

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL ANTE MORTEN DE CINOMOSE CANINA

Giovana Hashimoto Nakadomari (PIC/Uem), Ana Claudia Lemes Pavan, Vanessa Kelly Capoa Vignoto, Sheila Rezler Wosiacki (Orientador),
e-mail: wosiacki@yahoo.com.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias/Umuarama, PR.

Área Medicina Veterinária, subárea Medicina Veterinária Preventiva.

Palavras-chave: CDV, RT-PCR, sensibilidade.

Resumo:

Para detecção do vírus da cinomose canina (CDV), a RT-PCR (Transcriptase reversa- Reação em cadeia da polimerase) é uma técnica com alta sensibilidade, mas os resultados variam com o tipo de amostra, método de extração do RNA e da escolha dos iniciadores. Mesmo assim, apresenta a vantagem de se obter um diagnóstico rápido e precoce com pequenas quantidades do vírus no início de uma infecção. O objetivo deste projeto foi padronizar a técnica de RT-PCR, assim como identificar casos positivos de cinomose canina de amostras clínicas provenientes do Hospital Veterinário da UEM (HV-UEM). Amostras de vacinas comerciais foram utilizadas como controle positivo para a padronização da técnica e amostras de urina de animais com suspeita clínica de cinomose canina encaminhadas pelo HV-UEM foram utilizadas para o diagnóstico laboratorial da infecção. Foram realizados 13 exames de RT-PCR, sendo 3 amostras positivas (23%) e 10 amostras negativas (77%) para o CDV.

Introdução

O vírus da cinomose canina (CDV) é um *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*, composto de RNA de fita simples com polaridade negativa e é envolto por um envelope constituído basicamente de lipoproteínas, pertencente à membrana da célula hospedeira que é facilmente destruído por solventes. É uma doença de distribuição mundial, e acomete principalmente carnívoros, sendo a doença infecciosa com maior taxa de mortalidade em cães. É altamente contagiosa, com sinais respiratórios, gastrointestinais e no sistema nervoso central, que podem ocorrer durante a fase aguda ou semanas e até meses depois. No sistema respiratório pode ocorrer tosse e pneumonia; vômito, diarreia, gastrite e enterite são sinais que podem ocorrer no trato gastrointestinal; na pele pode haver o aparecimento de vesículas e pústulas; e os sinais neurológicos incluem convulsão, andar

em círculos e contratilidade muscular. O principal meio de transmissão são os aerossóis de secreção respiratória, porém em infecções agudas os animais contêm o vírus em todas as suas excreções. Pode acometer animais de todas as idades, porém em filhotes sem anticorpos maternos e não vacinados são mais susceptíveis (APPEL e SUMMERS, 1995). Para detecção do CDV, a RT-PCR (Transcriptase reversa- Reação em cadeia da polimerase) possui as vantagens de ser uma técnica rápida para se obter o resultado, não necessita da infecciosidade da partícula viral, possui alta sensibilidade e especificidade, porém os resultados variam de acordo com o tipo da amostra, método de extração de RNA e escolha dos iniciadores. (FRISK et al., 1999). Assim, o objetivo deste projeto foi padronizar a técnica de RT-PCR, bem como identificar os casos positivos de cinomose canina de amostras clínicas do Hospital Veterinário da UEM.

Materiais e métodos

Para a padronização da técnica, a extração de RNA viral foi realizada a partir de uma alíquota de 200 µL de urina utilizando-se sílica e tiocianato de guanidina e a técnica de RT-PCR foi realizada segundo Gebara et al., (2004) utilizando primers descritos por Frisk et al., (1999). Para o controle positivo da padronização foi utilizada amostras de vacinas comerciais. Para os animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá com suspeita clínica de cinomose canina foram utilizadas amostras de urina para diagnóstico laboratorial da infecção. Os produtos amplificados da RT-PCR de 287 pares de bases (pb) foram visualizados sob luz ultravioleta por eletroforese em gel de agarose. Os resultados foram analisados pela frequência total e relativa.

Resultados e Discussão

Durante o período de abrangência do projeto, foi realizada a padronização da técnica de RT-PCR para o vírus da cinomose canina e realização de exames com amostras clínicas de animais encaminhadas do Hospital Veterinário com suspeita da doença. Sabe-se que a sensibilidade da técnica varia com os iniciadores usados, os métodos de extração de RNA e as amostras clínicas. O conjunto de iniciadores (primers) usados na padronização da RT-PCR foi utilizado com sucesso por outros pesquisadores com alta especificidade e sensibilidade (FRISK et al., 1999; AMUDE, et al., 2006). Foram realizados 13 exames, sendo 6 amostras de sangue e 7 amostras de urina. Destas, 3 amostras foram positivas à técnica de RT-PCR, correspondendo a 23%, sendo todas amostras de urina, e 10 amostras (77%) foram negativas para o CDV (Gráfico 1). No projeto foram inclusos animais com suspeita clínica de cinomose, muitos casos poderiam não ser cinomose, além das diversas apresentações clínicas e evolução da doença, o vírus pode não estar presente em todas as secreções e excreções, órgãos e tecidos uniformemente, podendo ocorrer resultados

falso-negativos (FRISK et al., 1999), o que justifica a taxa de 23% de animais positivos na RT-PCR. Gebara et al. (2004) utilizou como amostra biológica a urina para cães com sinais sugestivos da doença, o que ratifica que o tipo de amostra escolhida pode interferir no diagnóstico correto e reforça a importância da escolha para aumentar a sensibilidade.

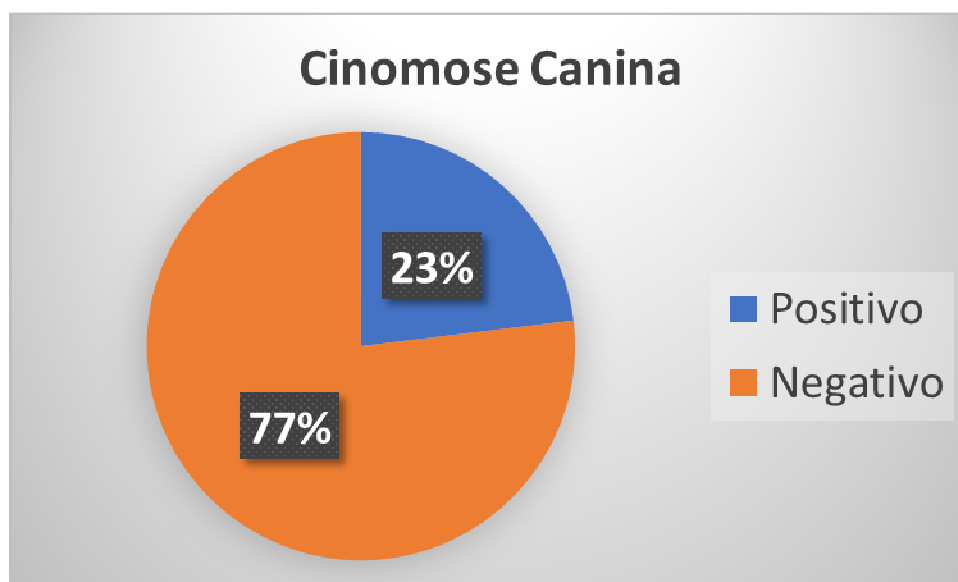


Gráfico 1: Percentual de exames realizados para cinomose canina dos animais com suspeita da doença.

Conclusões

A realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina é fundamental para a execução do tratamento, avaliação do prognóstico e planejamento de medidas de controle e profilaxia da doença. A RT-PCR é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, porém o tipo de amostra clínica submetida à análise pode interferir no resultado do diagnóstico.

Referências

- AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. *Ante mortem* Diagnosis of CDV Infection by RT-PCR in Distemper Dogs with Neurological Deficits without the Typical Clinical Presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 679-687, 2006.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-191, 1995.

FRISK, A. L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGÄRTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3634-3643, 1999.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 480-487, 2004.