Rosana Alcalde

**CINOMOSE CANINA: DETECÇÃO DO RNA VIRAL
PELA REACÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE
(RT-PCR) EM CÃES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO
DA DOENÇA**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).**

**São Paulo
1999**

Candidato(a):

Rosana Alcalde.

Título da Dissertação:

Cinomose canina : detecção de RNA viral pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) em cães com diagnóstico clínico da doença.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a 08/12/99, considerou o(a) candidato(a):

(☒) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

1) Examinador(a)

2) Examinador(a)

3) Presidente

Rosana Alcalde

**CINOMOSE CANINA: DETECÇÃO DO RNA VIRAL
PELA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE
(RT-PCR) EM CÃES COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO
DA DOENÇA**

**Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências (Microbiologia).**

**Área de concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon**

São Paulo

1999

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Alcalde, Rosana.

T-ICB Cinomose canina : detecção de RNA viral pela reação em cadeia pela
BMM polimerase (RT-PCR) em cães com diagnóstico clínico da doença / Rosana
A346C Alcalde. -- São Paulo, 1999.
1999

Dissertação(Mestrado)—Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo. Departamento de Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Linha de pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Orientador: Durigon, Edison Luiz.

Versão do título para o inglês: Canine distemper virus : detection of viral RNA
by RT-PCR in dogs with clinical diagnosis.

Descritores: 1. Cinomose canina 2. Vírus da cinomose canina 3. Reação em
cadeia pela polimerase (RT-PCR) 4. Diagnóstico molecular 5. Excreção
viral 6. Vias de eliminação viral

ICB/SBIB/128/99

***“Chegará o dia em que o homem
conhecerá o íntimo de um
animal. E neste dia todo crime
contra um animal, será um crime
contra a humanidade.”***

(Leonardo Da Vinci)

*Aos meus pais, Catharina Gaeta
Alcalde e Juan Marcos Alcalde Rivas,
exemplos de vida e coragem, pelo
incentivo, apoio e constante presença
nos melhores momentos da minha vida
e pela minha formação pessoal.*

*Aos meus irmãos, João Marcos Alcalde
e Rita de Cassia Aparecida Alcalde,
pela amizade e ajuda no decorrer deste
trabalho.*

*A Deus, pela constante presença em
todos os momentos de nossas vidas,
sem Ele nós não estaríamos aqui.*

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, pelo apoio, incentivo e confiança em mim depositados, no início deste trabalho, oportunidade e credibilidade no ser humano, paciência, integridade e por suportar minha insegurança e meu medo no desenvolvimento desta pesquisa, minha admiração e gratidão, pois sem essa chance eu não estaria aqui, escrevendo esta dedicatória.

“Somos maiores do que nossos medos e fracassos.”

Muito Obrigada.

A todos os cães e seus respectivos proprietários, que participaram deste trabalho, meu eterno agradecimento, pois sem esses não seria possível a realização do mesmo.

Agradecimentos

- *À Profa. Dra. Mitika Kuribayashi Hagiwara por sua dedicação, correção e sugestões tão importantes feitas na qualificação e no término desse trabalho.*
- *À Profa. Dra. Marcia Mery Kogika por “abrir as portas” do Hospital Veterinário e pela total confiança em nós depositadas, por suas sugestões tão valiosas e importantes.*
- *Às Dras. Vera A. Batistini Fortunato e Bruna Maria P. Coelho pela colheita das amostras clínicas e responsáveis pela avaliação clínica dos animais, sem a participação destas, este estudo seria inviável.*
- *Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain e Prof. Dr. Hélio José Montassier, pelas sugestões importantes feitas na qualificação desse trabalho.*
- *À minha colega Patricia Beltrão, por me apresentar ao meu orientador e pelos incentivos tão essenciais em minha carreira profissional.*
- *Ao meu amigo Luiz Carlos Vieira, pela ajuda, incentivo e dicas tão prestativas, pela amizade e apoio constantes em todos os momentos desse trabalho, minha eterna gratidão.*
- *Aos meus amigos Gilvan V. Santos, Alexandre Douglas Crispin, pela ajuda em informática, amizade e apoio constantes, Adélia Hiroko N. Kawamoto e Marina Favrin (pelas traduções de trabalhos escritos em francês), pelo incentivo e carona nas horas árduas, pela amizade e apoio constantes.*

- *Ao meu grande amigo Oscar Gois Lima Junior pela amizade e companheirismo na época de Faculdade e pela indicação no trabalho quando eu mais precisei.*
- *À memória de meus tios João Gaeta e Rosa Maria Gaeta, pelos incentivos em minha carreira profissional e ajuda em horas árduas.*
- *À minha amiga Damiana Vieira Silva pela grande ajuda no momento que mais precisei, por sua amizade e dedicação.*
- *A todos os funcionários e bibliotecárias do ICB-USP, pela eficiência e gentileza constantes.*
- *Aos Profs. do Laboratório de Virologia do Departamento de Microbiologia do ICB-USP: Prof. Dr. Armando de Moraes Ventura, Profa. Dra. Maria Lucia Rácz e Profa. Dra. Dolores Úrsula Mehnert, por cederem prontamente materiais e equipamentos de seus laboratórios.*
- *Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, Sra. Antonia A. Rodrigues, Sra. Elaine F. Santos, Carlos Augusto Silva e José Maria Lopes, pelo suporte técnico (preparo dos materiais e vidrarias) necessários durante esse trabalho.*
- *Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Virologia: Maria Isabel de Oliveira, Pedro Carnielli Junior, Aufra C. A. de Araújo, Luiz Fernando Zerbini, Lourdes R. Vaz de Lima, Viviane F. Botosso e César Dínola.*
- *Às funcionárias da secretaria de Pós-Graduação, em especial à Ana Maria França Amaral, pela grande ajuda em horas difíceis.*
- *À minha amiga Nancy Yuri K. de Amo, pela paciência e apoio em minhas inseguranças.*

- *Ao acessor da FAPESP, por suas correções, sugestões e críticas construtivas tão indispensáveis no decorrer de todo esse trabalho.*
- *À FAPESP pelo suporte financeiro, que tornou possível a realização deste trabalho.*

Índice

Lista de Abreviaturas

Resumo

1- Introdução Geral.....	01
1.1- Agente etiológico.....	04
1.2- Características do vírus da cinomose canina.....	05
1.2.1- Replicação	08
1.2.2-Variação antigênica.....	09
1.3- Epidemiologia.....	12
1.4- Patogenia.....	13
1.4.1- Infecção sistêmica.....	14
1.4.2- Infecção do SNC.....	15
1.4.3- Manifestações clínicas	
1.4.3.1- Sintomas sistêmicos.....	16
1.4.3.2- Sintomas neurológicos.....	17
1.5-- Aspectos Imunológicos.....	18
1.6- Imunoprofilaxia.....	20
1.7- Diagnóstico laboratorial.....	23
1.7.1- Diagnóstico direto	24
1.7.2- Diagnóstico indireto.....	26
1.7.3- Diagnóstico Molecular.....	28
2- Objetivos.....	30
3- Materiais e Métodos	
3.1- Amostras clínicas.....	31

3.2- Processamento das amostras para PCR	
3.2.1- Sangue venoso total, para obtenção de soro.....	32
3.2.2- Linfócitos.....	32
3.2.3- Urina.....	33
3.2.4- Saliva.....	33
3.2.5- Preparo das amostras para PCR.....	34
3.3- Reação de PCR	
3.3.1- Extração.....	34
3.3.2- "Primers".....	35
3.3.3- cDNA.....	36
3.3.4- Amplificação do cDNA (PCR).....	36
3.3.5- Nested-PCR.....	36
3.3.6- Visualização dos produtos amplificados.....	37
4- Resultados.....	38
4.1- Detecção do RNA viral em amostras clínicas.....	41
5- Discussão.....	45
6- Conclusões.....	50
7- Referências Bibliográficas.....	51

Abstract

Anexos

Abreviaturas	Descrição
VCC	Vírus da cinomose canina
SNC	Sistema Nervoso Central
EUA	Estados Unidos da América
PEM	Poliencefalomielopatia aguda
LEM	Leucoencefalomielopatia crônica
RNA	ácido ribonucleico
N	nucleoproteína (proteína viral)
P	fosfoproteína (“ ”)
M	membrana (“ ”)
F	fusão (“ ”)
H	hemaglutinina (“ ”)
L	grande proteína (“ ”)
S	proteína não estrutural
RT-PCR	Transcrição Reversa-Reação em cadeia pela polimerase
nm	nanômetro
Kb	kilobase
NDV	Vírus de Newcastle
VSV	Vírus da estomatite vesicular
VCF	Vírus da cinomose de foca
VPB	Vírus da peste bovina
VS	Vírus do sarampo
B95	Linhagem celular de linfócito B de sagüi
ELISA	“Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
PCR	Reação em cadeia pela polimerase

Abreviaturas	Descrição
DNA	ácido desoxirribonucleico
VCC-SH	cepa do vírus da cinomose canina “Snyder Hill”
VCC-RO	cepa do vírus da cinomose canina “Rockborn”
Hovet	Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo
mL	mililitro
uL	microlitro
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
SFB	Soro fetal bovino
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
mg	miligrama

Resumo

O vírus da cinomose canina (VCC) é um patógeno viral, altamente, contagioso que pode causar doença sistêmica letal, em cães e outros carnívoros em toda parte do mundo. Os cães afetados podem apresentar sintomas gastrentéricos, respiratórios e nervosos. As manifestações clínicas da doença incluem depressão, diarreia, vômito, desidratação, hiperqueratose dos coxins e focinho e espasmos musculares ou paresia de membros pélvicos, a qual pode persistir por longos períodos.

Cães infectados, com sintomas clínicos de VCC, foram estudados para detecção do RNA viral pela técnica de PCR e Nested-PCR.

Neste estudo, amplificou-se o gene da nucleoproteína (NP) em células mononucleares do sangue periférico (linfócitos), urina e saliva, de cães infectados com VCC, para detectar o genoma do mesmo, por RT-PCR, em diferentes amostras clínicas. A identificação do RNA viral foi concluída com sucesso, pelo método de RT-PCR, utilizando 2 pares de "primers" específicos do gene da nucleoproteína (NP). A técnica de RT-PCR, descrita neste estudo, pode ser um sistema de ensaio útil para determinar se cães suspeitos de infecção, por VCC, tenha níveis detectáveis de genes. Os resultados demonstram que a técnica de RT-PCR é exequível para o diagnóstico laboratorial de cinomose canina.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO GERAL

A cinomose canina tem sido reconhecida no mundo, por séculos, como uma das mais importantes doenças infecciosas que acometem a espécie canina [Schlingman, 1933; Buxton *et al.*, 1977; Fenner *et al.*, 1993]. É uma doença sistêmica, que pode ser letal, aguda e/ou subaguda, altamente contagiosa [Hirayama *et al.*, 1986], que causa mais morbidade e mortalidade, em cães jovens, especialmente aqueles com menos de 3 meses de idade, onde um grande número de cães são expostos à infecção, estes podem adoecerem e não resistirem à infecção ou recuperarem-se, tornando-se imunes [Swango, 1989; Greene & Appel, 1990]; e outros carnívoros do que qualquer outra infecção, tendo sido detectada em diferentes continentes [Svansson *et al.*, 1993].

Os cães afetados apresentam sinais clínicos sistêmicos gastrointestinais e/ou respiratórios, freqüentemente, desenvolvendo sinais clínicos de comprometimento do SNC [Buxton *et al.*, 1977; Appel, 1987; Durchfeld *et al.*, 1990; Fenner *et al.*, 1993; Mori *et al.*, 1994].

O vírus da cinomose canina (VCC) causa infecção generalizada aguda ou localizada crônica e infecção persistente no Sistema Nervoso Central (SNC) de cães [Mitchell *et al.*, 1987]. A persistência, in vivo, depois de uma recuperação clínica aparente tem sido proposta como um caminho para o desenvolvimento de encefalomielite desmielinizante crônica e encefalite em cães mais idosos, em animais convalescentes [Oglesbee *et al.*, 1986].

Devido ao estreito contato entre cães e o homem, existe a possibilidade do VCC estar relacionado a doenças humanas como a esclerose múltipla e a doença de Paget [Cook *et al.*, 1978; Cartwright *et al.*, 1993]. A doença de Paget é crônica e é caracterizada por uma progressiva destruição, remodelação e deformação do osso, com maior incidência no crânio, coluna vertebral e ossos pélvicos. Com o uso da técnica de hibridização "in situ", foi possível a detecção do genoma responsável pela síntese do nucleocapsídeo viral em osteoclastos, osteoblastos e células mononucleares provenientes de biópsias de ossos de pacientes com a doença. Tais dados demonstram, claramente, que o VCC pode residir em ossos de

peessoas com esclerose múltipla. Se o vírus é um agente etiológico da doença ou uma infecção oportunista, resta ser estabelecido, embora evidências moleculares tenham implicado este vírus como um possível agente etiológico da doença. [Cartwright *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1993].

Estudos moleculares e epidemiológicos têm sugerido que o VCC seja o responsável pela doença de Paget. Se verdade, então, juntamente, com o vírus da raiva, este seria um outro exemplo de vírus canino causando doença humana. Estudos em hospedeiros naturais têm demonstrado essas características [Mee & Sharpe, 1993].

Evidências moleculares demonstram que o VCC está presente em, aproximadamente, 65% de amostras de ossos de pacientes com a doença de Paget, usando a técnica de RT-PCR (hibridização "in situ"), entretanto, esses resultados têm sido criticados. Para uma demonstração mais sensível e segura do possível papel desse vírus, foi desenvolvida uma nova técnica de RT-PCR "in situ" (IS-RT-PCR) para examinar a presença do genoma responsável pela síntese do nucleocapsídeo viral em ossos de pacientes com a doença. A especificidade da técnica foi confirmada usando células Vero infectadas com VCC, as quais amplificaram seguindo a nova técnica (IS-RT-PCR). Seguindo a hibridização "in situ" convencional, o vírus foi detectado em 10 das 15 amostras de pacientes com a doença. Entretanto, seguindo a nova técnica, foi detectado em todas as 15 amostras examinadas. Esses resultados comprovaram que o VCC está presente em ossos de pessoas com doença de Paget, ajudando a confirmar a hipótese de que o Paramixovírus esteja envolvido na etiopatologia da doença de Paget [Mee *et al.*, 1998].

Tem sido observada uma reatividade cruzada imunológica forte entre o VCC e o vírus do sarampo (VS), entre todos os polipeptídeos destes vírus, com a possível exceção da hemaglutinina. Esses vírus podem estabelecer uma infecção persistente em cultura celular e ambos podem invadir o SNC do hospedeiro. Uma doença neurológica lentamente progressiva, conhecida como panencefalite esclerótica subaguda, tem sido diretamente correlacionada com a presença do vírus do sarampo no SNC em pacientes humanos. Igualmente, o vírus da

cinomose tem sido mostrado como o agente causador de uma doença neurológica lenta em cães mais idosos [Rozenblatt *et al.*, 1985; Rozenblatt *et al.*, 1985].

O VS, outro membro do gênero *Morbillivirus*, estreitamente relacionado ao vírus da cinomose, foi detectado em amostras de urina, utilizando-se a técnica da Transcriptase Reversa – PCR (RT-PCR) [Rota, *et al.*, 1995].

Além dos canídeos, outras espécies animais também são susceptíveis ao VCC. Várias investigações têm demonstrado que muitos animais selvagens apresentam susceptibilidade a infecção pelo VCC e a taxa de mortalidade varia muito entre espécies [Appel & Summers, 1995]; sendo comum entre os membros da família *Canidae* (cão doméstico, cão selvagem, lobo, raposa, coiote e chacal), *Mustelidae* (doninha, furão, texugo e marta), *Procyonidae* (jupará, guaxinim, quati e panda) e *Viverridae* (gato de algália). Há espécies susceptíveis para o VCC, mas com pouca evidência, distribuídas entre as famílias *Protelidae* (protelomamífero semelhante à hiena), *Hyaenidae* (hiena), *Felidae* (leão) e *Viverridae* (espécie de lêmure) [Anderson, 1995].

A toxoplasmose e o VCC são doenças comuns em *Mustelideos*, *Procyonideos* e *Canideos* selvagens. Moller (1951), considerou que a infecção por esse vírus pode diminuir a resistência e promover desenvolvimento de uma toxoplasmose latente, dentro de um processo de doença fulminante, com desenvolvimento de lesões herpéticas [Diters & Nielsen, 1978].

Em 1989, foi relatada uma epidemia causada, pelo VCC, em macacos japoneses (*Macaca fuscata*), associada a um caso fatal de encefalite viral, sendo este o primeiro relato de uma infecção natural por este vírus em primatas não humanos [Yoshikawa, *et al.*, 1989]. Foi relatado, também, que filhotes de cães de caça africanos morreram 3 semanas após terem sido vacinados com o VCC vivo modificado [Durchfeld *et al.*, 1990].

Em 1988, foi constatado que, aproximadamente, 18000 focas morreram no mar no norte ocidental da Europa, como um resultado de infecção causada por um Morbilivírus desconhecido. Estudos posteriores mostraram que o vírus era um Morbilivírus distinto do VCC [Curran *et al.*, 1992].

O VCC, também, foi isolado de focas cinzas de cativeiro e outros animais marinhos, como o golfinho, na Universidade de Guelph, Ontario [Lyons *et al.*, 1993]. O vírus, também, foi associado a infecções e morte de pandas gigantes na reserva de Wolong, China [Mainka *et al.*, 1994]. O mesmo ocorreu em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), em Galícia, no norte ocidental da Espanha [Peña *et al.*, 1994]; e sudeste dos Estados Unidos [Little *et al.*, 1998].

1.1. Agente etiológico

A etiologia viral da doença foi demonstrada em 1905, por Carré, através da constatação de que a coriza nasal de filhotes de cães era, freqüentemente, virulenta. Algumas das alterações observadas foram: aumento de temperatura corpórea, coriza mais ou menos intensa, conjuntivite, sintomas respiratórios e rarefação pilosa peri-ocular. A seguir, o animal sofria um considerável emagrecimento e vinha a óbito por bronco-pneumonia. Esta experiência foi repetida inúmeras vezes com sucesso. Frente a idade, raça, como também quantidade de filtrado injetado, a reação, pós inoculação, foi mais ou menos intensa [Carré, 1905].

Estes resultados foram confirmados por Lignières, em 1906, sendo a etiologia viral confirmada em 1923, por Puntoni. Estudos mais detalhados foram feitos, por Dunkin e Laidlaw, em 1926, confirmando dados obtidos por Carré, e tiveram notável contribuição, incluindo a produção de um soro hiperimune, utilizado na profilaxia para os cães e o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra cinomose na produção de imunização para os mesmos [Schlingman, 1933; Apple, 1969; Appel & Gillespie, 1972; Buxton *et al.*, 1977; Apple, 1987; Fenner *et al.*, 1993].

Embora a etiologia da cinomose canina seja conhecida desde 1926, a patogenia da doença permaneceu obscura até o relato de Appel, em 1969. Este relato e um estudo posterior, em 1970, concedeu uma avaliação do curso da multiplicação do vírus, em cães, e a relação dos sinais de infecção [Love, 1972].

Puntoni (1923) e Dunkin e Laidlaw (1928), desenvolveram uma vacina com vírus inativado, que foi usada por décadas, com sucesso limitado. A doença foi controlada por uma vacina com vírus vivo atenuado desenvolvida por Cabasso *et al.* (1951), Haig (1956) e Rockborn (1960) [Buxton *et al.*, 1977; Appel, 1987]. Goret (1936), na França, repetiu e confirmou os resultados sobre a patogenicidade do experimento de Dunkin e Laidlaw [Goret, 1950].

Larin (1955) afirmou que cepas do VCC foram distingüidas pelo curso da doença que elas produziam em furões infectados experimentalmente. Nas palavras de Richter (1908): “ a diversidade dos sintomas em cinomose não é argumentação de que a infecção possa ser dividida em três ou mais doenças separadas” . Dunkin e Laidlaw (1926) também enfatizaram a grande variabilidade da severidade da doença [Cornwell *et al.*, 1965].

1.2. Características do vírus da cinomose canina

O VCC é um membro da família *Paramyxoviridae* e pertence ao gênero *Morbillivirus* [Buxton *et al.*, 1977; Bellini *et al.*, 1986; Oglesbee *et al.*, 1986; Appel, 1987; Mitchell *et al.*, 1987; Curran *et al.*, 1991; Fenner *et al.*, 1993; Blixenkrone-Moller, 1993; Zurbriggen *et al.*, 1993; Greene & Appel, 1998].

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus [Rima *et al.*, 1995], a família *Paramyxoviridae* encontra-se dividida em 2 sub-famílias: *Paramyxovirinae* (vírus que infectam humanos, bovinos, murinos, símios, caninos e aves) e *Pneumovirinae* (vírus que infectam humanos, bovinos e perus). A sub-família *Paramyxovirinae* está dividida em 3 gêneros: *Paramyxovirus*, que inclui: parainfluenza bovino tipo 3, parainfluenza humano tipo 1 e 3, parainfluenza murino tipo 1 e parainfluenza símio tipo 10; *Morbillivirus*, que inclui: o vírus da cinomose canina, o vírus do sarampo, o vírus da peste bovina, cinomose de golfinho e foca; e *Rubulavirus*, que inclui: paramyxovirus aviário tipos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9; parainfluenza humano tipo 2, 4a e 4b; e caxumba. Esta classificação está fundamentada em características especiais deste vírus, sendo que todos os

Morbillivirus produzem corpúsculos de inclusões intranuclear e intracitoplásmico, que contém ribonucleocapsídeos virais [Rima *et al.*, 1995].

O VCC é relativamente grande, variando de 150 a 250 nm [Greene & Appel, 1998]. A partícula viral consiste de um RNA de fita negativa [Buxton *et al.*, 1977; Bellini *et al.*, 1986; Oglesbee *et al.*, 1986; Mitchell *et al.*, 1987; Curran *et al.*, 1992; Blixenkrone-Moller, 1993; Zurbriggen *et al.*, 1993; Murphy, 1996; Greene & Appel, 1998]; em conjunto com a proteína do nucleocapsídeo, a maior proteína viral produzida em células infectadas [Oglesbee *et al.*, 1986; Oglesbee *et al.*, 1989]; não segmentado [Oglesbee *et al.*, 1989; Vainionpää *et al.*, 1989; Curran *et al.*, 1991; Galinski *et al.*, 1991; Curran *et al.*, 1992]; com capsídeo de simetria helicoidal [Buxton *et al.*, 1977; Bellini *et al.*, 1986; Oglesbee *et al.*, 1986; Curran *et al.*, 1992; Blixenkrone-Moller, 1993; Zurbriggen *et al.*, 1993; Greene & Appel, 1998]; (16-20 Kb, em extensão) [Murphy, 1996]; é um vírus neurotrópico e linfotrópico [Löffler *et al.*, 1997]. É circundado por um envelope lipoproteico [Buxton *et al.*, 1977; Bellini *et al.*, 1986; Appel, 1987; Curran *et al.*, 1991; Blixenkrone-Moller, 1993; Greene & Appel, 1998]; derivado da membrana da célula hospedeira [Wright *et al.*, 1974; Vainionpää *et al.*, 1989; Greene & Appel, 1998], o qual apresenta 2 tipos de projeções. Estas projeções são compostas por 2 glicoproteínas, que são hemaglutinina e proteína de fusão (H e F) na parte externa. Na parte interna do envelope está a proteína de membrana (M) que é a responsável pela interação entre as proteínas H e F e o nucleocapsídeo do vírus [Appel, 1987; Fenner *et al.*, 1993]. O nucleocapsídeo varia entre 13-18 nm em diâmetro [Murphy, 1996]; este é formado dentro do citoplasma da célula hospedeira [Wright *et al.*, 1974; Greene & Appel, 1998]. Os membros desta família são pleomórficos [Oglesbee *et al.*, 1986; Vainionpää *et al.*, 1989; Galinski *et al.*, 1991; Fenner *et al.*, 1993; Murphy, 1996].

O VCC apresenta 6 proteínas estruturais: a nucleoproteína (N), que é a maior proteína viral, tem a função de envolver e proteger o genoma RNA, e é altamente conservada dentro da família *Paramyxoviridae*; enquanto que a fosfoproteína (P), muito susceptível a proteólise, é fosforilada e a segunda mais abundante, e associada com as proteínas N e L no nucleocapsídeo,

desempenham uma função direta de transcrição e replicação do RNA. A proteína da membrana (M) desempenha uma importante função durante a maturação do vírus, conferindo estabilidade ao envelope, enquanto que a proteína de fusão (F) é essencial para penetração viral na célula hospedeira, por fusão do envelope viral com a membrana plasmática, disseminação, contribuindo para a indução de imunidade. A hemaglutinina (H) é a segunda glicoproteína de superfície, induzindo a imunidade, adsorvendo o vírus à célula hospedeira. As proteínas H e F induzem a formação de anticorpos neutralizantes e conferem proteção contra a doença. Os anticorpos anti-F protegem mais do que os anti-H [Diallo, 1990]; e a chamada grande proteína (L), transcreve o genoma. Essas proteínas manifestam níveis de reatividade cruzada sorológica [Rima *et al.*, 1986; Oglesbee *et al.*, 1989; Vainionpää *et al.*, 1989; Diallo, 1990; Curran *et al.*, 1991; Fenner *et al.*, 1993].

A sequência genômica a partir da extremidade 3' é constituída pelo gene da proteína do nucleocapsídeo (N), o gene da fosfoproteína (P), o gene da proteína da matrix (M), o gene da proteína de fusão (F), o gene da proteína hemaglutinina (H) e o gene da grande proteína (L), a qual está próxima a extremidade 5' do genoma [Curran *et al.*, 1992].

Todos os vírus do gênero *Morbillivirus* são altamente patogênicos. Felizmente, há vacinas efetivas atenuadas contra as doenças que causam. Mas, em países em desenvolvimento, devido às condições climáticas e conservação inadequada, às vezes, as vacinas são inativadas [Diallo, 1990].

Como outros vírus que possuem envelope, a partícula do VCC é inativada, rapidamente, por solventes lipídicos, como clorofórmio e éter, por 0,05% de formalina em 4 horas a 37°C e 0,75% de fenol em 10 minutos a 4°C. Solução de hipoclorito e agentes oxidantes também inativam o VCC. O calor e a radiação destroem-no rapidamente. A partícula infecciosa permanece viável a pH 4,5-9,0 [Buxton *et al.*, 1977; Appel, 1987; Greene & Appel, 1998]. O vírus sobrevive por meses a uma temperatura de -10°C e indefinidamente a -70°C ou quando liofilizado [Buxton *et al.*, 1977; Appel, 1987].

1.2.1. Replicação

A adsorção do vírus na superfície celular é feita por um receptor celular, a proteína H. Nessa adsorção, o envelope viral funde-se com a membrana plasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocápside para o citoplasma. A fusão ocorre com a participação das proteínas F e H, embora esse mecanismo ainda não seja bem compreendido. A síntese de RNA começa, no citoplasma, após a penetração do genoma viral. O RNA é transcrito pela polimerase viral em RNAm, que servirá tanto como molde (para a fita negativa do genoma) para a replicação, como para a tradução dos genes em proteínas virais. As fitas da progênie viral são empacotadas na cápside proteica. Durante o último estágio da replicação viral, segmentos da membrana da célula hospedeira adquirem proteínas virais e características morfológicas das proteínas do envelope. Os nucleocapsídeos agrupam-se próximo a membrana celular e são, então, liberados da célula pelo processo de brotamento, adquirindo um envoltório lipoproteico, derivado da membrana da célula hospedeira. A proteína M desempenha uma importante função na liberação do vírus maduro [Lamb & Kolakofsky, 1996].

Aminoácidos específicos são essenciais para a replicação do VCC. Foi demonstrado que a privação da metionina suprime o crescimento do VCC, em células Vero, pela inibição da síntese do RNAm viral. A metionina é necessária para a replicação desse vírus, não somente em células Vero, mas também em células de neuroblastoma de rato e células de embrião de galinha. A inibição do crescimento do VCC, com a privação da metionina, em células Vero, foi mais proeminente do que com outros vírus, como por exemplo, vírus de Newcastle (NDV) e vírus da estomatite vesicular (VSV). Esta descoberta sugere que a metionina é essencial para o crescimento do VCC e que a replicação deste é mais dependente deste aminoácido do que outros vírus [Hirayama *et al.*, 1985].

Foram determinadas condições ótimas para o isolamento e crescimento do VCC, em cultura de linfócito canino. O pico do título de anticorpos foi observado entre 3 a 6 dias pós-inoculação e dependeu da multiplicidade da infecção. A replicação do vírus em linfócitos resultou em maiores títulos do que quando

replicados em macrófagos. Os linfócitos do sangue periférico, de cães imunes, foram tão susceptíveis, ao VCC, quanto foram os de cães susceptíveis não imunes [Appel *et al.*, 1992].

1.2.2. Variação antigênica

Laidlaw e Dunkin desenvolveram testes de fixação de complemento para o VCC. Precipitações específicas deste podem ser demonstradas dentro de 6-8 horas em gel de agarose, por difusão com soro hiperimune de tecidos infectados contra anti-cinomose, anti-sarampo ou anti-pestes bovina. Portanto pode-se estabelecer uma relação antigênica entre o vírus da cinomose, sarampo e peste bovina. Alguns exemplos dessa relação são: cães podem ser imunizados contra cinomose com o vírus da peste bovina; soro imune do gado contém anticorpo neutralizante contra sarampo; cães com cinomose apresentam anticorpos para sarampo e pessoas com sarampo podem apresentar anticorpos neutralizantes para cinomose no soro e, ainda, cães e furões inoculados com vírus do sarampo podem manifestar proteção contra cinomose [Buxton *et al.*, 1977].

Estudos de seqüenciamento do genoma do VCC têm demonstrado um grau de homologia de 53% no gene que codifica a proteína H e 77% de homologia no segmento do gene que codifica a proteína N, quando comparado a outros Morbilivírus [Rozenblatt *et al.*, 1985]. Foi feita uma comparação entre o vírus do sarampo e o VCC, para estabelecer o grau de homologia destes Morbilivírus. Foi demonstrado que o gene que codifica a proteína M teve 67% de homologia para a seqüência de nucleotídeos e 76% de homologia para a seqüência de aminoácidos [Bellini *et al.*, 1986].

Foram usados anticorpos monoclonais para representar a relação antigênica entre os 3 tipos de Morbilivírus: o vírus do sarampo (VS), VCC e o vírus da peste bovina (VPB); contra as proteínas: hemaglutinina (H), fusão (F), nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P) e matrix (M). Nove cepas do VS, três cepas do VCC e quatro cepas do VPB foram examinadas pelo ensaio de radioimunoprecipitação e imunofluorescência, para reatividade com os anticorpos heterólogos. A proteína NP e, em particular, a proteína F dos Morbilivírus,

mostraram um alto grau de homologia entre os epítomos; as proteínas P e M, mostraram uma homologia parcial; e a proteína H mostrou um baixo grau de homologia. Estes dados indicaram que o melhor antígeno para proteger cães, em vacinação "heterotípica" é o antígeno F. Essas reatividades cruzadas e reações do tipo específica foram obtidas com as proteínas virais internas (M, P e NP) [Sheshberadaran *et al.*, 1986].

Foi feito um estudo designado para comparar as propriedades biológica e molecular das cepas do VCC. Diferenças marcantes foram observadas em algumas propriedades biológicas, entretanto, pouca diferença foi observada nas propriedades moleculares, tal como proteínas virais e RNAs. Foram estudadas 10 cepas, as quais poderiam ser divididas dentro de 3 grupos, pela eficiência na formação de dermatite pustular. Notavelmente, as 3 cepas virulentas mostraram pouca capacidade de formação de dermatite pustular, comparada com uma moderada capacidade das 7 cepas atenuadas. Esses resultados parecem ser plausíveis pelo fato de que todas as cepas atenuadas, mas nenhuma das cepas virulentas foram passadas em embriões de galinha. Entretanto, alguma outra cepa vacinal, que foi atenuada, por passagens em células de rim de cão, também, demonstrou ter moderada capacidade para formação de dermatite, em um outro experimento. Esses resultados sugerem que a capacidade dessa formação pode estar associada com atenuação [Hirayama *et al.*, 1986].

Foram examinadas 3 propriedades biológicas, do VCC, para determinar se haveria alguma diferença entre a cepa selvagem e vacinal do vírus. As propriedades foram a habilidade de infectar macrófagos e células epiteliais, produzir efeito citopático em diferentes linhagens celulares, e se replicar na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. Para esse estudo, foram usadas 4 cepas vacinais e 5 isolados selvagens. Das 3 propriedades estudadas, somente a comparação da habilidade dos vírus de infectar macrófagos e células epiteliais foram um coerente marcador da origem do vírus. Os isolados selvagens infectaram somente cultura de macrófagos, enquanto que as cepas vacinais infectaram ambos os tipos de células. Um isolado selvagem não virulento,

de um caso de encefalite de cão mais idoso, reagiu como uma cepa vacinal, por infectar ambos os tipos de células [Evans *et al.*, 1991].

Em um estudo, foram isolados 2 Morbilivírus de foca (*Phoca sibirica* e *Phoca vitulina*), na Sibéria, em 1987, e no noroeste da Europa, em 1988, durante uma eclosão de doença que se assemelhava à cinomose em cães. Nessas viroses, vírus da cinomose de foca tipo 1 e tipo 2 (VCF1/2), respectivamente, foram identificados como o primeiro caso a ser observado. Foi feita uma comparação entre o VCF-1 e 2 e o VCC. Os dados mostraram que o VCF-1 era totalmente distinto do VCC, entretanto que o VCF-2 poderia não ser distinguido deste vírus. Observações de cães infectados foram feitas, mostrando uma alta e maior resposta imunológica para VCF-1, em relação aos outros 2 vírus; sendo que os cães infectados com VCF-2 desenvolveram resposta similar para as 3 viroses, havendo, aí, a primeira indicação da diferença biológica entre VCF-1 e 2. Observações feitas, naturalmente, em focas infectadas mostrou que as VCF-1, geralmente, desenvolviam altos títulos de anticorpos para VCF-1, mais do que para VCF-2 e VCC, entretanto as VCF-2, geralmente, desenvolviam altos títulos de anticorpos para VCF-2 e VCC, mais do que para VCF-1. Esses relatos mostram que os 2 vírus de focas são totalmente distintos entre si [Visser *et al.*, 1990; Svansson *et al.*, 1993].

Um estudo, aonde foram analisadas as propriedades moleculares da proteína do nucleocapsídeo (NP), do VCC, isoladas entre 1992 e 1995, foi realizado no Japão. Foram obtidos 4 isolados (cepas Yanaka, Ueno, Hamamatsu e Adachi) observando-se que eram antigenicamente idênticos. Análises das seqüências de toda região do gene NP, de um isolado, a cepa "Yanaka", revelou que o gene NP continha 1683 nucleotídeos e um índice de 93,2% de homologia com uma cepa laboratorial, a cepa "Onderstepoort". A seqüência de aminoácidos continha 523 aminoácidos e foi 95,2% e 99% homólogas à cepa "Onderstepoort" e uma cepa virulenta, a "A75/17", respectivamente [Yoshida *et al.*, 1998].

1.3. Epidemiologia

O VCC é enzoótico, na maioria das áreas do mundo, exceto em regiões quentes e áridas. A epizootia, em cães, ocorre em áreas isoladas onde a doença estava inexistente, por muitos anos e onde há uma população de cães altamente susceptíveis [Appel, 1987]. O VCC encontra-se, em abundância, em exsudatos respiratórios, entretanto, podendo ser isolado de outros tecidos do corpo e secreções, incluindo urina. Cães que não recebem imunização periódica podem perder a proteção e tornar-se susceptíveis à infecção, em seguida à situações de estresse, imunossupressão ou contato com outros cães doentes. As raças de cães mais comumente e severamente afetadas incluem: Greyhounds, Husky Siberiano, Weimaraner, Samoeda e Alaskan Malamutes. A virulência é outro parâmetro que pode afetar a severidade e extensão ou tipo de doença clínica. Certos isolados, como a cepa "Snyder Hill" ou "R252", são altamente virulentas e neurotrópicas. Outros isolados podem variar e causar lesões no SNC [Greene & Appel, 1990]. Infecções, pelo VCC, são freqüentes em cães de regiões urbanas, em canis e em outras situações onde há contato entre cães doentes em lugares fechados [Fenner *et al.*, 1993]. A taxa de mortalidade, seguindo infecção, pelo VCC, varia com espécies de hospedeiro, alcançando 0% em gatos domésticos, aproximadamente, 50% em cães domésticos e 100% em furões [Löffler *et al.*, 1997].

Estudo feito com 236 carnívoros selvagens, 146 mustelídeos e 90 raposas, originários da mesma área geográfica, no norte da Alemanha, mostrou a presença do VCC nessa região. O antígeno foi encontrado no cérebro de 54 mustelídeos, predominantemente na massa cinzenta do cérebro. Um aumento no número de infecções por esse vírus foi observado entre novembro de 1989 e novembro de 1990, no pico do verão [van Moll *et al.*, 1995].

Estudos em ursos mostraram que estes animais podem ser susceptíveis ao VCC. O estudo foi realizado no Parque Nacional Abruzzo, na Itália, dentro de uma área de proteção; as amostras foram coletadas entre 1991 e 1995. O objetivo foi determinar a evidência sorológica dos patógenos virais que causam mortalidade em carnívoros, incluindo o VCC. Constataram que os ursos nunca haviam sido

vacinados e verificaram que 3 de 9 ursos livres apresentavam anticorpos contra esse vírus e, 1 de 6, ursos capturados apresentavam anticorpos. Este foi o primeiro relato, de VCC, em população de ursos [Marsilio *et al.*, 1997].

Em 1994, ocorreu uma epidemia, em uma população de leões (*Panthera leo*), no ecossistema Serengeti (Leste da África), envolvendo doença neurológica, encefalite e pneumonia, causando a morte de 30% da população. Os sintomas incluíam: mioclonias e anorexia. Análise histopatológica da pele revelou corpúsculos de inclusões típicos do VCC. O vírus era mais patogênico em leões e hienas do que previamente observado em outras epidemias causadas por esse mesmo agente. Foi feita uma comparação da sequência das proteínas Morbilivirais (P e H). A proteína H adsorve o vírus a célula hospedeira, é um determinante, o qual varia de hospedeiro e causa patogenicidade. A proteína P é altamente conservada. Essa análise mostrou que os carnívoros do Serengeti são susceptíveis ao VCC sendo distinto das demais cepas virais de outras localidades geográficas. A distinção genética aumentou a patogenicidade em leões. O cão doméstico é um reservatório natural para o vírus e tem soroprevalência [Carpenter *et al.*, 1998].

1.4. Patogenia

Caracteristicamente, a cinomose canina acomete, principalmente, cães jovens (3 a 6 meses de idade) e, raras vezes, cães mais idosos, devido a imunidade natural. A doença tem um período de incubação de, aproximadamente, 3 a 7 dias, seguida de febre, conjuntivite, sintomas gastrentéricos e respiratórios (rinite, broncopneumonia). A doença parece ter uma prevalência periódica, com uma alta prevalência nos meses de inverno, sendo que epidemias severas tendem a ocorrer em 2 ou 3 ciclos, anualmente [Buxton *et al.*, 1977; Fenner *et al.*, 1993].

O vírus da cinomose atua sobre o sistema linfóide, e a imunossupressão decorrente contribui para o agravamento da doença, permitindo o estabelecimento de infecções secundárias [Appel, 1987; Shin *et al.*, 1995].

Foram avaliadas lesões de pele, em cães, com sintomas clínicos sugestivos de cinomose, tais como: dermatites pustular e vesicular, hiperqueratose dos coxins e rarefação pilosa peri-ocular. Observou-se no histopatológico da pele, presença de células gigantes sinciciais multinucleares [Summers & Appel, 1985]; reunidas com corpúsculos de inclusão citoplásmico e nuclear, contendo partículas e antígeno virais [Maeda *et al.*, 1994].

A infecção predominante inicial, pelo Paramixovírus, ocorre no sistema respiratório, vias aéreas anterior e posterior. Entretanto segundo Sidhu *et al.*, (1993), em casos de sarampo e cinomose, a disseminação sistêmica do vírus pode ocorrer, primeiramente, no SNC.

1.4.1. Infecção Sistêmica

Durante a exposição natural, o VCC se dissemina, por aerosol e contato do epitélio do trato respiratório anterior. No período de 24 horas, o vírus se multiplica nos macrófagos e se dissemina para as células das tonsilas e linfonodos bronquiais. Por 2 a 4 dias pós-infecção, a carga viral aumenta nas tonsilas e nos linfonodos bronquiais, mas um número inferior de células mononucleares infectadas, são encontradas em outros órgãos linfóides. Por 4 a 6 dias pós infecção, a multiplicação do vírus ocorre dentro dos folículos linfóides do baço, timo, na lâmina própria do estômago e intestino delgado, nos linfonodos mesentérico e cervical e nas células de Kupffer do fígado, desenvolvendo a viremia. A proliferação do vírus, nos órgãos linfóides, coincide com o desenvolvimento de febre e leucopenia. A leucopenia é decorrente de linfopenia, devido ao dano viral às células linfóides, afetando ambas, as células T e B. Após 8 a 9 dias de infecção, uma nova disseminação do VCC ocorre no epitélio, o que se caracteriza pela manifestação dos sintomas clínicos, tais como: diarreia, vômitos e conjuntivite. Na dependência do estado imune do animal, outros órgãos poderão ser comprometidos como os rins, bexiga e SNC. Ainda, após 14 dias de infecção, os animais com títulos de anticorpos adequados podem ser assintomáticos da doença [Appel, 1969, Appel, 1970; Appel, 1987; Fenner *et al.*, 1993]. Já os cães

que apresentam baixo título de anticorpo no período de 9 a 14 dias pós-infecção, o vírus pode se disseminar para outros tecidos, incluindo pele, glândulas exócrina e endócrina. A manifestação da doença depende da estirpe viral, idade e imunocompetência do cão [Thomas *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1998]. A infecção em cães jovens, geralmente, resulta em poliencfalomielopatia aguda (PEM) e alta mortalidade, enquanto que em cães mais idosos, esta se desenvolve, principalmente, em leucoencefalomielopatia crônica (LEM) com um baixo índice de mortalidade. O diagnóstico presuntivo de encefalomielite decorrente da infecção pelo vírus da cinomose, geralmente, é baseado na história e evolução dos sintomas clínicos [Thomas *et al.*, 1993].

Com o aumento do título de anticorpos, a infecção viral nos diversos tecidos orgânicos é debelada, mas pode persistir por longos períodos na úvea, neurônios e coxins. A proteção desses cães pode estar comprometida se o mesmo for exposto a um agente, altamente virulento, ou a uma grande carga viral, ou ainda imunocomprometido ou submetido à estresse [Greene & Appel, 1998].

1.4.2. Infecção do SNC

A disseminação do vírus, no SNC, depende da resposta imune sistêmica do hospedeiro. O VCC causa uma encefalomielite em cães, que varia com a cepa viral [Pearce-Kelling *et al.*, 1990]. O vírus, provavelmente, entra no sistema nervoso de muitos cães infectados apresentando ou não sintomas neurológicos. O vírus (livre ou associado a linfócito) pode entrar nas células endoteliais vasculares nas meninges, células epiteliais do plexo coróide do 4º ventrículo e células endimais do sistema ventricular. O tipo de lesão e o curso da infecção, no SNC, depende de certos fatores, incluindo a idade e a imunocompetência do hospedeiro e as propriedades imunossupressiva e neurotrópica do vírus. Entre o 12º e o 16º dias, de infecção pode ocorrer elevação de temperatura corpórea, acompanhada de progressiva perda de peso, depressão e perda de apetite [Appel, 1969, Appel, 1970; Appel, 1987; Fenner *et al.*, 1993]. As encefalites aguda ou crônica podem ocorrer, independentemente, ou as lesões da fase aguda podem progredir para a

forma crônica em animais que sobrevivem. A persistência do VCC é essencial para indução a uma doença desmielinizante, progressiva e crônica que leva a desmielinização do SNC, existindo uma associação entre a persistência e a virulência [Vandeveldt *et al.*, 1995]. O VCC virulento isolado de cães com cinomose mostra imediata replicação em cultura de célula primária de cérebro de cão. Há evidências que a proteína do nucleocapsídeo (NP) desempenha um importante papel no desenvolvimento desta replicação. A referida proteína consiste em estrutura viral mais abundante, que influencia na estrutura do vírus e tem algumas funções regulatórias na transcrição e replicação viral [Stettler & Zurbriggen, 1995]. As doenças inflamatórias do SNC são causas importantes de derrame cerebral em cães. Muitas dessas doenças são causadas por agentes infecciosos como vírus, protozoários e fungos, embora haja outros casos em que a etiologia ainda não seja conhecida [Thomas, 1998].

O VCC causa lesões multifocais na massa branca e cinzenta do SNC [Zurbriggen *et al.*, 1998]. As lesões da massa cinzenta resultam predominantemente em encefalite. As lesões da massa branca caracteriza-se por lesões na bainha de mielina (desmielinização), que está associada com a replicação do VCC em neurônios e células da glia, durante um período de intensa imunossupressão induzida pelo vírus [Vandeveldt *et al.*, 1995; Greene & Appel, 1998]. Observou-se ausência do vírus em cães que desenvolviam anticorpo e sobreviviam, exceto em alguns, em que o vírus se localizava em neurônios e células epidermais dos coxins, caracterizando a presença de encefalite, paralisia de membros e hiperqueratose de coxins [Appel, 1969; Appel, 1970; Appel, 1987; Fenner *et al.*, 1993].

1.4.3. Manifestações Clínicas

1.4.3.1. Sintomas sistêmicos

Os sintomas clínicos observados na infecção pelo VCC, variam dependendo da virulência da cepa viral, condições ambientais, idade e estado

imune do hospedeiro [Greene & Braund, 1989]. As manifestações clínicas da doença, seguindo infecção natural, incluem depressão, perda progressiva de peso, conjuntivite purulenta, desidratação, hiperqueratose dos coxins e focinho, sintomas respiratórios e nervosos, espasmos musculares ou paresia de membros pélvicos, a qual pode persistir por longos períodos [Schlingman, 1933]. A taxa de mortalidade é variável, mas em casos menos grave, geralmente, é baixa e algumas observações consideram que 50% a 70% das infecções são assintomáticas [Greene & Appel, 1998]. Complicações como pneumonia e encefalite ocorrem em, aproximadamente, 50% dos casos, e esses podem ter uma taxa de mortalidade de 70 a 80% [Buxton *et al.*, 1977; Fenner *et al.*, 1993].

1.4.3.2. Sintomas neurológicos

O quadro neurológico, geralmente, se inicia no período de 1 a 3 semanas após a manifestação dos sintomas sistêmicos; entretanto, não há possibilidade de prever se o cão desenvolverá alterações neurológicas. Cães que desenvolvem hiperqueratose digital e nasal, geralmente, podem apresentar várias complicações neurológicas. Cães adultos ou parcialmente imunes que foram previamente vacinados podem desenvolver repentinamente sintomas neurológicos, sem manifestação anterior de outros sintomas. Os sintomas neurológicos, agudo ou crônico, são típico, progressivo e variam de acordo com a área comprometida do SNC [Greene & Appel, 1998].

Filhotes infectados, por via transplacentária, podem desenvolver sintomas neurológicos durante as primeiras 4 a 6 semanas de vida. Na dependência do período de gestação em que a infecção ocorreu, observa-se abortamentos ou nascimento de animais debilitados; entretanto quando esses sobrevivem podem apresentar imunodeficiência permanente. Filhotes infectados com o VCC, antes do aparecimento da dentição permanente, podem apresentar severo dano no esmalte, dentina ou raiz dos dentes. Sintomas clínicos, incluindo dispnéia, depressão, anorexia, colapso e prostração, podem surgir entre o 14^o e 18^o dias pós infecção. As lesões oftalmológicas, na cinomose canina, tem sido atribuída a

presença do vírus no nervo óptico e na retina, manifestando-se com perda da acuidade visual e midríase [Greene & Appel, 1998].

Observou-se que cães com artrite reumatóide apresentam níveis elevados de anticorpos para VCC no soro e fluído sinovial, enquanto que cães com artrite inflamatória e degenerativa apresentavam níveis mais baixos. Ainda, o antígeno foi encontrado no complexo imune presente do fluído sinovial de cães com artrite reumatóide, inexistindo em cães com artropatias inflamatória ou degenerativa [Bell *et al.*, 1991; Fenner *et al.*, 1993; Greene & Appel, 1998].

1.5. Aspectos imunológicos

O envelope do Paramixovírus contém 2 glicoproteínas de superfície, as quais são alvo para o mecanismo de defesa do hospedeiro. Em geral, a hemaglutinina (H) é o principal antígeno envolvido em neutralização “in vitro”, mas em neutralização “in vivo”, a proteína responsável é a de fusão (F), prevenindo a expansão da infecção e o desenvolvimento da doença [Norrby *et al.*, 1986].

A resposta imune, em cães, pelo VCC, depende da cepa viral e do hospedeiro. Alguns cães desenvolvem uma resposta imune precoce e restabelecem-se rapidamente; em outros, a infecção viral dos tratos respiratório, intestinal e urogenital levam à óbito. Durante esta fase, os cães apresentam linfopenia e ficam imunossuprimidos. Os anticorpos das classes IgM e IgG aparecem no início da infecção, sendo que a IgM pode ser detectada por 5 semanas a 3 meses, após a infecção. A IgG é a imunoglobulina mais importante para a imunidade. Grande variação na resposta imune é observada, em cães, que não chegam a óbito, por cinomose canina crônica ou subaguda e cães que sobrevivem a uma infecção persistente no SNC. Alguns cães desenvolvem uma desmielinização, aproximadamente 1 mês após a infecção. Os cães que sobrevivem à cinomose apresentam uma imunidade de longa duração. Anticorpos neutralizantes são transferidos para progênie através do colostro. O fluído cerebro-espinhal de cães que se recuperam está, geralmente, livre de anticorpo e interferon. Cães que têm sido vacinados com VCC inativado não são protegidos

contra infecção com vírus selvagem, mas são protegidos contra a doença clínica. As glicoproteínas virais (H e F) induzem proteção em cães, mas os que têm sido vacinados com VCC vivo atenuado adquirem longa imunidade. O fluido cerebrospinal permanece livre de anticorpos neutralizantes e interferon em cães vacinados [Appel, 1987; Fenner *et al.*, 1993].

Em 1991, alguns cães foram submetidos a infecções experimentais com algumas cepas virulentas do VCC, como a "A75-17" ou "R252", que poderiam levar a produzir diferentes resultados da doença. Alguns cães desenvolveram lesões de desmielinização aguda e vieram a óbito devido a encefalite precoce; alguns apresentavam uma encefalite subaguda com desmielinização crônica e outros superaram a infecção e sobreviveram. A habilidade, desses cães, de superarem a infecção está associada à indução da resposta imune celular e humoral. Foi demonstrado que a resposta imune humoral, incluindo o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes, é necessária para a liberação do vírus e proteção da doença. Krakowka *et al.* (1975), relataram que a redução do anticorpo para glicoproteína induziu o desenvolvimento de lesões cerebrais em cães infectados com a cepa "R252", baseados nos testes de anticorpos neutralizantes, enquanto que, em cães que se restabeleceram, foram encontrados anticorpos para o nucleocapsídeo e glicoproteína. Muitos cães com encefalite experimental e também cães com encefalite natural têm apresentado resposta imune humoral restrita para as proteínas internas, como por exemplo, a proteína do nucleocapsídeo (N), a fosfoproteína (P) e a proteína da membrana (M) [Rima *et al.*, 1991].

A cepa "BS-C-I:37", isolada localmente, foi estabelecida como imunogênica para cães e furões, mas ainda, mantendo alguma patogenicidade para os cães. Esta cepa tem produzido altos títulos de anticorpos neutralizantes. Passagens do vírus vacinal, em cães, não demonstrou nenhuma reversão para virulência [Geering, 1967].

Em 1969, Appel demonstrou que quando cães susceptíveis eram expostos ao vírus patogênico da cinomose canina, na forma de aerosol, 50% deles vieram a

óbito em, aproximadamente, 3 semanas, sem apresentar anticorpos, entretanto os que sobreviviam desenvolviam anticorpos no 9º dia com título maior do que 1:100.

Gerber e Marron (1976) relataram que cães vacinados com o VCC produziam tanto resposta mediada por célula quanto por anticorpo para ambos os vírus, sarampo e cinomose, enquanto que cães vacinados com o VS produziam resposta mediada por célula e anticorpo para o sarampo, mas apenas mediada por célula, para cinomose [Chalmers & Baxendale, 1994].

A distribuição do VCC foi examinada por imunohistoquímica com anticorpos monoclonais específicos. O antígeno viral foi localizado em células T-dependente e em folículos de órgãos linfóides. As células T e CD4 positivas servem como alvo para o vírus durante o estágio agudo da infecção [Iwatsuki *et al.*, 1995].

Foi isolado um anticorpo monoclonal (MAb K41) que se adsorve a superfície da célula e inibe a infecção, por VCC, de várias linhagens celulares de várias espécies. Células com MAb K41 reduz o número de infecções e o tamanho do sincício. O receptor celular envolvido é o CD9, uma proteína transmembrana que torna células susceptíveis ao VCC. A CD9 é uma proteína de superfície que está presente em células B, eosinófilos, basófilos, células T ativas e várias células não hematopoiéticas e tecidos, incluindo o SNC [Löffler *et al.*, 1997].

1.6. Imunoprofilaxia

Em 1923 e 1924, Puntoni demonstrou que foi possível propagar o VCC por passagens intracerebrais de cão para cão, e que foi possível converter essa virulência através de um tratamento por vacina. O primeiro método de vacinação de Puntoni foi administrar, primeiro, uma dose do vírus morto, subcutaneamente, depois uma dose com vírus atenuado e, para completar a imunização e confirmar a imunidade, administrou-se uma pequena dose de material contaminado. Concluiu-se que a imunização com a vacina, com vírus morto ou inativado, teve bons resultados [Laidlaw and Dunkin, 1928].

Estudos feitos com vacina do sarampo para proteger cães contra cinomose, mostraram que alguns animais, depois de imunizados, foram expostos ao VCC,

tendo uma produção de anticorpos. O oposto ocorreu com alguns cães, que não haviam sido imunizados com a vacina do sarampo, e apresentaram VCC no baço, sem produção de anticorpos [Baker, 1970].

Em geral, os cães, podem ser protegidos da infecção causada pelo VCC, pela vacina atenuada viva. Contudo, tem sido observado o aumento de falhas vacinais, em filhotes, em áreas urbanas e canis, apesar da vacinação. A falha aparente, em vacinação, é considerar a presença de anticorpo materno que interfere com o vírus vacinal [Kai *et al.*, 1993].

É comum, na prática, em muitos países, vacinar filhotes com o VS vivo modificado para protegê-los contra o VCC, isso porque as 2 viroses são antigenicamente semelhantes e o VS não é neutralizado pelos anticorpos maternos para cinomose. Essa aproximação "heterotípica" para vacinação tem sido adaptada pelos criadores que costumam vacinar seus filhotes com 6 semanas de idade, e muitos cães, ainda, possuem altos níveis de anticorpo materno, interferindo com a vacina contra o VCC. O envelope desses vírus contém 2 antígenos principais de superfície, chamados hemaglutinina (H) e fusão (F), ambos sendo alvo para mecanismo imune de defesa. Utilizando anticorpos monoclonais contra as várias proteínas dos Morbilivírus, Sheshberaderan *et al.* (1986), demonstraram que as proteínas F de ambos os vírus têm um alto nível de homologia entre os epítomos. A função primária da proteína F é facilitar a expansão do vírus de célula para célula, um processo importante para a patogenia da doença. Em contraste, a não homologia entre os epítomos foi observada entre as proteínas H dos 2 vírus. Appel *et al.* (1984), propuseram que a proteína F do VS seja, primariamente, a responsável pela proteção em cães, baseado na resposta imunológica observada em animais vacinados com esse vírus. Não é comum, na prática, vacinar filhotes com 6 semanas de idade contra cinomose canina, isso porque a maioria dos cães, ainda, possuem anticorpo materno que poderia neutralizar o vírus vacinal. O VS não é neutralizado pelo anticorpo contra cinomose, por isso são vacinados com esse vírus vivo modificado que induz a um estado de resistência maior do que a imunidade passiva adquirida, em grande parte, pelo colostro. Com 12 semanas de idade, o filhote, então, é imunizado com

vacina do vírus da cinomose. Contudo, o perigo de se usar a vacina do sarampo constantemente, para proteger cães pela vacinação "heterotípica" é que a progênie de cadelas vacinadas com VS pode possuir anticorpos maternos que possam interferir com a vacinação em uma idade prematura. Torney *et al.* (1967), demonstraram que cadelas com o tipo selvagem do vírus da cinomose, durante a gravidez, aumentaram o título de anticorpos para sarampo, provavelmente, como consequência de anticorpo da proteína F. Como resultado, o problema original do anticorpo materno interferindo com o VCC vivo, é agora, diretamente contra o VS [Chalmers *et al.*, 1994].

O VCC reapareceu, em cães, na Finlândia, em 1990, depois de 16 anos de ausência. Em 1994 e 1995, ocorreu uma eclosão, em áreas, com uma alta densidade populacional de cães, envolvendo animais vacinados contra cinomose. A estimativa total do número de casos foi, pelo menos, 5000, sendo que 865 casos foram confirmados pelo teste de anticorpo fluorescente indireto de 3649 amostras de células epiteliais. Dos casos confirmados, 73% apresentavam entre 3 e 24 meses de idade; 487 destes haviam sido vacinados, pelo menos uma vez e 41% apresentava uma história completa de vacinação. O decréscimo na proporção de cães jovens com títulos de anticorpo ($<1/8$) coincidiu com o declínio e o fim da eclosão durante a primavera e verão de 1995. Foi concluído que o decréscimo da imunidade populacional durante 1990 a 1994 foi o maior motivo da eclosão no verão de 1994 [Ek-Kommonen *et al.*, 1997].

A severidade da doença tem se reduzido, constantemente, nas recentes décadas, o que pode ser atribuído ao extensivo uso de vacinas atenuadas e tratamento com antibiótico, controlando infecções bacterianas secundárias [Blixenkrone-Moller, 1989]. A doença tem sido controlada, por muitos anos, utilizando-se vacinas atenuadas vivas [Mori *et al.*, 1994].

Estudos confirmaram que 3% do anticorpo materno transferido ocorre no útero e 97% pelo colostro, resultando em um título inicial, para recém-nascidos, igual a 77%, o mesmo da cadela. Os anticorpos maternos estão, geralmente, ausentes por volta da 12^a a 14^a semanas de idade. As vacinas para VCC são, geralmente, aplicadas por volta da 3^a ou 4^a semanas, entre 6^a a 16^a semanas de

idade, em filhotes que receberam colostro. Depois do restabelecimento por infecção natural ou auxílio por vacinação, a imunidade pode persistir por anos. A vacinação com vírus atenuado parece proteger, previamente, cães não vacinados, quando esta é aplicada pelo menos 2 dias antes da exposição ao VCC virulento. A vacina com VCC inativado não produz imunidade suficiente para prevenir a doença, mas cães vacinados mostraram uma boa resposta imune comparados aos não vacinados. Apesar do sucesso com vacinação na proteção de cães contra o VCC, a imunidade induzida vacinal nunca é tão longa quanto a resposta imune que ocorre depois da infecção natural ou experimental com vírus virulento, infecções experimentais de cães com o VS, os protege de infecções subseqüentes com VCC. O vírus vacinal do sarampo produz uma infecção não contagiosa no sistema linfóide dos cães, semelhante ao VCC vacinal. Cães com menos de 6 semanas de idade, com alta concentração de anticorpo materno não respondem bem à vacinação com VCC ou sarampo. Durante uma série de vacinação, é aconselhável se fazer uma combinação com VCC vacinal para produção adequada da imunidade, de pelo menos 12 meses de duração. Para um controle adequado, é aconselhável separar cães infectados de sadios, pois os primeiros, geralmente, eliminam o vírus em secreções por 1 a 2 semanas após a doença sistêmica aguda. Aqueles que desenvolvem sinais neurológicos, sem doença sistêmica, também, podem eliminar o vírus [Greene & Appel, 1998].

1.7. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo de VCC é realizado pela demonstração típica de corpúsculos de inclusões virais. Estas inclusões podem estar no núcleo ou citoplasma de certas células em animais infectados com VCC. Os corpúsculos de inclusões virais podem ser observados em células do epitélio de pulmão, rim [Reculard & Guillon, 1967]; pâncreas, estômago e bexiga urinária, também no cérebro e olhos, utilizando as técnicas de imunofluorescência ou imunocitoquímica [Appel, 1987; Greene & Appel, 1990; Moller, 1993].

A demonstração de corpúsculos de inclusões intracelular em células epiteliais da conjuntiva e células do sangue, quando observadas em conjunto com sintomas clínicos típicos, caracterizam o diagnóstico “ ante-mortem” . O diagnóstico “ post-mortem” é baseado na característica das lesões histopatológicas, incluindo a presença de inclusões virais intranuclear e intracitoplásmica em células epiteliais da pele, trato gastrointestinal, epitélio brônquico [Bush *et al.*, 1976]; tubular, bexiga urinária e olhos, dependendo do estágio e severidade da infecção [Alleman *et al.*, 1992].

1.7.1. Diagnóstico direto

O VCC tem um tropismo por linfócitos, mas pode ser cultivado em culturas, primária ou contínua, de células de rim de cão ou furão, células de rim de macaco verde africano (Vero) e linhagem celular de linfócito B de sagüi (B95), sendo que relatos indicaram uma alta susceptibilidade dessa linhagem celular para isolamento do vírus selvagem do sarampo [Buxton *et al.*, 1977; Hirayama *et al.*, 1985; Kai *et al.*, 1993]. O isolamento do VCC virulento tem-se mostrado difícil em cultura de células de rotina. A replicação viral ocorre durante a cultura direta de tecidos alvo do hospedeiro infectado. Culturas de macrófago alveolar detecta o vírus em 24-48 horas, Formação de células gigantes (sincícios), um efeito citopático característico do VCC em muitas culturas de tecido, é detectado dentro de 2 a 5 dias, essas células sinciciais tem sido encontradas, em cães, com encefalite causada pelo VCC [Palmer *et al.*, 1990]. Culturas de macrófagos tem, ultimamente, sido substituídas por culturas de linfócito de cão para isolamento do VCC; entretanto, a taxa de sucesso é baixa. Em geral, títulos de vírus vacinal são altos em macrófagos, linfócitos, epitélio tubular e linhagem de célula epitelial, ao passo que, cepas selvagens virulentas crescem, preferencialmente, em macrófagos e linfócitos. As culturas podem ser examinadas, com anticorpo fluorescente, quando o efeito citopático não for observado [Greene & Appel, 1998]. Em casos agudos da doença, o epitélio brônquico demonstra formação de sincício

dentro de 12-24 horas. Em casos agudo e subagudo, pode-se isolar o vírus em linfonodos, baço e células do timo [Appel, 1987].

Técnicas de imunofluorescência podem facilitar um diagnóstico específico para VCC, entretanto, estes testes requerem equipamento especial e são, geralmente, manuseados por laboratórios de diagnóstico regional. Em cães afetados, a imunofluorescência é, geralmente, feita em preparados citológicos da conjuntiva, tonsila e sistema respiratório. Essa técnica pode, também, ser utilizada no preparo de células do fluído, sedimento da urina e medula óssea. Sinais clínicos tornam-se aparentes em pouco tempo (14 dias), resultados positivos não seriam identificados, exceto em cães que não conseguiram uma resposta imune adequada e sucumbir a infecção. Começando com o período de restabelecimento, o anticorpo pode se adsorver e infundir o antígeno em células infectadas, conseqüentemente, resultados falso-negativos serão obtidos. O vírus pode, às vezes, ser detectado por longos períodos, em células epiteliais e macrófagos do trato respiratório posterior. O vírus, também, persiste por períodos de mais de 60 dias na pele, tecido da úvea, coxins e SNC. Utilizando um anticorpo fluorescente direto nas células da conjuntiva, fluído ou esfregaço sanguíneo é de grande utilidade na fase aguda da doença, em casos crônicos, o anticorpo interfere com o diagnóstico de imunofluorescência, resultados falso-negativo são freqüentes com esse método. O antígeno viral é difícil de ser encontrado em amostras clínicas de cães com cinomose neurológica ou os que se restabelecem de sinais sistêmicos [Greene & Appel, 1998].

De acordo com Shin *et al.* (1995); a tentativa de isolamento do VCC, em cultura de tecido, pode ser um caminho efetivo para determinar a infecção. Entretanto, o isolamento do vírus leva muitos dias e/ou semanas e, freqüentemente, não se obtém sucesso se o cão afetado não estiver no estágio agudo da infecção. Outros testes laboratoriais, como imunofluorescência, imunocitoquímica ou detecção de corpúsculos de inclusões, também produzem um resultado negativo em casos subagudo ou crônico. Então, para uma análise alternativa, rápida e sensível requerer-se, ainda, para diagnóstico laboratorial, cães suspeitos clinicamente de infecção pelo vírus.

A forma não inflamatória de encefalite, causada pelo VCC, foi caracterizada por desmielinização em sítios de preferência, como o cerebelo, úvea e medula espinhal. O diagnóstico foi confirmado pela detecção do VCC por imunocitoquímica e por hibridização "in situ". O diagnóstico ante-mortem, em 18% dos cães que sobreviveram, foi realizado em células do fluido cérebro-espinal, usando anticorpo fluorescente indireto. Foram observadas mioclonias em 43% dos cães com encefalite, causada pelo VCC, sendo que, em 33% dos cães com a forma inflamatória de encefalite estava envolvida a medula espinhal [Tipold, 1995].

1.7.2. Diagnóstico indireto

Uma grande variedade de técnicas imunológicas tem sido introduzida durante os últimos anos. Muitas dessas técnicas foram aplicadas para auxiliar a realização de diagnósticos na área veterinária, mas ainda não são utilizados como rotina [Schultz & Adams, 1978; Greene & Appel, 1990].

Anormalidades são detectáveis, em cães, com sinais neurológicos de cinomose, entretanto, resultados falso-negativo pode ocorrer. O fluido pode crescer mais que o normal por causa da pressão intracranial causada pela inflamação. O aumento de proteína (IgG) e células, com predominância de linfócitos, tem sido característica de formas inflamatórias de encefalomielite, causada por VCC, isso porque o anticorpo é produzido localmente e este aumento não tem sido observado, em cães, vacinados ou em cães com cinomose sistêmica, sem doença no SNC. Cães com encefalomielite desmielinizante não inflamatória aguda pode ter o fluido normal [Greene & Appel, 1990; Greene & Appel, 1998].

O anticorpo IgM pode ser detectado em amostras de soro de cães que manifestam a doença, utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA). Também a detecção do antígeno viral pode ser realizada pelo método de imunofluorescência indireta, sendo que, a maioria dos casos diagnosticados, estão entre cães não vacinados e cães com relato de vacinação desconhecida. Entretanto, muitos

casos clínicos foram, também, diagnosticados em cães vacinados [Blixenkrone-Moller *et al.*, 1993].

Foi feito um estudo para demonstrar a resposta imune em cães vacinados, usando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). Este método foi desenvolvido e testado para análise de anticorpo IgG contra o VCC, em filhotes e comparado com um teste padrão, o de neutralização. Nesse estudo, foram avaliadas 10 ninhadas de 4 filhotes, sendo que 16% dos filhotes foram imunizados com uma vacina viva modificada, protegidos com sucesso contra o VCC, com 6 semanas de idade. Um filhote permaneceu soro-negativo após a vacinação, com 6 e 9 semanas de idade. Este é o primeiro relato de resposta à vacinação de filhotes, usando um "Kit" baseado em um ensaio imunoenzimático [Waner *et al.*, 1998].

A sorologia clássica para determinar a infecção causada pelo VCC proporciona dados de valores diagnóstico e prognóstico (cinética de soroconversão) e é, também, usada para predizer a idade ótima para vacinação de filhotes. A sorologia de rotina está, ainda, baseada no ensaio de neutralização do vírus. Foi demonstrada uma nova técnica de ensaio imunoenzimático do tipo, "capture-sandwich" (ELISA), que usa a proteína do nucleocapsídeo (N) expressada em baculovírus recombinante de um tipo selvagem isolado recentemente (2544/Han 95), para detecção de anticorpos específicos para VCC, em soro canino [von Messling *et al.*, 1999].

Foi realizado um estudo utilizando um ensaio "dot-blot" para detecção de anticorpos da classe IgM contra o VCC em soro canino. O diagnóstico foi avaliado pela análise do soro de 3 grupos testados: cães experimentalmente infectados com o VCC virulento, os quais mostraram níveis detectáveis de IgM específicos para VCC; cães imunizados com uma vacina combinada contendo VCC, os quais foram, também, positivos para IgM anti-VCC após a primeira imunização; e cães imunizados com uma vacina livre de VCC, como antígeno para o ensaio, utilizando a proteína do nucleocapsídeo (N) recombinante da cepa virulenta (A75/17), os quais permaneceram negativos no decorrer do experimento. A partir desses resultados, concluiu-se que, a detecção do anticorpo IgM requer somente uma

amostra de soro e é um método de diagnóstico útil para determinar infecção recente ou generalizada pelo VCC, em cães experimentalmente infectados ou imunizados [Barben *et al.*, 1999].

1.7.3. Diagnóstico Molecular

A técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido utilizada para o diagnóstico de muitas doenças infecciosas virais. Essa metodologia consiste na amplificação de seqüências específicas de DNA, o que confere maior sensibilidade na detecção de vários agentes virais, em materiais clínicos [Bellini *et al.*, 1986; Haas *et al.*, 1991; Rota *et al.*, 1995]. Shimizu *et al.* (1994), padronizou uma reação de RT-PCR para detecção de Morbilivírus. Nesse estudo, os autores, desenharam e otimizaram “primers” que amplificam uma região conservada para o gene da nucleoproteína, para detecção de diferentes Morbilivírus: VS, VPB e VCC.

Em 1995, foi realizado um estudo para a determinação de um método de diagnóstico rápido de infecção, pelo VCC. A reação de RT-PCR foi efetuada para detectar o gene da nucleoproteína desse vírus, em células mononucleares do sangue periférico. Duas séries de iniciadores “primers” foram alvo para 2 regiões do gene NP da cepa “Onderstepoort”. Os fragmentos desse gene foram bem amplificados pela reação de RT-PCR. O amplificado do gene NP foi detectado em 17 de 32 amostras de cães, que eram clinicamente suspeitos de infecção por VCC, em hospitais veterinários. Nenhum produto de RT-PCR foi encontrado em 52 amostras de cães saudáveis, incluindo 40 beagles vacinados, livres do patógeno específico, com uma vacina com vírus vivo atenuado para VCC. Assim conclui-se que a reação de RT-PCR proporciona um método seguro, sensível e suplementar para o diagnóstico da infecção em cães [Shin *et al.*, 1995].

Recentemente, infecções de outros Morbilivírus foram determinadas pela RT-PCR. Em um dos estudos, foi determinada, por essa técnica, a presença do gene da nucleoproteína em células mononucleares do sangue periférico de cães infectados com VCC. Para determinar a sensibilidade do método de PCR, foram feitas diluições do gene da NP da cepa “Onderstepoort” e das células Vero

infectadas com VCC, sendo ambas amplificadas. Os resultados mostraram que 200 cópias de DNA ou 1 célula infectada eram suficientes para detectar produto amplificado por hibridização "Southern blot". Esses resultados indicaram que uma única célula infectada, em que o VCC foi replicado, poderia ser detectada pelo método de RT-PCR. Nenhuma correlação entre os resultados dessa técnica e títulos de anticorpos neutralizantes foi observada [Shin *et al.*, 1995].

Análises de fragmentos de restrição foram usados para diferenciar tipos recentes do VCC de cepas vacinais. O genoma do vírus foi amplificado usando a RT-PCR para a proteína hemaglutinina. O produto de PCR do recente isolado foi cortado em 2 fragmentos que diferem da forma completa de cepas mais antigas, incluindo todas as cepas vacinais. Este método poderia ser aplicado em cérebro, baço e células mononucleares do sangue periférico de cães infectados. Essa pesquisa molecular é útil para determinar o agente causador da infecção pós-vacinal causada pelo VCC [Ohashi *et al.*, 1998].

Dados na literatura mostram-nos a inexistência de estudos mais completos relatando a excreção viral em animais doentes. Rota *et al.* (1995), utilizaram a técnica de RT-PCR para definir a frequência de excreção viral na urina de crianças, obtida após a vacinação contra o VS, sugerindo a utilidade desse método, tanto para o diagnóstico de casos assintomáticos de sarampo, como para estudos de transmissão viral. Lima (1999), avaliou e quantificou a excreção viral em linfócito, urina e saliva provenientes de crianças vacinadas contra o sarampo, utilizando o método de RT-PCR para RNA do mesmo, concluindo ser a saliva o espécime clínico de maior positividade na detecção do RNA viral, seguido pela urina e linfócitos, embora tenha encontrado excreção viral por períodos longos após a vacinação, em linfócitos.

O presente estudo, avaliando a excreção do VCC, por diferentes vias, em cães com sintomatologia clínica sugestiva de cinomose, poderá trazer uma contribuição relevante para maior compreensão da patogênese dessa virose.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

- Padronizar a técnica de RT-PCR para detecção do vírus da cinomose canina, a partir de materiais clínicos de cães suspeitos da doença.
- Verificar, através da técnica de RT-PCR, a presença do RNA viral no sangue circulante, analisando linfócitos, urina e saliva de animais com diagnóstico clínico de cinomose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras clínicas

Foram analisadas espécimes clínicas provenientes de 100 cães examinados no Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo (HOVET).

As amostras de sangue, urina e saliva foram colhidas sob a responsabilidade das Doutoradas: Marcia Mery Kogika, Vera A. Batistini Fortunato e Bruna Maria Pereira Coelho, como mostram a tabela 1 e o anexo 1.

Tabela 1- Número de espécimes clínicas colhidas (sangue, urina e saliva) de 100 animais, provenientes do HOVET, com sintomatologia sugestiva de cinomose.

<u>Amostra</u>	<u>Total</u>	<u>Porcentagem</u>
Sangue, urina e saliva	80	80%
Sangue e saliva	18	18%
Sangue	2	2%
Total	100	100%

As amostras foram colhidas durante o período de 25 de agosto de 1997 a 28 de outubro de 1998. Cada cão que chegava ao Hospital Veterinário passava pela triagem e era encaminhado ao ambulatório para coleta de sangue, urina e saliva para posterior estudo. Foram colhidas amostras clínicas de cães de idade e raça distintas, tendo como critério os seguintes sintomas: febre, conjuntivite, sintoma respiratório, diarreia, hiperqueratose dos coxins e focinho, anorexia, incontinência motora, mioclonias e convulsão. A colheita das amostras distribuídas dentro do período de um ano foi feita com o objetivo de observar-se a regressão ou evolução dos sintomas de cada cão, fazendo um acompanhamento clínico.

Essas amostras eram mantidas a 4°C, durante o transporte ao laboratório, e eram processadas no mesmo dia, sendo os soros estocados a -20°C para

posterior estudo sorológico, sendo o restante das amostras estocadas a -70°C , até o início da extração do RNA.

As amostras de sangue foram colhidas através de punção venosa (5 mL), utilizando-se tubos de vidro novos com anti-coagulante (heparina) e tampa de borracha, evitando assim, problemas de contaminação das amostras, durante o processamento das mesmas.

As amostras da primeira urina foram colhidas, utilizando-se sondas uretrais estéreis de tamanho proporcional ao porte do animal e colocadas em tubos de plástico estéreis de 15,0 mL, com tampa de rosca.

As amostras de saliva foram colhidas da cavidade oral, com o auxílio de uma zaragatoa e colocadas em tubos de microcentrífuga (eppendorfs) contendo 500 μL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M, pH 7.2 (PBS) estéril.

3.2. Processamento das amostras para o PCR

3.2.1. Sangue venoso total, para obtenção de soro

Após retração do coágulo e separação, por centrifugação, a uma rotação de 2000 x g durante 10 minutos, as amostras de soro foram aliquotadas em “eppendorfs” novos e estocadas a -20°C , até a realização das técnicas de Imunofluorescência Indireta, para detecção de anticorpos específicos ao vírus da cinomose, para posterior estudo.

3.2.2. Linfócitos

As células mononucleares (linfócitos) foram separadas do sangue venoso heparinizado, por sedimentação, utilizando Ficcol Hypaque (Organon Teknika). Os tubos de sangue com anti-coagulante eram abertos em um fluxo laminar, após assepsia e esterilização do mesmo, para evitar possível contaminação. Acrescentava-se PBS para diluir o sangue (volume/volume). Após homogeneização, esse sangue era passado no Ficcol, vagarosamente, para evitar

refluxo; ao término, os tubos eram fechados e centrifugados a uma rotação de 1250 x g, durante 30 minutos. O Ficcol, junto com o plasma, eram desprezados e era feita a colheita do anel de linfócitos. Esse anel de linfócitos era colocado em um outro tubo de plástico estéril e acrescentava-se PBS para lavagem das células, centrifugando-se a uma rotação de 1200 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante era desprezado e o anel ressuspenso com novo PBS, sendo feitas 3 lavagens nas células, para exclusão total do Ficcol. Após essa fase, o botão de células foi ressuspenso com 1,0 mL de meio RPMI 1640 estéril, sendo que 500 µL dessas células foram guardadas em tubos Nalgene, com tampa de rosca, acrescentando-se uma solução de estocagem de 500 µL de glicerina e soro fetal bovino (SFB), na proporção de 1:10, para conservação da membrana celular. Aos outros 500 µL de células, foram adicionados 500 µL de Trizol (Gibco-BRL), volume a volume, estocando-os a -70°C, até o momento da extração do RNA. As células com a solução de estocagem foram guardadas em tambores com nitrogênio líquido, para melhor conservação das partículas virais.

3.2.3. Urina

Depois de colhidas, as amostras de urina foram mantidas a 4°C, até o momento do transporte ao laboratório. Foram centrifugadas a 2600 x g, durante 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante desprezado, e o sedimento lavado uma vez, com PBS, a uma rotação de 2600 x g, durante 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 500µL de Trizol, sendo estocadas a -70°C, até o início da extração do RNA.

3.2.4. Saliva

Depois de colhidas, as amostras de saliva foram mantidas a 4°C, até serem transportadas ao laboratório. Posteriormente, foram adicionados 500µL de Trizol e congeladas a -70°C, até momento de uso (para PCR). Todo esse manuseio, com todas as amostras, foi feito no fluxo laminar, evitando-se possíveis contaminações.

3.2.5. Preparo das amostras para PCR

Para evitar resultados falso-positivos, através da contaminação pelo produto amplificado, o espaço físico do laboratório foi totalmente remodelado, com a utilização de 2 fluxos laminares apropriados, um para extração do ácido nucleico e outro para o preparo da reação de PCR, sendo um terceiro fluxo laminar destinado a uma outra área de serviço para manipulação do produto amplificado (pós-PCR). Para cada espaço físico, foi utilizado um jogo de pipetas automáticas, minimizando, desta forma, a contaminação entre os 3 ambientes.

Foi estabelecido, também, o critério de se processar 10 amostras de cada vez, mais 2 amostras de controle, sendo um controle negativo e o outro positivo. Como controle negativo, foi utilizada água altamente purificada (Sistema Milli-Q, Millipore), isenta de inibidores que poderiam impedir a amplificação de produtos contaminantes de PCR. O controle positivo consistiu de uma cepa selvagem do vírus da cinomose, adaptada em células B 95, gentilmente cedida pelo Dr. Paul Rota, do Center for Disease Control and Prevention-CDC, Atlanta-Georgia, USA.

3.3. Reação de PCR

3.3.1. Extração

Após descongelamento das amostras com Trizol, procedeu-se a continuidade da extração de RNA, feita em banho de gelo, de acordo com o protocolo descrito a seguir:

Foram colocados 500 μ L do material (linfócito, urina ou saliva) em um "eppendorf" e acrescentou-se 500 μ L de Trizol. Foram adicionados 200 μ L de clorofórmio-isoamil e, após homogeneização em agitação durante 15 segundos, incubou-se em gelo, por 5 minutos, sendo centrifugados a uma rotação de 12000 x g a 4°C, durante 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante obtido da fase superior foi coletado e precipitado, volume a volume, com isopropanol e incubado

em gelo durante 15 minutos. A mistura, novamente centrifugada a 12000 x g, durante 15 minutos, o sobrenadante desprezado e o sedimento lavado com 800 μ L de etanol (75%). O sedimento, agitado vigorosamente e centrifugado a 7500 x g, a 4°C, por 8 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Finalmente, o sedimento foi seco e dissolvido em 30 μ L de EDTA 1mM, pH 7,0. A extração foi guardada em freezer, a -70°C.

O mesmo procedimento foi realizado com a célula B95 infectada com o vírus padrão.

3.3.2. "Primers"

Para a detecção do genoma do VCC, foram usados os iniciadores "primers" que se ligam à região altamente conservada, entre as bases 746 e 1082 que codificam o gene nucleoproteína, segundo a metodologia descrita por Shimizu *et al.* (1994); com algumas modificações, referentes aos "primers" RMBV1 e RMBV32, que foram re-delineados para se adequar as seqüências do VCC.

Foram utilizados os "primers" RMBV1 e RMBV3, RMBV2 e RMBV32 na região 5' durante a síntese, com a seguinte seqüência:

"Primers"		Locação (RNA)	Seqüência "Primers"	Produto Amplificado
PCR	RMBV1	(1167-1189)	AAGCTGGGTCAAAGTAAGATCG	336pb
	RMBV3	(853-875)	GAATTGCTGAAATGATTTGTGAT	
Nested-PCR	RMBV2	(930-952)	TTTGGCATTGAAACTATGTATCC	234pb
	RMBV32	(1145-1164)	CGAAACCCAACCCTCCCATG	

3.3.3. cDNA

A partir do RNA extraído foi feito um cDNA, utilizando Transcriptase Reversa na seguinte mistura da reação: 20,0 μ L de tampão 2x concentrado, 1,0 μ L de inibidor de Rnase (10U/ μ L), 6,0 μ L de dNTP (10pM/ μ L), 5,0 μ L do “primer” RMBV1 (10pM/ μ L), 1,0 μ L de Transcriptase Reversa (200U/ μ L), 4,0 μ L de DTT (detergente-0,1M) e 5,0 μ L do RNA extraído. Distribuiu-se 42,0 μ L do preparo em cada “ependorf” e acrescentou-se os 5,0 μ L da respectiva amostra.

A mistura da reação foi incubada por 60 minutos a 42°C e guardada em freezer a -70°C.

3.3.4. Amplificação do cDNA (PCR)

Para reação de PCR fez-se a seguinte mistura: 50,5 μ L de H₂O Milli-Q estéril, 3,0 μ L de MgCl₂ (50mM), 16,0 μ L de dNTP (1.5mM), 10,0 μ L de tampão de PCR 10x concentrado, 5,0 μ L do “primer” RMBV1, 5,0 μ L do “primer” RMBV3, 0,5 μ L de Taq Polimerase (5U/ μ L) e, por último, 10,0 μ L da amostra (cDNA). Acrescentou-se 25,0 μ L de óleo mineral, para evitar possível evaporação da amostra. Após a mistura, o material foi colocado em um Termociclador automático “M J Research” a 94°C, por 5 minutos (para inativar a RT), seguidos de 39 ciclos de 94°C, por 1 minuto (para denaturação das fitas de DNA); 55°C por 1 minuto (para anexamento, “annealing” dos “primers”) e 72°C por 1 minuto (para extensão das fitas), seguido de 72°C por 5 minutos (para completar as extensões das fitas). Ao término, as amostras foram guardadas a 4°C.

3.3.5. Nested-PCR

Para reação de Nested-PCR fez-se a seguinte mistura: 50,5 μ L de H₂O Milli-Q estéril, 3,0 μ L de MgCl₂ (50mM), 16,0 μ L de dNTP (1.5mM), 10,0 μ L de tampão de PCR 10x concentrado, 5,0 μ L do “primer” RMBV2, 5,0 μ L do “primer”

RMBV32, 0,5 μ L de Taq Polimerase (5U/ μ L) e, por último, 10,0 μ L da amostra (PCR). Acrescentou-se 25,0 μ L de óleo mineral, para evitar possível evaporação da amostra. Após a mistura, o material foi colocado em um Termociclador automático "M J Research" a 94°C, por 5 minutos (para inativar a RT), seguidos de 39 ciclos de 94°C, por 1 minuto (para denaturação das fitas de RNA); 48°C por 1 minuto (para anexamento, "annealing" dos "primers") e 72°C por 1 minuto (para extensão das fitas), seguido de 72°C por 5 minutos (para completar as extensões das fitas). Ao término, as amostras foram estocadas a 4°C.

3.3.6. Visualização dos produtos amplificados de PCR e Nested-PCR

Os produtos de PCR e Nested-PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão TBE (Tris Borato EDTA-Gibco BRL) 1,0x concentrado (89mM de Tris; 89mM de Ácido bórico; 2,0mM de Na₂ EDTA, pH 8,0-Gibco BRL). Adicionou-se ao tampão um corante (brometo de etídio- 10mg/mL; utilizando-se 5,0 μ L/100,0mL do tampão) e, junto com a amostra, colocou-se o corante azul de bromofenol (2,0 μ L/5,0 μ L da amostra). A eletroforese foi realizada sob uma corrente de 100 mA, durante, aproximadamente, 40 minutos. Em seguida, os fragmentos amplificados foram visualizados em transluminador de ultra-violeta.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Para a padronização das técnicas de PCR e Nested-PCR foi utilizado o vírus padrão da cinomose canina, inoculado em células B95. A reação de RT-PCR, utilizando os “primers” RMBV1 e RMBV3, amplificou um produto de 336 bp. Quando o produto de PCR foi re-amplificado pela reação de Nested-PCR, utilizando os “primers” internos RMBV2 e RMBV32, obteve-se uma amplificação de 234 bp, como mostra a figura 1.

Padronização da técnica de RT-PCR.

Figura 1: Detecção do produto amplificado pelas reações de RT-PCR e Nested-PCR, em gel de agarose, corado pelo brometo de etídio. Linha 1: produto amplificado pela reação de RT-PCR, evidenciando uma banda de 336 bp. Linha 2: produto amplificado pela reação de Nested-PCR, evidenciando uma banda de 234 bp. Linha 3: controle negativo da reação de RT-PCR, utilizando água. Linha 4: controle negativo da reação de Nested-PCR. Linha 6: marcador de peso molecular (PM).

A figura 2 mostra o resultado da reação de Nested-PCR de amostras positivas de linfócitos e urina, colheitadas de cães com sintomatologia clínica de cinomose canina, provenientes do HOVET.

Figura 2: Detecção do produto de Nested-PCR, em gel de agarose, corado pelo brometo de etídio. Na parte superior (gel 1) são amostras de linfócitos: 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 32 - 33 - 36 - 38 - 40 - 41 - 45 - 46 - controle positivo (célula B95 infectada com vírus selvagem-produto de PCR) - controle negativo (H₂O) - PM (Marcador de Peso Molecular), respectivamente. Na parte inferior (gel 2) são amostras de urina: 26 - 27 - 28 - 29 - 30 - 31 - 33 - 38 - 40 - 41 - 45 - controle positivo (célula B95 infectada com vírus selvagem-produto de PCR) - controle negativo (H₂O) - PM (Marcador de Peso Molecular).

4.1. Detecção do RNA viral em amostra clínica

As amostras de sangue, urina e saliva, provenientes dos 100 cães estudados, foram testadas para cinomose canina, utilizando-se a técnica de RT-PCR. Observou-se que 43 amostras de sangue e 49 de urina reagiram positivamente, enquanto que somente 18 foram positivas nas amostras de saliva (tabela 2, anexo 2).

Tabela 2- Resultado de PCR para diagnóstico da cinomose canina com “primers” específicos em amostras clínicas de sangue, urina e saliva de 100 cães com sintomatologia sugestiva de cinomose, atendidos no HOVET.

<u>Resultado/PCR</u>	<u>sangue</u>	<u>urina</u>	<u>saliva</u>	<u>Total</u>
Positivo	43	49	18	110
Negativo	52	31	80	163
NR*/NR**	05*	20**	02**	27

*NR: não realizado

**NR: não colheitado

Da totalidade das amostras positivas (110), pela reação de Nested-PCR, 6 amostras apresentaram positividade pela reação de PCR, como mostra a figura 3.

Figura 3- Comparação da reação de PCR e Nested-PCR para detecção de RNA viral em amostras clínicas (sangue, urina e saliva), provenientes dos animais estudados.

Em alguns animais foi possível observar-se reação positiva em apenas um material biológico (sangue, urina ou saliva), enquanto em outros houve reação positiva em mais de um material biológico.

Na tabela 3 e figura 4 encontram-se relacionadas as amostras positivas, segundo o material clínico, entre os animais que haviam sido vacinados.

A frequência de reações positivas entre os animais não vacinados foi maior do que a frequência entre os animais vacinados. Observa-se também que a porcentagem de concordância, tanto em animais vacinados quanto não vacinados, foi maior na urina e linfócito do que na saliva.

Tabela 3- Animais vacinados e não vacinados considerados positivos para detecção do RNA do VCC, pela técnica de RT-PCR.

RNA Viral						
Resultado/ Diagnóstico clínico	Linfócito		Urina		Saliva	
	Vac.	Não vac.	Vac.	Não vac.	Vac.	Não Vac.
Concordantes						
Pos/Pos	13	28	15	32	04	12
Neg/Neg	00	00	00	00	00	00
Discordantes						
Pos/Neg	05	12	03	08	14	28
Neg/Pos	00	00	00	00	00	00
Total	18	40	18	40	18	40
% Concordância	72.3%	70.0%	83.3%	80.0%	22.2%	30.0%
%Discordância	27.7%	30.0%	16.7%	20.0%	77.8%	70.0%

A figura 4 representa a frequência de animais vacinados e não vacinados pela técnica de RT-PCR.

Figura 4- Frequência de animais vacinados e não vacinados considerados positivos para detecção do RNA DO VCC pela técnica de RT-PCR.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O VCC tem causado epidemias em várias partes do mundo, em muitas espécies susceptíveis, ocasionando mortalidade e morbidade a esses animais.

A doença causada pela infecção do VCC tem sido controlada por muitos anos com o uso de vacinas com vírus vivo atenuado. Entretanto, muitos casos de cinomose canina tem ocorrido no Japão. Esse vírus atua em células linfóides e a indução de imunossupressão agrava a doença, permitindo que infecções secundárias se estabeleçam. A infecção, muitas vezes, induz uma doença fatal, em cães [Mori *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1995].

No presente estudo, foi feita uma pesquisa usando a técnica de RT-PCR para diagnosticar o VCC, em cães com sintomatologia sugestiva da doença. Foram analisados 100 cães, sendo colhidas amostras de sangue, urina e saliva, respectivamente.

Recentes avanços em detecção molecular da sequência do ácido nucleico viral tem facilitado a pesquisa de viroses patogênicas em amostras clínicas. O desenho dos iniciadores “primers” deve ser baseado em seqüências conhecidas (regiões altamente conservadas) do genoma viral. O alinhamento das seqüências para os genes da nucleoproteína e matrix sugerem uma região altamente conservada como alvo para amplificação do gene [Shimizu *et al.*, 1994].

Em nosso estudo, foi evidenciada a presença do gene da nucleoproteína (NP) pela técnica de RT-PCR em células mononucleares do sangue periférico, urina e saliva de cães infectados, com VCC, discutindo a vantagem do método de diagnóstico. A técnica de RT-PCR descrita, neste estudo, pode ser um ensaio útil para determinar se cães suspeitos de infecção, pelo vírus, apresentam níveis detectáveis de genes NP. Os resultados demonstraram a vantagem dessa técnica para suplementar outros métodos de diagnóstico laboratorial.

Para esse propósito, foram utilizados pares de “primers”, os quais foram escolhidos do gene da nucleoproteína, por ser uma região altamente conservada, o qual amplificou, com sucesso, o VS, o VCC e o VCF. O método de RT-PCR estabelece um método simples, rápido e altamente sensível de detecção e

identificação de seqüências genômicas de RNA [Saiki *et al.*, 1988; Godec *et al.*, 1990].

De acordo com Oglesbee *et al.* (1986; 1989); o isolamento do VCC, em cultura celular, poderia ser um caminho efetivo para determinar a infecção, entretanto, o isolamento do vírus leva muitos dias e/ou semanas. No estudo desses autores, foi possível a identificação do gene NP usando o método de RT-PCR com dois pares de "primers" específicos. Foi determinado que, pelo menos, 200 cópias do cDNA (NP) ou uma célula Vero infectada, com VCC, são necessárias para obter uma quantidade de produto amplificado. Considerando que a proteína NP é o componente mais abundante do nucleocapsídeo, do vírus, é possível que uma única célula infectada possa ser detectada pelo método de RT-PCR.

Em nosso estudo, a capacidade de detecção do RNA viral em espécimes clínicos necessitou do uso de uma segunda amplificação, utilizando a técnica de Nested-PCR, a qual foi escolhida para realização deste trabalho, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, do teste para 100 vezes mais, detectando quantidades mínima de partículas virais do VCC nos materiais analisados, RT-PCR seguida pela Nested.

Nesta pesquisa, embora no histórico de vacinação não foram fornecidas as informações quanto ao tipo de vacina utilizada e o esquema de vacinação, obtivemos um total de 36 cães que foram submetidos a uma história de vacinação, 18 animais confirmaram positividade pelo método de RT-PCR e 18 foram considerados negativos, pelo mesmo método. Dos 18 animais que apresentaram história de vacinação; 4 deles excretaram o vírus pela urina; 3 pelo linfócito; 1 pela urina e saliva; 7 pelo linfócito e urina e 3 pelo linfócito, urina e saliva [Anexo 3]. Foi observado que os animais adoeceram ou não em função da vacina, se bem imunizados, a vacina falhou ou não foram bem imunizados. Resumindo nossas observações, cães vacinados ou não vacinados, apresentaram positividade pela técnica de RT-PCR, como também, cães vacinados apresentaram negatividade pela mesma técnica. É provável, já que os animais são todos sintomáticos, que tenham adquirido a infecção natural, por serem, ainda, susceptíveis, a despeito da

menção de terem sido vacinados. Uma vez que o número de animais considerados positivos foi menor no grupo de vacinados, o que pode significar infecção mais branda, devido a imunidade parcial.

De acordo com o trabalho de Shin *et al.* (1995); a possibilidade de detectar vírus vacinal, em amostras clínicas, é considerado pequena, porque foram obtidas amostras de 3 cães vacinados, após 7 dias da vacinação, o gene NP, foi detectado nas amostras desses cães, mas não foi detectado em 14 e 21 dias pós vacinação. Esse resultado mostra que o vírus vacinal pode ser excretado até 7 dias pós vacinação, utilizando a técnica de RT-PCR. Em adição, 2 cães vacinados dentro de 1 mês antes da colheita da amostra foram negativos, para VCC, pela técnica de RT-PCR. De acordo com o trabalho, esses resultados indicam que essa técnica é específica para doença causada pelo VCC. Appel (1977), sugeriu que a replicação do vírus vacinal seja restrita aos tecidos linfáticos, em cães [Blixenkrone-Moller, 1989].

Dos 60 animais que não apresentaram nenhum tipo de estória de vacinação, 40 deles foram considerados positivos pelo mesmo método e 20 animais foram considerados negativos, confirmando desta forma, que o vírus excretado era do tipo selvagem.

Dos 61 animais considerados positivos pelo método de RT-PCR, 44 deles apresentaram sintomas neurológicos, tais como: convulsão, tremores, incoordenação/mioclonia, apenas incoordenação, apenas mioclonia e paresia de membros pélvicos. Sendo que 17 animais não foram obtidas informações desses sintomas. Dos 18 animais vacinados, 14 deles apresentaram sintomas neurológicos [Anexo 3].

No estudo de Shin *et al.*, (1995), foi examinada a presença do gene NP, em células mononucleares do sangue periférico, de 52 cães saudáveis e 32 cães suspeitos de cinomose canina, pela técnica de RT-PCR. Nenhum produto foi detectado nos cães saudáveis, indicando que a técnica de RT-PCR não mostrou nenhuma reação falso-positiva. O gene NP foi detectado em 17 das 32 amostras clínicas suspeitas.

De acordo com dados da literatura, os cães mais jovens são mais susceptíveis ao VCC. Dos 61 animais que apresentaram positividade pelo método de Nested-PCR; 51 deles apresentaram sintomas como a conjuntivite; 31 com quadro respiratório; 26 com problema digestivo e 18 com sintoma febril; 44 com sinais de comprometimento do SNC, sendo que em 17 cães não foram detectados distúrbios neurológicos [Anexo 3].

Na tabela 3 podemos observar que 107 amostras, incluindo sangue, urina e saliva, respectivamente, foram consideradas positivas, usando o método de Nested-PCR, enquanto que, o método de PCR, detectou-se em apenas 06 amostras clínicas, confirmando desta forma, que a reação de Nested-PCR, mostrou-se mais sensível e específica.

Ao examinarmos a tabela 2 (índice de positividade em amostras clínicas) encontramos 49 amostras de urina consideradas positivas, pela técnica de RT-PCR, seguida de 43 de linfócitos e 18 de saliva. Entre os diferentes espécimes clínicos estudados em cães, a urina teve o maior índice de positividade de RNA viral encontrada por esse método.

No estudo de Rota *et al.* (1995), obtiveram maior positividade na detecção do RNA viral, também, em urina de crianças vacinadas aos 15 meses. Nesse estudo, o RNA viral foi detectado em 10 das 12 crianças estudadas em um período de 14 dias. Os autores utilizaram a técnica de imunoquimioluminescência, pelo método de "Southern blot" com o uso de "primers" internos marcados com digoxigenina, com uma alta sensibilidade e especificidade comparada ao Nested-PCR.

Lima (1999), detectou o vírus do sarampo em amostras de urina de crianças após a imunização específica, embora a maior frequência de positividade tenha sido observada na saliva. Esses dados poderiam ser explicados, devido ao longo período de estocagem dos espécimes clínicos, antes de completar o processo de extração. Na literatura, muitos trabalhos que estudam a excreção viral em espécimes clínicos foram realizados com amostras frescas, o que ocorreu em nosso estudo. No estudo de Lima (1999), os espécimes foram conservados durante períodos de até 2 anos a -70°C em Trizol, não sendo possível avaliar a

degradação de RNA ocorrida nos espécimes clínicos congelados. De acordo com um trabalho de epidemiologia molecular de Kreis & Schoub (1998), em amplificação viral em soros e líquidos cerebroespinhais, não foi possível a amplificação devido a degradação de RNA na maioria das amostras estocadas por longos períodos. O fato de termos obtido maior êxito na detecção viral na urina dos cães com sintomatologia de cinomose, indica ser este o material clínico de excelência para o diagnóstico etiológico da infecção, seguido de sangue periférico.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste estudo, concluiu-se que:

- A metodologia descrita para detecção do VCC, pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR), utilizando amostras clínicas de cães com sintomatologia sugestiva da doença, mostrou ser mais sensível, específica, rápida e de fácil execução, sendo possível a implantação desta em diagnóstico de rotina, contribuindo de maneira significativa na confirmação da suspeita clínica.
- Foi demonstrado, pela técnica de RT-PCR, na detecção do RNA viral que a urina foi o espécime clínico de maior índice de positividade, seguido pelo linfócito e saliva.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- ALLEMAN, A. R.; CHRISTOPHER, M. M.; STEINER, D. A. & HOMER, B. L. – Identification of Intracytoplasmic Inclusion Bodies in Mononuclear Cells from the Cerebrospinal Fluid of a Dog with Canine Distemper. **Vet. Pathol.**, **29**: 84-5, 1992.
- ANDERSON, E. C. –Morbillivirus infections in wildlife in relation to their population biology and disease control in domestic animals. **Vet. Microbiol.**, **44 (2-4)**: 319-32, 1995.
- APPEL, M.J.G. -Pathogenesis of Canine Distemper. **Am. J. Vet. Res.**, **30**: 1167-82, 1969.
- APPEL, M.J.G. -Distemper Pathogenesis in Dogs. **J.A.V.M.A.**, **156**: 1681-3, 1970.
- APPEL, M.J.G. & GILLESPIE, J. H. –Virology Monographs. New York Wien: Springer-Verlag, 1972. p. 03-96.
- APPEL, M.J.G. -Virus infections of carnivores. New York: Elsevier Science Publishers, 1987. p. 133-59.
- APPEL, M. J.; PEARCE-KELLING, S.; & SUMMERS, B. A. –Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. **J. Vet. Diagn. Invest.**, **4 (3)**: 258-63, 1992.
- APPEL, M. J. G. & SUMMERS, B. A. –Pathogenicity of Morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Vet. Microbiol.**, **44 (2-4)**: 187-91, 1995.
- BAKER, J. A. –Measles Vaccine for Protection of Dogs Against Canine Distemper. **J.A.V.M.A.**, **156 (12)**: 1743-6, 1970.

- BARBEN, G.; STETTLER, M.; JAGGY, A.; VANDEVELDE, M. & ZURBRIGGENIA. – Detection of IgM antibodies against a recombinant nucleocapsid protein of canine distemper virus in dog sera using a dot-blot assay. **Zentralbl. Veterinarmed A.**, **46 (2)**: 115-21, 1999.
- BELL, S. C.; CARTER, S. D. & BENNETT, D. –Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. **Res. Vet. Sci.**, **50 (1)**: 64-8, 1991.
- BELLINI, W.J.; ENGLUND, G.; RICHARDSON, C.D.; ROZENBLATT, S.; & LAZZARINI, R.A. –Matrix Genes of Measles Virus and Canine Distemper Virus: Cloning, Nucleotide Sequences, and Deduced Amino Acid Sequences. **J. Virol.**, **58 (2)**: 408-16, 1986.
- BLIXENKRONE-Moller, M. –Detection of intracellular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. **Am. J. Vet. Res.**, **50 (9)**: 1616-20, 1989.
- BLIXENKRONE-Moller, M. –Biological properties of phocine distemper virus and canine distemper virus. **A. P. M. I. S. (suppl. 36)**: 01-51, 1993.
- BLIXENKRONE-Moller, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I. R.; DIETZ, H. H. & HENRIKSEN, P. –Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Vet. Microbiol.**, **37 (1-2)**: 163-73, 1993.
- BUSH, M.; MONTALI, R. J.; BROWNSTEIN, D.; JAMES, A. E. J. & APPEL, M. J. G. – Vaccine- Induced Canine Distemper in a Lesser Panda. **J.A.V.M.A.**, **169 (9)**: 959-60, 1976.
- BUXTON, A. & FRASER, G. –Animal Microbiology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. v. 2. p. 533-48.

- CARPENTER, M. A.; APPEL, M. J.; ROELKE-PARKER, M. E.; MUNSON, L.; HOFER, H.; EAST, M. & O'BRIEN, S. J. –Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **65 (2-4)**: 259-66, 1998.
- CARRÉ, M. H. –Sur la Maladie des jeunes chiens. **C. R. Acad. Sci. Paris**, **140**: 689-90, 1905.
- CARTWRIGHT, E.J.; GORDON, M.T.; FREEMONT, A.J.; ANDERSON, D.C. & SHARPE, P.T. –Paramyxoviruses and Paget's Disease. **J. Med. Virol.**, **40**: 133-41, 1993.
- CHALMERS, W. S. K. & BAXENDALE, W. –A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for the prevention of canine distemper in young puppies. **Vet. Rec.**, **135**: 349-53, 1994.
- COOK, S.D.; DOWLING, P.C. & RUSSELL, W.C. –Multiple Sclerosis and Canine Distemper. **Lancet**, **1**: 605-6, 1978.
- CORNWELL, H. J. C.; CAMPBELL, R. S. F.; VANTSIS, J. T. & PENNY, W. –Studies in Experimental Canine Distemper. **J. Comp. Path.**, **75**: 03-17, 1965.
- CURRAN, M. D.; CLARKE, D. K. & RIMA, B. K. –The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus. **J. Gen. Virol.**, **72**: 443-7, 1991.
- CURRAN, M. D.; O' LOAN, D.; KENNEDY, S. & RIMA, B. K. –Molecular characterization of phocine distemper virus: gene order and sequence of the gene encoding the attachment (H) protein. **J. Gen. Virol.**, **73 (Pt 5)**: 1189-94, 1992.
- DIALLO, A. –Morbillivirus group: genome organization and proteins. **Vet. Microbiol.**, **23 (1-4)**: 155-63, 1990.

- DITERS, R. W. & NIELSEN, S. W. –Toxoplasmosis, Distemper, and Herpesvirus Infection in a Skunk (*Mephitis mephitis*). **J. Wildlife Dis.**, **14**: 132-6, 1978.
- DURCHFELD, B.; BAUMGÄRTNER, W.; HERBST, W. & BRAHM, R. – Vaccine-associated Canine Distemper Infection in a Litter of African Hunting Dogs (*Lycaon pictus*). **J. Vet. Med.**, **37**: 203-12, 1990.
- EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U. & NUOTIO, L. – Outbreak off canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Vet. Rec.**, **141 (15)**: 380-3, 1997.
- EVANS, M. B.; BUNN, T. O.; HILL, H. T. & PLATT, K. B. –Comparison of in vitro replication and cytopathology caused by strains of canine distemper virus of vaccine and field origin. **J. Vet. Diagn. Invest.**, **3 (2)**: 127-32, 1991.
- FENNER, F.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J. & WHITE, D. O. -Veterinary Virology. Academic Press, 1993. v.2. p. 471-85.
- GALINSKI, M. S. –Paramyxoviridae: Transcription and Replication. **Advances in Virus Res.**, **39**: 129-62, 1991.
- GEERING, W. A. –Canine Distemper. **Aust. Vet. J.**, **43 (12)**: 600, 1967.
- GODEC, M. S.; ASHER, D. M.; SWOVELAND, P. T.; ELDADAH, Z. A.; FEINSTONE, S. M.; GOLDFARB, L. G.; GIBBS, C. J. Jr. & GAJDUSEK, D. C. –Detection of Measles Virus Genomic Sequences in SSPE Brain Tissue by the Polymerase Chain Reaction. **J. Med. Virol.**, **30**: 237-44, 1990.
- GORDON, M.T.; BELL, S. C.; MEE, A. P.; MERCER, S.; CARTER, S. D. & SHARPE, P. T. –Prevalence of Canine Distemper Antibodies in the Pagetic Population. **J. Med. Virol.**, **40**: 313-17, 1993.

- GORET, P. –Experimental Studies upon the Canine Distemper Virus: Variations in Virulence and their Relation to the Symptomatology and Prophylaxis of the Disease. **Vet. Rec.**, **62 (6)**: 67-71, 1950.
- GREENE, C. E. & BRAUND, K. G. –Diseases of the brain In: Ettinger, S. J. (eds): Textbook of Veterinary Internal Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1989, p. 578-23.
- GREENE, C. E. & APPEL, M. J. –Canine Distemper. Philadelphia: W. B. Saunders, 1990. p. 226-40.
- GREENE, C. E. & APPEL, M. J. –Canine Distemper. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. v. 2. p. 09-22.
- HAAS, L.; SUBBARAO, S. M.; HARDER, T.; LIESS, B.; & BARRETT, T. -Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay: genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. **J. Gen. Virol.**, **72 (4)**: 825-32, 1991.
- HIRAYAMA, N.; SENDA, M.; KURATA, K.; YOSHIKAWA, Y. & YAMANOUCHI, K. – Requirement of Methionine for the Replication of Canine Distemper Virus in Vero Cells. **J. Gen. Virol.**, **66**: 149-57, 1985.
- HIRAYAMA, N.; SENDA, M.; YAMAMOTO, H.; KURATA, K.; YOSHIKAWA, Y. & YAMANOUCHI, K. –Comparison of biological and molecular properties among canine distemper virus strains. **Nippon Juigaku Zasshi**, **48 (2)**: 259-65, 1986.
- IWATSUKI, K.; OKITA, M.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; SHIN, Y. S.; MIYASHITA, N.; MIKAMI, T. & KAI, C. –Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. **J. Comp. Pathol.**, **113 (2)**: 185-90, 1995.

- KAI, C.; OCHIKUBO, F.; OKITA, M.; IINUMA, T.; MIKAMI, T.; KOBUNE, F. & YAMANOUCHI, K. –Use of B95a Cells for Isolation of Canine Distemper Virus from Clinical Cases. **J. Vet. Med. Sci.**, **55 (6)**: 1067-70, 1993.
- KREIS, S. & SCHOUB, B. D. –Partial amplification of the measles virus nucleocapsid gene from stored sera and cerebrospinal fluids formolecular epidemiological studies. **Med. Virol.**, **56**: 174-77, 1998.
- LAIDLAW, P. P. & DUNKIN, G. W. –Studies in Dog Distemper. **J. Comp. Pathol. and Ther.**, **19**: 209-27, 1928.
- LAMB, R. A. & KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: -The Viruses and Their Replication In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds): Fundamental Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 577-604.
- LIMA, L. R. A. V. –Avaliação da Resposta Imune da excreção viral em crianças vacinadas contra o sarampo. São Paulo, 1999 (Tese de Doutorado-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
- LITTLE, S. E.; DAVIDSON, W. R.; HOWERTH, E. W.; RAKICH, P. M. & NETTLES, V. F. –Diseases Diagnosed in Red Foxes from the Southeastern United States. **J. Wildlife Dis.**, **34 (3)**: 620-24, 1998.
- LÖFFLER, S.; LOTTSPEICH, F.; LANZA, F.; AZORSA, D. O.; MEULEN, V. T. & SCHAULIES, J. S. –CD9, a Tetraspan Transmembrane Protein, Renders Cells Susceptible to Canine Distemper Virus. **J. Virol.**, **71 (1)**: 42-9, 1997.
- LOVE, D. N. –Review of canine viral disease. **Aust. Vet. J.**, **48 (10)**: 567-70, 1972.
- LYONS, C.; WELSH, M. J.; THORSEN, J.; RONALD, K. & RIMA, B. K. –Canine distemper virus isolated from a captive seal. **Vet. Rec.**, **132**: 487-8, 1993.

- MAEDA, H.; OZAKI, K.; TAKAGI, Y.; SAWASHIMA, K. & NARAMA, I. –Distemper Skin Lesions in a Dog. **J. Vet. Med.**, **41**: 247-50, 1994.
- MAINKA, S. A.; XIANMENG, Q.; TINGMEI, H. & APPEL, M.J.G. –Serologic Survey of Giant Pandas (*Ailuropoda melanoleuca*), and Domestic Dogs and Cats in the Wolong Reserve, China. **J. Wildlife Dis.**, **30** (1): 86-9, 1994.
- MARSILIO, F.; TISCAR, P. G.; GENTILE, L.; ROTH, H. U.; BOSCAGLI, G.; TEMPESTA, M. & GATTI, A. –Serologic Survey for Selected Viral Pathogens in Brown Bears from Italy. **J. Wildlife Dis.**, **33** (2): 304-7, 1997.
- MEE, A. P. & SHARDE, P. T. –Dogs, distemper and Paget's disease. **Bioessays**, **15** (12): 783-9, 1993.
- MEE, A. P.; DIXON, J. A.; HOYLAND, J. A.; DAVIES, M.; SELBY, P. L.; MAWER, E. B. –Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Bone**, **23** (2): 171-5, 1998.
- MITCHELL, W. J.; RUSSELL, S. E. H.; CLARK, D. K.; RIMA, B. K. & APPEL, M. J. – Identification of negative strand and positive strand RNA of canine distemper virus in animal tissues using single stranded RNA probes. **J. Virol. Methods**, **18**: 121-31, 1987.
- MOLLER, M. B.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I. R.; DIETZ, H. H. & HENRIKSEN, P. –Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Vet. Microbiol.**, **37**: 163-73, 1993.
- MORI, T.; SHIN, Y. S.; OKITA, M.; HIRAYAMA, N.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C. & MIKAMI, T. –The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. **J. Gen. Virol.**, **75**: 2403-8, 1994.
- MURPHY, F. A. –Virus Taxonomy In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (eds): Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, p. 15-57.

- NORRBY, E.; UTTER, G.; ÖRVELL, C. & APPEL, M. J. G. –Protection against Canine Distemper Virus in Dogs after Immunization with Isolated Fusion Protein. **J. Virol.**, **58 (2)**: 536-41, 1986.
- OGLESBEE, M.; JACKWOOD, D.; PERRINE, K.; AXTHELM, M.; KRAKOWKA, S. & RICE, J. –In vitro detection of canine distemper virus nucleic acid with a virus-specific cDNA probe by dot-blot and in situ hybridization. **J. Virol. Methods**, **14**: 195-211, 1986.
- OGLESBEE, M.; TATALICK, L.; RICE, J. & KRAKOWKA, S. –Isolation and Characterization of Canine Distemper Virus Nucleocapsid Variants. **J. Gen. Virol.**, **70 (Pt 9)**: 2409-19, 1989.
- OHASHI, K.; IWATSUKI, K.; NAKAMURA, K.; MIKAMI, T. & KAI, C. –Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length polymorphism. **J. Vet. Med. Sci.**, **60 (11)**: 1209-12, 1998.
- PALMER, D. G.; HUXTABLE, C. R. & THOMAS, J. B. –Immunohistochemical demonstration of canine distemper virus antigen as an aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis. **Res. Vet. Sci.**, **49 (2)**: 177-81, 1990.
- PEARCE-KELLING, S.; MITCHELL, W. J.; SUMMERS, B. A. & APPEL, M. J. –Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: relationship to in vivo persistence and disease. **Microb. Pathog.**, **8 (1)**: 71-82, 1990.
- PEÑA, M. L.; QUIROGA, M. I.; VÁZQUEZ, S. & NIETO, J. M. –Detection of Canine Distemper Viral Antigen in Foxes (*Vulpes vulpes*) in Northwestern Spain. **J. Wildlife Dis.**, **30 (1)**: 95-8, 1994.
- RECLARD, P. & GUILLON, J. C. –Isolement d'une souche de virus de la maladie de Carré à propriétés biologiques particulières. **Bull. Acad. Vet. Fr.**, **40 (10)**: 507-11, 1967.

- RIMA, B. K.; BACZKO, K.; CLARKE, D. K.; CURRAN, M. D.; MARTIN, S. J.; BILLETER, M. A. & MEULEN, V. T. –Characterization of Clones for the Sixth (L) Gene and a Transcriptional Map for Morbilliviruses. **J. Gen. Virol.**, **67**: 1971-8, 1986.
- RIMA, B. K.; DUFFY, N.; MITCHELL, W. J.; SUMMERS, B. A. & APPEL, M. J. –Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. **Arch. Virol.**, **121 (1-4)**: 01-8, 1991.
- RIMA, B.; ALEXANDER, D. J.; BILLETER, M. A.; COLLINS, P. L.; KINGSBURY, D. W.; LIPKIND, M. A.; NAGAI, Y.; ÖRVELL, C.; PRINGLE, C. R. & ter MEULEN, V. –Paramyxoviridae. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Arch. Virol.**, (suppl. **10**): S268-74, 1995.
- ROTA, P.A.; KHAN, A.S.; DURIGON, E.; YURAN, T.; VILLAMARZO, Y.S.; & BELLINI, W.J. -Detection of Measles Virus RNA in Urine Specimens from Vaccine Recipients. **J. Clin. Microbiol.**, **33 (9)**: 2485-8, 1995.
- ROZENBLATT, S.; EIZENBERG, O.; BEN-LEVY, R.; LAVIE, V.; & BELLINI, W. J. -Sequence Homology Within the Morbilliviruses. **J. Virol.**, **53 (2)**: 684-90, 1985.
- ROZENBLATT, S.; EIZENBERG, O.; ENGLUND, G. & BELLINI, W. J. –Cloning and Characterization of DNA Complementary to the Canine Distemper Virus in RNA Encoding Matrix, Phosphoprotein, and Nucleocapsid Protein. **J. Virol.**, **53 (2)**: 691-4, 1985.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B. & ERLICH, H.A. -Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, **239**: 487-91, 1988.

- SCHLINGMAN, A. S. –Studies on Canine Distemper: A Comparison of Natural and Experimental Virus Infections. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, **82**: 164-88, 1933.
- SCHULTZ, R. D. & ADAMS, L. S. –Immunologic Methods for the detection of humoral and cellular immunity. **Vet. Clin. North. Am.**, **8 (4)**: 721-53, 1978.
- SHESHERADARAN, H.; NORRBY, E.; McCULLOUGH, K. C.; CARPENTER, W. C. & ORVELL, C. –The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. **J. Gen. Virol.**, **67 (7)**: 1381-92, 1986.
- SHIMIZU, H.; SHIMIZU, C. & BURNS, J.C. –Detection of novel RNA viruses: morbilliviruses as a model system. **Molecular and Cellular Probes**, **8 (3)**: 209-14, 1994.
- SHIN, Y. S.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C. & MIKAMI, T. –Detection of Canine Distemper Virus Nucleocapsid Protein Gene in Canine Peripheral Blood Mononuclear Cells by RT-PCR. **J. Vet. Med. Sci.**, **57 (3)**: 439-45, 1995.
- SIDHU, M. S.; HUSAR, W.; COOK, S. D.; DOWLING, P. C. & UDEM, S. A. –Canine Distemper Terminal and Intergenic Non-protein Coding Nucleotide Sequences: Completion of the Entire CDV Genome Sequence. **Virology**, **193 (1)**: 66-72, 1993.
- STETTLER, M. & ZURBRIGGEN, A. –Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. **Vet. Microbiol.**, **44 (2-4)**: 211-7, 1995.
- SUMMERS, B.A. & APPEL, M.J.G. –Syncytia Formation: An Aid in the Diagnosis of Canine Distemper Encephalomyelitis. **J. Comp. Path.**, **95**: 425-35, 1985.
- SVANSSON, V.; BLIXENKRONE-Møller, M.; SKIRNISSON, K.; HAVE, P.; HEJE, N. I.; NIELSEN, J. & LUND, E. –Infection studies with canine distemper virus in harbour seals. **Arch. Virol.**, **131**: 349-59, 1993.

- SWANGO, L. J. -Canine Viral Diseases In: Ettinger, S. J. (eds): Textbook of Veterinary Internal Medicine. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1989, p. 298-311.
- THOMAS, W. B.; SORJONEN, D. C. & STEISS, J. E. -A Retrospective Evaluation of 38 cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. **J. American Animal Hospital Assoc.**, **29**: 129-33, 1993.
- THOMAS, W. B. -Inflammatory Diseases of the Central Nervous System in Dogs. **Clin. Techniques in Small Animal Practice**, **13 (3)**: 167-78, 1998.
- TIPOLD, A. -Diagnosis of Inflammatory and infectious Diseases of the Central Nervous System in Dogs: A Retrospective Study. **J. Vet. Internal Medicine**, **9 (5)**: 304-14, 1995.
- VAINIONPÄÄ, R.; MARUSYK, R. & SALMI, A. -The Paramyxoviridae: Aspects of Molecular Structure, Pathogenesis, and Immunity. **Advances in Virus Res.**, **37**: 211-42, 1989.
- van MOLL, P.; ALLDINGER, S.; BAUMGARTNER, W. & ADAMI, M. -Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Vet. Microbiol.**, **44 (2-4)**: 193-9, 1995.
- VANDEVELDE, M. & ZURBRIGGEN, A. -The neurobiology of canine distemper virus infection. **Vet. Microbiol.**, **44 (2-4)**: 271-80, 1995.
- von MESSLING, V.; HARDER, T. C.; MOENNIG, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I. & HAAS, L. -Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, **37 (4)**: 1049-56, 1999.

- VISSER, I. K. G.; KUMAREV, V. P.; ÖRVELL, C.; de VRIES, P.; BROEDERS, H. W. J.; van de BILDT, M. W. G.; GROEN, J.; TEPPEMA, J. S.; BURGER, M. C.; UYTDEHAAG, F. G. C. M. & OSTERHAUS, A. D. M. E. –Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. **Arch. Virol.**, **111**: 149-64, 1990.
- WANER, T.; NAVEH, A.; BEN MEIR, N. S.; BABICHEV, Z. & CARMICHAEL, L. E. – Assessment of Immunization Response to Canine Distemper Virus Vaccination in Puppies Using a Clinic-based Enzyme-linked Immunosorbant Assay. **Vet. J.**, **155** (2): 171-5, 1998.
- WRIGHT, N. G.; CORNWELL, J. C.; THOMPSON, H. & LAUDER, I. M. –Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. **Vet. Rec.**, **94**: 86-92, 1974.
- YOSHIDA, E.; IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; GEMMA, T.; KAI, C. & MIKAMI, T. – Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Vet. Microbiol.**, **59** (2-3): 237-44, 1998.
- YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, Y.; SUGIYAMA, M. & YAMANOUCHI, K. –Natural Infections with Canine Distemper Virus in a Japanese Monkey (*Macaca fuscata*). **Vet. Microbiol.**, **20**: 193-205, 1989.
- ZURBRIGGEN, A.; MÜLLER, C.; VANDEVELDE, M. –In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labeled probes. **Am. J. Vet. Res.**, **54** (9): 1457-61, 1993.
- ZURBRIGGEN, A.; SCHMID, I.; GRABER, H. U. & VANDEVELDE, M. – Oligodendroglial pathology in canine distemper. **Acta neuropathol. (Berl)**, **95** (1): 71-7, 1998.

Abstract

Canine distemper virus (CDV) is a highly contagious viral pathogen which may cause lethal systemic in dogs and other carnivores throughout the world. Affected dogs show gastrointestinal and respiratory clinical signs, and frequently develop clinical signs in the central nervous system (CNS). Clinical manifestations of the disease include depression, progressive loss of weight, dehydration, hyperkeratosis of the foot pads and nose, nervous symptoms and muscular spasms or posterior paralysis which may persist for long periods. Infected dogs with clinical symptoms for CDV, were by detection of viral RNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested PCR.

In this study, we determined by the RT-PCR the presence of nucleoprotein (NP) gene in peripheral blood mononuclear cells, urine and saliva from dogs infected with CDV. The goals of this study was to detect CDV genome by RT-PCR in different clinical samples. In this study, identification of NP mRNA was successfully achieved by using the RT-PCR method with two sets of NP gene specific primers. The RT-PCR technique described in this study, may provide a useful assay system to determine whether the dogs suspected of CDV infection have detectable levels of CDV genes. The results demonstrate that RT-PCR technique is rapid, sensitivity and specificity for virus diagnosis.

ANEXOS

Anexo 1– Número de espécimes clínicas (sangue, urina e saliva), coletados de 100 animais provenientes do HOVET, com sintomatologia sugestiva de cinomose canina.

<u>Data de entrada</u>	<u>Nº Prontuário</u>	<u>Nº Laboratório</u>	<u>Material clínico</u>
25/08/97	78333	01	sangue, urina e saliva
25/08/97	78720	02	sangue e saliva
25/08/97	78802	03	sangue e saliva
27/08/97	77803	04	sangue, urina e saliva
28/08/97	78842	05	sangue, urina e saliva
28/08/97	78976	06	sangue, urina e saliva
29/08/97	79020	07	sangue, urina e saliva
03/09/97	79158	08	sangue, urina e saliva
03/09/97	79161	09	sangue, urina e saliva
03/09/97	79164	10	sangue, urina e saliva
04/09/97	79122	11	sangue e saliva
04/09/97	79202	12	sangue, urina e saliva
04/09/97	79219	13	sangue, urina e saliva
04/09/97	77628	14	sangue, urina e saliva
05/09/97	79187	15	sangue, urina e saliva
05/09/97	79273	16	sangue e saliva
09/09/97	79196	17	sangue, urina e saliva
09/09/97	79269	18	sangue, urina e saliva
12/09/97	79490	19	sangue, urina e saliva
17/09/97	79634	20	sangue e saliva
22/09/97	79556	21	sangue, urina e saliva
22/09/97	79626	22	sangue, urina e saliva
22/09/97	79759	23	sangue e saliva
22/09/97	79775	24	sangue e saliva
02/10/97	80112	25	sangue, urina e saliva

03/10/97	80180	26	sangue, urina e saliva
08/10/97	80187	27	sangue, urina e saliva
08/10/97	80301	28	sangue, urina e saliva
10/10/97	80341	29	sangue, urina e saliva
10/10/97	80379	30	sangue, urina e saliva
15/10/97	80410	31	sangue, urina e saliva
15/10/97	80448	32	sangue e saliva
15/10/97	80482	33	sangue, urina e saliva
15/10/97	80501	34	sangue, urina e saliva
15/10/97	80529	35	sangue, urina e saliva
16/10/97	78144	36	sangue e saliva
16/10/97	80544	37	sangue, urina e saliva
16/10/97	80552	38	sangue, urina e saliva
17/10/97	80598	39	sangue, urina e saliva
20/10/97	80652	40	sangue, urina e saliva
21/10/97	80684	41	sangue, urina e saliva
21/10/97	80712	42	sangue, urina e saliva
22/10/97	80724	43	sangue, urina e saliva
23/10/97	80577	44	sangue, urina e saliva
27/10/97	80862	45	sangue, urina e saliva
28/10/97	80918	46	sangue e saliva
28/10/97	80932	47	sangue, urina e saliva
28/10/97	80955	48	sangue, urina e saliva
29/10/97	80964	49	sangue, urina e saliva
30/10/97	81020	50	sangue, urina e saliva
31/10/97	80526	51	sangue, urina e saliva
31/10/97	81039	52	sangue, urina e saliva
31/10/97	81057	53	sangue, urina e saliva
31/10/97	81083	54	sangue e saliva
03/11/97	81124	55	sangue, urina e saliva

04/11/97	81170	56	sangue, urina e saliva
04/11/97	81174	57	sangue, urina e saliva
04/11/97	81193	58	sangue e saliva
05/11/97	80968	59	sangue e saliva
05/11/97	81202	60	sangue, urina e saliva
06/11/97	65509	61	sangue e saliva
06/11/97	71690	62	sangue, urina e saliva
06/11/97	81243	63	sangue, urina e saliva
06/11/97	81258	64	sangue, urina e saliva
07/11/97	81293	65	sangue e saliva
11/11/97	81398	66	sangue, urina e saliva
11/11/97	81445	67	sangue, urina e saliva
11/11/97	81451	68	sangue e saliva
12/11/97	74843	69	sangue e saliva
13/11/97	81487	70	sangue, urina e saliva
13/11/97	81491	71	sangue, urina e saliva
13/11/97	81530	72	sangue, urina e saliva
12/03/98	84748	73	sangue, urina e saliva
12/03/98	84784	74	sangue, urina e saliva
13/03/98	84829	75	sangue, urina e saliva
13/03/98	84859	76	sangue, urina e saliva
16/03/98	84906	77	sangue, urina e saliva
18/03/98	85003	78	sangue, urina e saliva
20/03/98	85082	79	sangue, urina e saliva
16/04/98	85832	80	sangue, urina e saliva
24/04/98	70484	81	sangue, urina e saliva
24/04/98	86038	82	sangue, urina e saliva
05/05/98	86232	83	sangue, urina e saliva
08/05/98	86347	84	sangue
08/05/98	86359	85	sangue

11/05/98	86396	86	sangue, urina e saliva
13/05/98	86461	87	sangue, urina e saliva
13/05/98	86505	88	sangue, urina e saliva
01/06/98	87083	89	sangue, urina e saliva
03/06/98	87048	90	sangue, urina e saliva
05/06/98	87220	91	sangue, urina e saliva
15/06/98	87220	92	sangue, urina e saliva
02/10/98	90945	93	sangue, urina e saliva
05/10/98	82558	94	sangue, urina e saliva
05/10/98	90981	95	sangue, urina e saliva
07/10/98	91056	96	sangue, urina e saliva
07/10/98	91094	97	sangue, urina e saliva
20/10/98	91490	98	sangue e saliva
23/10/98	91628	99	sangue, urina e saliva
28/10/98	91776	100	sangue, urina e saliva

Anexo 2– Resultado de PCR/Nested para diagnóstico da cinomose canina com primers específicos, em espécimes clínicas de sangue, urina e saliva, provenientes de 100 animais, com sintomatologia sugestiva de cinomose canina atendidos no HOVET.

<u>Nº prontuário</u>	<u>Nº ICB-USP</u>	<u>Amostras</u>		
		linfócito	Urina	saliva
78333	01	negativo	positivo	negativo
78720	02	positivo	NC	negativo
78802	03	positivo	NC	negativo
77803	04	positivo	negativo	positivo
78842	05	positivo	negativo	negativo
78976	06	negativo	negativo	negativo
79020	07	negativo	negativo	negativo
79158	08	positivo	negativo	positivo
79161	09	negativo	positivo	positivo
79164	10	negativo	negativo	negativo
79122	11	negativo	NC	negativo
79202	12	NR	positivo	positivo
79219	13	NR	positivo	positivo
77628	14	NR	positivo	negativo
79187	15	NR	positivo	negativo
79273	16	NR	NC	negativo
79196	17	negativo	negativo	negativo
79269	18	negativo	negativo	negativo
79490	19	negativo	positivo	positivo
79634	20	negativo	NC	negativo
79556	21	negativo	positivo	negativo
79626	22	negativo	positivo	positivo
79759	23	negativo	NC	negativo

79775	24	negativo	NC	negativo
80112	25	positivo	positivo	positivo
80180	26	positivo	positivo	positivo
80187	27	positivo	positivo	negativo
80301	28	positivo	positivo	positivo
80341	29	positivo	positivo	negativo
80379	30	positivo	positivo	negativo
80410	31	positivo	positivo	positivo
80448	32	positivo	NC	negativo
80482	33	positivo	positivo	negativo
80501	34	negativo	positivo	negativo
80529	35	negativo	negativo	negativo
78144	36	positivo	NC	negativo
80544	37	negativo	positivo	negativo
80552	38	positivo	positivo	negativo
80598	39	negativo	positivo	negativo
80652	40	positivo	positivo	negativo
80684	41	positivo	positivo	negativo
80712	42	negativo	positivo	negativo
80724	43	negativo	negativo	negativo
80577	44	negativo	positivo	positivo
80862	45	positivo	positivo	positivo
80918	46	positivo	NC	positivo
80932	47	positivo	positivo	negativo
80955	48	positivo	positivo	negativo
80964	49	positivo	positivo	negativo
81020	50	positivo	positivo	positivo
80526	51	positivo	positivo	negativo
81039	52	negativo	negativo	negativo
81057	53	positivo	positivo	negativo

81083	54	positivo	NC	positivo
81124	55	positivo	positivo	negativo
81170	56	positivo	positivo	negativo
81174	57	negativo	positivo	negativo
81193	58	positivo	NC	negativo
80968	59	negativo	NC	negativo
81202	60	negativo	positivo	negativo
65509	61	negativo	NC	negativo
71690	62	positivo	positivo	negativo
81243	63	positivo	positivo	positivo
81258	64	positivo	positivo	negativo
81293	65	negativo	NC	negativo
81398	66	positivo	negativo	negativo
81445	67	positivo	positivo	negativo
81451	68	negativo	negativo	negativo
74843	69	negativo	NC	negativo
81487	70	negativo	positivo	negativo
81491	71	positivo	positivo	negativo
81530	72	positivo	positivo	negativo
84748	73	positivo	negativo	negativo
84784	74	negativo	negativo	negativo
84829	75	negativo	negativo	negativo
84859	76	negativo	negativo	negativo
84906	77	negativo	negativo	negativo
85003	78	negativo	negativo	negativo
85082	79	positivo	positivo	negativo
85832	80	positivo	positivo	negativo
70484	81	positivo	positivo	positivo
86038	82	negativo	negativo	negativo
86232	83	negativo	negativo	negativo

86347	84	negativo	NC	NC
86359	85	negativo	NC	NC
86396	86	positivo	positivo	negativo
86461	87	negativo	positivo	negativo
86505	88	negativo	negativo	negativo
87083	89	negativo	negativo	negativo
87048	90	positivo	positivo	negativo
87220	91	negativo	negativo	negativo
87423	92	negativo	NC	negativo
90945	93	negativo	negativo	negativo
82558	94	negativo	negativo	negativo
90981	95	negativo	negativo	negativo
91056	96	negativo	negativo	negativo
91094	97	negativo	negativo	negativo
91490	98	negativo	NC	negativo
91628	99	negativo	negativo	negativo
91776	100	negativo	negativo	negativo

NR – não realizado

NC – não coletado

Anexo 3: Relação dos animais com os sintomas apresentados, faixa etária, raça, sexo e estóia de vacinação.																
N.I.: não informa / idade: em meses / evolução: em dias																
N.D.N.: nada digno de nota																
Pront	ICB	Idade	Raça	Sexo	Evolução	Vacinado	Febre	Conjunt	S. Resp	S. Diges	Hiperquer	S. Nervoso	Prostraç	Anorexia	Linfócito	Saliva
78333	1	2	SRD	macho	7	sim	sim	sim	sim	sim	N. I.	convuls.	sim	Hipo	(-)	(-)
78720	2	24	Pincher	macho	1	não	não	sim	não	sim	N. I.	tremores	sim	Anorexia	(+)	(-)
78802	3	36	Poodle	fêmea	10	sim	não	não	não	sim	N. I.	convuls.	sim	Hipo	(+)	(-)
77803	4	24	SRD	macho	5	não	não	sim	sim	sim	N. I.	inco+mio	sim	Hipo	(+)	(+)
78842	5	72	Weimara.	fêmea	15	sim	sim	sim	sim	não	N. I.	incoord.	N. I.	Normo	(+)	(-)
78976	6	24	Fila	macho	15	sim	sim	sim	sim	não	sim	inco+mio	N. I.	Normo	(-)	(-)
79020	7	12	SRD	macho	7	não	sim	sim	sim	sim	sim	mioclonia	N. I.	Normo	(+)	(+)
79158	8	12	SRD	fêmea	N. I.	N. I.	sim	sim	sim	não	sim	inco+mio	N. I.	Hipo	(-)	(+)
79161	9	6	SRD	macho	7	não	sim	sim	não	sim	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	(-)
79164	10	108	SRD	macho	3	não	não	sim	sim	não	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	(-)
79122	11	24	SRD	fêmea	N. I.	sim	não	sim	não	não	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	(-)
79202	12	10	Poodle	macho	9	N. I.	sim	sim	sim	sim	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	NR	(+)
79219	13	6	SRD	fêmea	N. I.	não	sim	sim	não	não	sim	mioclonia	N. I.	Hipo	NR	(+)
77628	14	12	Husky	macho	10	sim	não	sim	sim	sim	N. I.	inco+mio	N. I.	Hipo	NR	(-)
79187	15	12	PastorA.	macho	N. I.	não	sim	sim	não	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	NR	(-)
79273	16	6	Poodle	fêmea	2	sim	não	não	não	não	N. I.	incoord.	N. I.	Hipo	NR	(-)
79196	17	16	Labrador	fêmea	21	N. I.	não	não	sim	sim	N. I.	N.D.N.	sim	Hipo	(-)	(-)
79269	18	4	SRD	fêmea	7	sim	não	não	sim	não	N. I.	incoord.	N. I.	Hipo	(-)	(-)
79490	19	4	Fox	macho	aguda	sim	não	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Normo	(-)	(+)
79634	20	8	SRD	fêmea	aguda	não	não	não	sim	sim	N. I.	inco+mio	sim	Hipo	(-)	(-)
79556	21	60	Fox	macho	15	não	não	sim	sim	não	N. I.	N.D.N.	N. I.	Normo	(-)	(-)
79626	22	10	Weimara.	macho	N. I.	não	não	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Normo	(-)	(-)
79759	23	3	Cocker	macho	N. I.	não	não	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(-)	(+)
79775	24	3	Poodle	fêmea	3	sim	não	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	sim	Anorexia	(-)	(-)
80112	25	36	SRD	macho	aguda	não	não	sim	sim	não	N. I.	N.D.N.	sim	Anorexia	(+)	(+)
80180	26	8	Fila	macho	14	não	sim	sim	sim	sim	sim	inco+mio	N. I.	Hipo	(+)	(+)
80187	27	12	SRD	macho	15	não	não	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(+)	(-)
80301	28	6	SRD	macho	7	não	não	sim	sim	sim	N. I.	convuls.	N. I.	Hipo	(+)	(+)
80341	29	16	Fox	macho	crônica	sim	não	não	não	não	N. I.	incoord.	sim	Hipo	(+)	(-)
80379	30	19	SRD	macho	crônica	não	não	sim	não	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(+)	(-)
80410	31	24	SRD	fêmea	14	não	não	sim	sim	sim	N. I.	inco+mio	N. I.	Hipo	(+)	(+)
80448	32	3	Doberman	fêmea	aguda	não	não	sim	não	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Anorexia	(+)	(-)
80482	33	24	SRD	macho	15	não	sim	sim	sim	sim	sim	incoord.	sim	Hipo	(+)	(-)
80501	34	12	Doberman	macho	7	sim	sim	sim	sim	sim	N. I.	N.D.N.	N. I.	Anorexia	(-)	(-)

80629	35	72	Fox	fêmea	15	sim	não	não	sim	não	sim	não	incoord.	sim	Anorexia	(-)	(-)
78144	36	48	PastorA.	fêmea	4	não	sim	sim	sim	não	sim	não	N.D.N.	sim	Hipo	(+)	NC
80644	37	8	SRD	fêmea	15	não	sim	não	sim	sim	sim	não	mioclonia	N.I.	Normo	(-)	(+)
80652	38	4	Fila	macho	10	não	sim	sim	sim	sim	sim	não	N.D.N.	sim	Anorexia	(+)	(+)
80698	39	60	SRD	macho	15	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Normo	(-)	(+)
80652	40	4	SRD	macho	30	não	sim	sim	sim	sim	sim	não	mioclonia	N.I.	Hipo	(+)	(-)
80684	41	3	Akita	macho	2	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	N.D.N.	N.I.	Anorexia	(+)	(-)
80712	42	11	SRD	macho	7	não	não	não	sim	não	não	não	Paralisia	N.I.	Normo	(-)	(+)
80724	43	60	SRD	fêmea	7	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	sim	Normo	(-)	(-)
80577	44	60	SRD	macho	15	não	sim	não	sim	sim	sim	não	N.D.N.	sim	Hipo	(-)	(+)
80862	45	4	Poodle	macho	7	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	convuls.	N.I.	Hipo	(+)	(+)
80918	46	5	SRD	fêmea	5	não	sim	sim	não	não	não	não	incoord.	N.I.	Hipo	(+)	NC
80932	47	108	SRD	fêmea	aguda	não	sim	sim	não	não	não	não	convuls.	N.I.	Anorexia	(+)	(+)
80955	48	48	SRD	macho	3	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	incoord.	sim	Hipo	(+)	(-)
80964	49	5	SRD	macho	3	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	inco+mio	sim	Hipo	(+)	(-)
81020	50	7	SRD	fêmea	7	sim	sim	sim	sim	sim	sim	não	tremores	sim	Hipo	(+)	(+)
80526	51	6	SRD	macho	crônica	não	sim	sim	sim	não	sim	não	N.D.N.	sim	Hipo	(-)	(-)
81039	52	8	Poodle	fêmea	18	sim	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Normo	(+)	(-)
81057	53	2	SRD	macho	7	sim	sim	sim	sim	não	sim	sim	mioclonia	N.I.	Normo	(+)	(+)
81083	54	2	Old Engl.	fêmea	3	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	N.D.N.	sim	Anorexia	(+)	NC
81124	55	60	PastorA.	fêmea	7	não	sim	sim	sim	não	sim	não	incoord.	N.I.	Anorexia	(+)	(-)
81170	56	6	SRD	macho	aguda	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Normo	(+)	(+)
81174	57	3	SRD	macho	aguda	sim	sim	sim	sim	não	sim	não	convuls.	N.I.	Anorexia	(-)	(+)
81193	58	4	Dog Alem.	fêmea	15	sim	sim	sim	sim	não	sim	não	N.D.N.	N.I.	Hipo	(+)	NC
80968	59	13	SRD	macho	10	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Hipo	(-)	NC
81202	60	8	SRD	macho	15	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	incoord.	N.I.	Anorexia	(-)	(+)
65509	61	20	SRD	fêmea	aguda	não	sim	sim	sim	não	sim	não	convuls.	sim	Hipo	(-)	NC
71690	62	13	Dog Alem.	macho	3	não	sim	sim	sim	não	sim	não	N.D.N.	N.I.	Anorexia	(+)	(-)
81243	63	24	SRD	macho	2	não	sim	sim	sim	não	sim	sim	incoord.	sim	Normo	(+)	(+)
81258	64	2	PastorA.	macho	5	não	sim	sim	sim	não	sim	não	mioclonia	N.I.	Normo	(+)	(+)
81293	65	12	SRD	fêmea	3	não	sim	sim	sim	não	sim	não	N.D.N.	N.I.	Normo	(-)	NC
81398	66	15	SRD	fêmea	15	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Normo	(+)	(-)
81445	67	4	PastorA.	macho	30	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	inco+mio	N.I.	Hipo	(+)	(+)
81451	68	121	PastorB.	macho	7	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Hipo	(-)	(-)
74843	69	11	Fox	fêmea	15	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	sim	Anorexia	(-)	NC
81487	70	9	Doberman	fêmea	30	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Anorexia	(-)	(+)
81491	71	24	SRD	macho	21	não	sim	sim	sim	não	sim	não	inco+mio	N.I.	Hipo	(+)	(+)
81530	72	6	SRD	macho	3	não	sim	não	sim	não	sim	não	incoord.	N.I.	Hipo	(+)	(+)

84748	73	36	SRD	macho	4	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	incoord.	N. I.	Normo	(+)	(-)	(-)
84784	74	36	SRD	fêmea	60	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	inco+mio	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
84829	75	5	PastorA.	macho	crônica	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	incoord.	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
84859	76	36	PastorA.	macho	4	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	incoord.	sim	Hipo	(-)	(-)	(-)
84906	77	96	SRD	fêmea	7	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	inco+mio	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)
85003	78	5	Maltes	macho	20	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)
85082	79	13	Yorkshire	macho	20	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	mioclonia	N. I.	Hipo	(+)	(+)	(-)
85832	80	48	Poodle	macho	5	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	mioclonia	sim	Normo	(+)	(+)	(+)
70484	81	192	Poodle	fêmea	21	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	N. I.	inco+mio	N. I.	Hipo	(+)	(-)	(-)
86038	82	12	Husky	fêmea	30	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	inco+mio	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
86232	83	108	Poodle	fêmea	4	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
86347	84	4	SRD	macho	30	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	N.D.N.	N. I.	Normo	(-)	NC	NC
86359	85	168	SRD	macho	2	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	Paralisia	sim	Anorexia	(-)	NC	NC
86396	86	4	Poodle	macho	7	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	inco+mio	N. I.	Hipo	(+)	(+)	(-)
86461	87	12	Poodle	macho	2	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	mioclonia	sim	Anorexia	(-)	(+)	(-)
86505	88	4	SRD	macho	5	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	inco+mio	sim	Hipo	(-)	(-)	(-)
87083	89	24	SRD	macho	6	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	incoord.	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)
87048	90	5	SRD	macho	40	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(+)	(+)	(-)
87220	91	24	Dog Alem.	macho	9	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)
87423	92	36	SRD	fêmea	20	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	N.D.N.	N. I.	Hipo	(-)	NC	(-)
90946	93	3	SRD	fêmea	6	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	mioclonia	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
82558	94	18	PastorB.	macho	1	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	N.D.N.	N. I.	Anorexia	(-)	(-)	(-)
90981	95	18	SRD	macho	180	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	(-)	(-)
91056	96	8	SRD	macho	60	sim	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	inco+mio	sim	Hipo	(-)	(-)	(-)
91094	97	8	SRD	macho	2	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	convuls.	N. I.	Anorexia	(-)	(-)	(-)
91490	98	3	PastorB.	fêmea	60	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	convuls.	N. I.	Normo	(-)	NC	(-)
91628	99	48	SRD	fêmea	60	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	N. I.	inco+mio	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)
91776	100	24	SRD	macho	15	nao	nao	nao	nao	nao	nao	nao	sim	inco+mio	N. I.	Hipo	(-)	(-)	(-)