

Quantificação do vírus da cinomose canina por técnica de amplificação molecular em tempo real

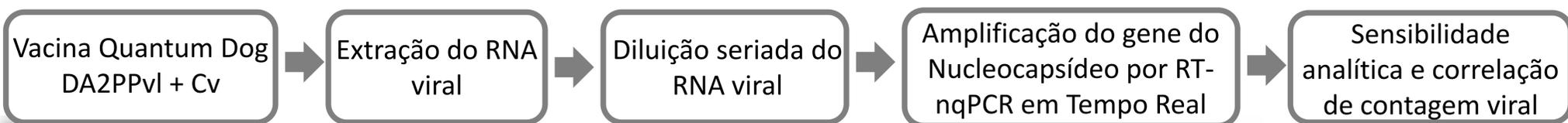
Makiejczuk, A.¹ e Lunge, V.R.^{2,3}

¹ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária ULBRA ² PPG Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde ULBRA

³ Docente ULBRA

A cinomose canina tem como agente etiológico o vírus da cinomose canina (CDV, do inglês *Canine Distemper Virus*), classificado no gênero *Morbilivirus*, família *Paramixoviridae*. O vírus possui uma fita simples de RNA (senso negativo) como material genético e que codifica seis proteínas estruturais: proteína de fusão, hemaglutinina, matriz, fosfoproteína, nucleocapsídeo e proteína "L". Os animais infectados apresentam sinais clínicos multissistêmicos (gastrointestinais, respiratórios, dermatológicos e neurológicos) com elevado índice de progressão para mortalidade. Apesar dos protocolos de vacinação, existem diversos relatos de casos de cinomose em cães vacinados. O diagnóstico é presuntivo e estabelecido após anamnese e exame do animal, pois seus sinais clínicos são comuns a outras doenças respiratórias e entéricas. Atualmente testes laboratoriais (imunológicos e moleculares) tem sido empregados para detecção específica do vírus, auxiliando no diagnóstico clínico. No entanto metodologias para quantificação viral ainda não estão disponíveis, não sendo aplicadas na rotina de análise. Técnicas de cultivo viral são eventualmente utilizadas em situações específicas, como por exemplo a titulação de vacinas comerciais. O presente trabalho teve como objetivo principal validar um procedimento de "nested" PCR em tempo real, previamente desenvolvido para detecção viral (Fischer et al., 2013), para a determinação quantitativa do CDV em amostras clínicas (sangue, urina, fezes, etc.) e vacinas comerciais.

Materiais e métodos



Resultados

- Os resultados preliminares demonstraram uma boa relação entre a quantidade de RNA e a leitura do PCR em tempo real (Figura 1).
- A curva padrão mostrou linearidade no intervalo de quantificação de 500 a 4,0 TCID₅₀/mL (declive = -4.74 - mínimo -4.65 e máximo -4.90) com um coeficiente de regressão linear (R²) igual 0.94 (mínimo 0.92 e máximo 0.96) (Tabela 1).
- O ensaio de sensibilidade analítica (análise de replicatas de amostras diluídas seriadamente com 500 até 0,06 TCID₅₀/mL) demonstrou a possibilidade de detectar todas as replicatas com 4,0 TCID₅₀/mL e 90,9% das replicatas com 0,8 TCID₅₀/mL, demonstrando uma sensibilidade de 1,0 TCID₅₀/mL em intervalo de confiança de 95% (Tabela 1.).

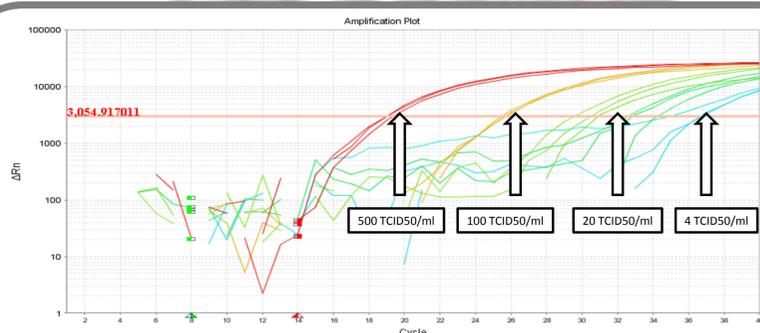


Figura 1: Resultado de PCR em Tempo Real demonstrando a linearidade das replicatas.

TCID ₅₀ /ml	Corrida 1			Corrida 2			Corrida 3			Corrida 4			Média	DP
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12		
500	18,9	19,3	18,9	22,5	22,5	22,6	22,6	23,5	23,2	24,8	23,0	24,9	22,2	2,1
100	25,4	25,6	25,6	27,4	28,9	27,0	26,8	28,9	28,7	30,4	28,8	27,7	27,6	1,6
20	29,5	30,4	30,9	26,0	31,7	30,1	31,7	31,7	32,1	33,3	31,9	31,8	30,9	1,9
4	32,5	34,2	32,9	34,7	35,4	32,2	33,9	34,5	34,0	34,6	35,1	36,9	34,2	1,3
0,8	34,9	36,6	36,7	37,4	35,0	36,1	35,6	38,4	37,6	35,4	38,0	-	36,5	1,2
0,16	37,3	-	-	39,4	39,6	39,1	38,9	-	-	39,5	-	-	39,0	14,7
0,032	-	-	-	-	-	-	39,0	-	-	-	-	-	39,0	27,6
0,0064	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 1: Análise de sensibilidade analítica

Conclusão e Perspectivas

Os resultados obtidos demonstram a implementação de técnica de quantificação viral com alta sensibilidade analítica. Novos estudos estão sendo realizados para otimizar a quantificação de CDV em diferentes amostras clínicas e avaliar vacinas disponíveis no mercado.

Referências

- Fischer CD, Ikuta N, Canal CW, Makiejczuk A, Allgayer MD, Cardoso CH, Lehmann FK, Fonseca AS, Lunge VR. Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. *J Virol Methods*. 2013 Aug 11;194(1-2):39-45.
- Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2006 Sep;136(1-2):171-6