais amostras comprovadamente negativas apresentaram densidade óptica oscilando entre 0,063 e 0,116, valores abaixo do ponto de corte, **Figura 4**.

Figura 4: Resultados do teste ELISA indireto aplicado em amostras de cães diagnosticados clínica e sorologicamente negativos para cinomose canina.



Com relação a determinação dos gradientes de cor para leitura dos resultados sem utilização do leitor de microplacas para leitura sem frear com H₂SO₄, foram obtidos três tons de cores para cada padrão de densidade óptica com amostras comprovadamente negativas e placas comprovadamente positivas, conforme **Figuras 5 e 6**.

Figura 5: Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H₂SO₄.

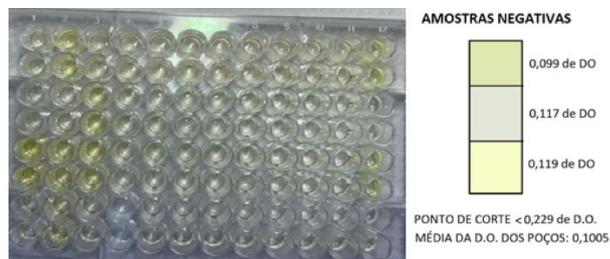
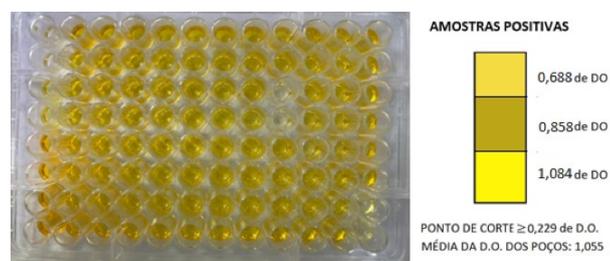


Figura 6: Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto sem frear com H₂SO₄.



Observa-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,099 e 0,119, correspondendo a margem de possibilidades de animais negativos. Verifica-se também que os valores que oscilam em 0,120 e 0,228 correspondem a valores muito próximos do ponto de corte o que representa valores intermediários, provavelmente por se tratar de amostras que estejam próximas a positividade, mas que ainda não sejam totalmente positivas.

Com relação às amostras comprovadamente positivas identifica-se que a densidade óptica apresentaram valores que oscilaram com os tons de coloração entre 0,229 e 1,055, correspondendo a margem de possibilidades de animais positivos.

Na avaliação do gradiente de cor de amostras comprovadamente negativas e amostras comprovadamente positivas com a placa freada com H₂SO₄, obteve-se os mesmos resultados de densidades ópticas constatados na leitura da placa sem frear, destacando a alteração nos tons dos valores identificados nas placas, **Figuras 7 e 8**.

Figura 7: Amostras de soro canino de animais comprovadamente negativos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H₂SO₄.

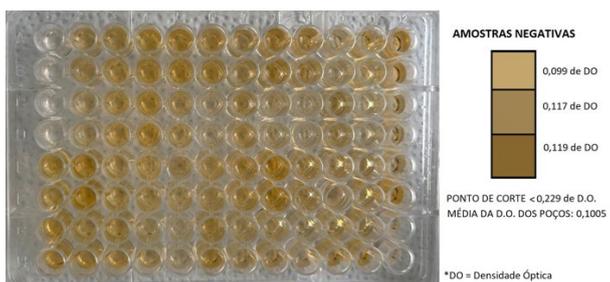
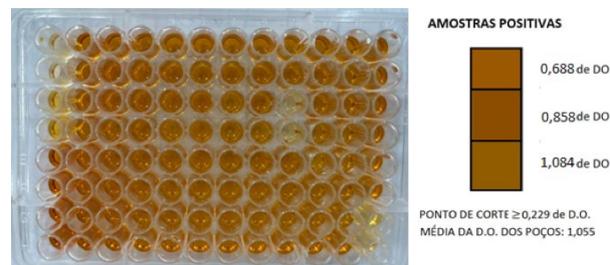


Figura 8: Amostras de soro canino de animais comprovadamente positivos para cinomose canina. Amostras submetidas ao ELISA indireto com freamento com H₂SO₄.



Discussão

O teste estudado obteve 95,5% de sensibilidade e 84,4% de especificidade, o que é ideal para diagnosticar animais de fato positivos e pode-se ter um controle maior quanto aos animais negativos, sendo depois de testados no ELISA indireto, os animais testados devem ser avaliados clinicamente e através de exames bioquímicos para melhor constatação da doença. Em sua pesquisa, Magda Regina (1998), utilizou um antígeno semipurificado, para a padronização de um ELISA indireto apresentou e 61,76% de sensibilidade e 83% de especificidade, resultados estes bons para detectar animais negativos, porém não confiáveis para detectar animais positivos, sua especificidade se aproximou dos resultados da pesquisa aqui apresentada, porém quanto à sensibilidade, o resultado se mostrou inferior ao mesmo. Uma vez que a sensibilidade demonstra a capacidade do teste de diagnosticar animais realmente infectados, é de extrema importância o teste apresentar alta sensibilidade, para que os animais diagnosticados com positividade sejam tratados o mais rapidamente e que o teste não apresente grande quantidade de animais falso-negativos, sendo estes, animais infectados, porém negativos ao teste realizado. Noon et. al., em 1980, realizou um teste ELISA indireto para detecção da cinomose utilizando o antígeno sobrenadante e obteve 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade, sendo assim um resultado excelente para este teste para esta enfermidade, sendo sua sensibilidade apresentando valor semelhante ao encontrado nesta pesquisa, e especificidade ainda maior. A especificidade denota a capacidade do teste de diagnosticar animais negativos, é importante que a especificidade do teste seja alta para filtrar os animais negativos e tratar os animais diagnosticados como positivo, além de ser importante para que o teste apresente pouca quantidade de animais considerados “falso-positivos”, sendo estes, animais não infectados, porém positivos ao teste realizado. Braz (2009) em sua pesquisa, realizou um teste ELISA direto, teste este, que após a aplicar o antígeno na placa, o anticorpo é ligado a uma enzima como HRP e biotina para revelação do teste, possuindo menos etapas que o teste ELISA indireto, porém resultados semelhantes ao apresentado pelo presente trabalho quanto a sensibilidade, quanto à especificidade, o ELISA direto apresentou melhor resultado que o ELISA indireto apresentado neste trabalho, em seu teste foram utilizadas amostras do epitélio nasal, conjuntiva e impressão da mucosa genital de 40 cães, e obteve sensibilidade de 93,8% e especificidade de 100% no teste. Apesar de serem testes semelhantes, o ELISA direto possui como objetivo detectar estruturas antigênicas do microrganismo, enquanto o ELISA

indireto, detecta o anticorpo, por este motivo o ELISA direto demonstra melhores resultados e maior confiabilidade, apesar disso, os resultados do ELISA indireto aqui apresentado, não deixa a desejar quanto ao desempenho de sensibilidade e especificidade.

Conclusão

O teste ELISA indireto se mostrou com excelência como um teste de diagnóstico para a cinomose canina, obtendo-se um

bom desempenho com relação à sensibilidade e especificidade, com isso, o teste consegue diagnosticar com segurança animais infectados e não infectados. O mesmo consegue discriminar animais realmente infectados, possibilitando um tratamento da enfermidade de maneira mais assertiva. Com relação à padronização da leitura com o gradiente de cor criado, o teste demonstrou capacidade de diferenciar amostras de animais clinicamente positivos e de animais clinicamente negativos atendendo aos laboratórios que não apresentam o leitor de microplaca.

Referências

BARBOSA, Tatiana de Sousa et al. Avaliação laboratorial da cinomose canina: estudo retrospectivo de 25 casos no município de Araçatuba-SP. Revista de Ciências Agroveterinárias, p. 113-118, 2011.

Bento, M. S., Chamelete, M. O. & Dantas, W. F. M. (2013). Diagnóstico clínico e histopatológico de neoplasmas cutâneos em cães e gatos atendidos na rotina clínica do hospital veterinário da Univiçosa. ANAIS SIMPAC, 5.

BRAZ, Gissandra Farias. Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina. 2009.

CORRÊA, W. M & CORRÊA, C.N.M. Cinomose. Enfermidades dos animais domésticos. Invarella. São Paulo, 1991.

FREITAS-FILHO, Edismauro et al. Prevalência, fatores de risco e associações laboratoriais para Cinomose canina em Jatai-GO. Enciclopédia Biosfera, v. 10, n. 18, 2014.

FREY, Andreas; DI CANZIO, James; ZURAKOWSKI, David. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. Journal of immunological methods, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.

GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Cinomose. Doenças infecciosas em cães e gatos. Guanabara Koogan, 2015.

NOON. K. F. et. al., Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. Am. J. Vet. Res. v. 41, n 4, p. 605-609, 1980.

REGINA, Magda. Produção de antígenos virais para detecção de anticorpos contra o vírus da cinomose canina. 1998.

Soares A. N., Brandão E. C., Cunha G. F., Scherrer L. R., Precivale M., Strassmann P. G., Assis S. R. L. (2012) - MANUAL DE CONDUTAS SBOC - Direitos reservados sboc - Capítulo 5 – Artigos sobre Testes Diagnósticos.