

HELENA ARANTES DO AMARAL

**Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR
em cães com sintomatologia neurológica**

São Paulo
2007

HELENA ARANTES DO AMARAL

**Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães
com sintomatologia neurológica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson

São Paulo
2007

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1883
FMVZ

Amaral, Helena Arantes do
Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com
sintomatologia neurológica / Helena Arantes do Amaral. -- São Paulo: H.
A. Amaral, 2007.
72 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Maria Helena Matiko Akao Larsson.

1. Amostras biológicas. 2. Cão. 3. Cinomose. 4. PCR. 5. Urina. I.
Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com alteração neurológica", Protocolo nº355/2003, utilizando 55 cães, sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Maria Helena Matiko Akao Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 24/09/03.

(We certify that the Research "Diagnosis of canine distemper by application of RT-PCR, in dogs with neurological manifestation" protocol number 355/2003, utilizing 55 dogs, under the responsibility of Prof. Dr. Maria Helena Matiko Akao Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in September/24/2003, meeting.

São Paulo, 25 de setembro de 2003


Prof^a Dr^a Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: AMARAL, Helena Arantes do

Título: Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com
sintomatologia neurológica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Neyde Curvo do Amaral (in memoriam)

Há momentos na vida em que sentimos tanto a falta de alguém que o que mais queremos é tirar essa pessoa de nossos sonhos e abraçá-la (Clarice Lispector).

DEDICATÒRIA

*Este trabalho é dedicado ao meu pai José Roberto, Miriam, João, Érica,
Sílvia, Vera, Richard, Xandinho e Eduardo por todo amor e apoio*

*À minha orientadora científica, Maria Helena Matiko Akao Larsson, pela
paciência e confiança desde o mestrado*

Agradecimentos

Ao professor Leonardo José Ricketzenhain pela confiança e disponibilização do LABMAS para realização da parte experimental do trabalho

Ao professor Edison Luiz Durigon por toda orientação e incentivo quase paternal

Aos professores Rodrigo Martins Soares, Paulo Brandão e Adriana Cortez, pela preciosa ajuda na elaboração do projeto e pela amizade, apoio e paciência na realização do experimento

“Aprender a ver é a mais longa aprendizagem de todas as artes”(Jules Goncour)

À Sandra Fernandez do laboratório Bio-Vet pela gentileza em ceder cepa titulada do vírus da cinomose

Aos professores do Departamento de Patologia, especialmente Maria Lúcia Zaidan Dagli e Paulo Maiorka pelas sugestões e esclarecimento de dúvidas e Luciana, Kalan, Fernando e Caio pelo processamento das amostras

Aos médicos veterinários do HOVET- USP especialmente Bruna, Denise, Júlia, Khadine, Paula, Vera, Angélica, Mary, Silvana, Maria Luiza, Luciane e Audrey

Aos médicos veterinários Mary Marcondes Feitosa, João Pedro de Andrade Neto, Wagner Sato Ushikoshi, Marcelo Zanutto e Ricardo Duarte

Aos auxiliares do Serviço de Clínica Médica e Pronto Atendimento Médico do HOVET-USP Antonio Carlos, Carlito, Geraldo, Gilberto e Milton

Aos funcionários do Laboratório Clínico do HOVET e aos funcionários e ex-funcionários do VPS, especialmente: Clara, Cláudia, Creide, Edna, Marli, Maria Helena, Marcelo, Sheila e Hilda

A todos os pós e “ex” pós graduandos, residentes e estagiários dos Departamentos de Clínica Médica, Cirurgia e VPS pelo agradável convívio

Aos amigos do LABMAS, especialmente Ênio, Thais, Mikaela, Marcos e Lara, pelas sugestões e auxílio

Aos veterinários do Pet Care Alex, Aline, Carla, Sibele, Mauricio, Marcelo, Fábio e da AILA, em especial Roberto e Daniela

As funcionárias da biblioteca, especialmente a Elza e às secretárias da pós-graduação Adelaide e Harumi

Aos amigos Márcia N., Márcia H., Mere, Márcio, Fernanda, Jun, Guilherme, Rita, Leon, Katia, Pedro, Karina, Maurício, Ayne, Lúcia, Koga, Joseli, Sandra e Alaíde Elisabeth, Paula e Débora pela amizade e incansável dedicação aos animais

Aos funcionários e pós-graduandos da microbiologia do ICB, especialmente Daniela, Carol, Angélica, Juliana, Fabiana e José

À CAPES pelo financiamento

Aos proprietários e seus cães que participaram desse estudo

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho

"A grandeza de uma nação pode ser julgada pelo modo que seus animais são tratados." (Mahatma Gandhi).

RESUMO

AMARAL, H . A. do **Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica**. [Detection of canine distemper virus by RT- PCR from dogs with neurological signs]. 2007 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Diferentes amostras biológicas foram avaliadas (zaragatoa ocular, genital, urina e células mononucleares do sangue periférico) pela RT-PCR em 50 cães com sintomas neurológicos compatíveis como cinomose, na presença ou não de outros sintomas sistêmicos. O gene da nucleoproteína do vírus da cinomose foi detectado em 43 das 50 amostras avaliadas. Considerando apenas os animais com resultado positivos pela hemi-nested - PCR, os sintomas neurológicos observados com frequência maior que 50%, foram mioclonia e alteração locomotora (maioria dos cães evoluiu a tetraparesia); convulsão e vocalização foram observados em 32% dos casos. Outros sintomas sistêmicos, sintomas oculares, respiratórios ou digestivos, prévios ou associados aos sintomas neurológicos, foram observados em 82% dos cães. Também observou-se hiperqueratose nasal ou de coxins em 44% dos casos. Somente 20% dos animais positivos haviam sido vacinados contra o vírus da cinomose. Zaragatoas genitais forneceram maior número de resultados positivos (40), seguidos por zaragatoas oculares e urina (37) e células mononucleares do sangue periférico (34). A coleta associada de duas amostras biológicas (zaragatoa genital e urina) por animal aumentou a possibilidade de detecção de animais positivos, principalmente nos casos de cães suspeitos que não apresentaram sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares, assim como nos animais vacinados e cronicamente infectados ou convalescentes.

Palavras-chave: Amostras biológicas. Cães. Cinomose canina. PCR. Urina

ABSTRACT

AMARAL, H . A. do Detection of canine distemper virus by RT- PCR from dogs with neurological signs. [**Detecção do vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica**]. 2007, 72 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Using Reverse transcription-PCR assay, different biological samples were available (conjunctival and genital swabs, urine and peripheral blood mononuclear cells) from dogs with or without extraneural signs prior to or accompanying the neurologic signs. Canine distemper nucleoprotein were detected in 43 from 50 dogs available by hemi-nested-PCR. Considering just dogs with distemper confirmed by hemi-nested PCR, gait abnormalities (most commonly tetraparesis) and myoclonus were the neurological signs observed in over 50%; vocalizing and seizures occurred in 32%. Other systemic signs (respiratory, gastroenteric or ocular signs). preceding or associated to neurological signs, occurred in 82% of dogs. Hyperkeratosis of the footpads or nose were observed in 44 % of the cases. Only (20%) were vaccinated against canine distemper. A greater number of positive results were obtained from genital swabs (40), followed by conjunctival swabs and urine (37) and PBMCs (33). Sensitivity of detection positive results were increased by using two clinical samples association (genital swab and urine), specially in dogs that had not shown extraneural signs, vaccinated dogs or during the convalescent and late stage of canine distemper.

Key words: Dogs. Canine distemper. Clinical samples. PCR. Urine

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1-	Resultados da hemi-nested-PCR para gene da nucleoproteína do vírus da cinomose em diferentes amostras biológicas (cMNs, zaragatoa ocular, zaragatoa genital e urina), de 50 cães que apresentaram alteração neurológica compatível com cinomose, São Paulo, Brasil, 2007.	31
Tabela 2 -	Fatores que podem estar envolvidos na detecção do vírus da cinomose pela hn-PCR na concordância de resultados positivos nas quatro amostras biológicas avaliadas por animal: presença ou ausência de sintomas respiratórios, digestivos ou oculares; recuperação ou piora progressiva da sintomatologia neurológica; tempo de evolução dos sintomas iniciais até o momento da coleta das amostras biológicas inferior ou superior a 60 dias e presença ou ausência de vacinação adequada-São Paulo-Brasil-2007.....	32

CAPÍTULO 2

Tabela 1-	Alterações respiratórias, gastrintestinais e oculares observadas isoladamente ou associadas, anteriormente (no período máximo de dois meses) ou no momento das coletas de amostras biológicas e número de animais em que as mesmas foram observadas, nas diferentes idades, nos 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR- São Paulo-Brasil-2007.....	58
Tabela 2 -	Sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares observados anteriormente (no período máximo de dois meses) ou no momento das coletas das amostras biológicas e número de animais de acordo com a idade que as apresentaram, dos 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR- São Paulo, Brasil, 2007.....	59
Tabela 3-	Sintomas neurológicos observados isoladamente ou associados, durante a evolução clínica e número de animais acometidos entre os 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR.SãoPaulo,Brasil,2007.....	60

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1-

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	VÍRUS PADRÃO.....	19
3.2	ANIMAIS	19
3.3	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	20
3.3.1	Zaragatoas Ocular e Genital	20
3.3.2	Células Mononucleares do Sangue Periférico	20
3.3.3	Urina	21
3.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	21
3.4.1	Extração do Rna	22
3.4.2	SÍNTESE de cDna	23
3.4.3	Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>Primers</i>)	23
3.4.4	Reação em Cadeia pela Polimerase Reversa	24
3.4.5	Visibilização dos Produtos Amplificados de Semi-Nested PCR	25
3.4.6	Determinação Da Sensibilidade Analítica	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÕES	33
	REFERÊNCIAS	34
	APÊNDICES	36

CAPÍTULO 2-

1	INTRODUÇÃO	46
2	OBJETIVOS	48
3	MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1	ANIMAIS	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62
	APÊNDICES	66

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa, de distribuição cosmopolita, causada por um vírus RNA envelopado, do gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* que acomete cães e outros canídeos (APPEL; GILLESPIE, 1972). A sintomatologia clínica e a taxa de letalidade dependem da virulência da estirpe viral, da idade e da imunocompetência do hospedeiro (THOMAS; STEISS, 1993).

Cães com cinomose podem apresentar uma ampla variedade de manifestações sistêmicas, na presença ou não de sintomas neurológicos (TIPOLD et al., 1992; TUDURY et al., 1997; KOUTINAS et al., 2002). O diagnóstico clínico é particularmente difícil quando mioclonia e sintomas sistêmicos, prévios ou associados a outras alterações neurológicas, estão ausentes (TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002). Embora a presença de mioclonia seja altamente sugestiva de cinomose, pode estar ausente em mais de 50% dos casos, além de ser observada em outras meningoencefalomielites e, esporadicamente, em intoxicação por chumbo (TIPOLD et al., 1992; Koutinas et al., 2002).

A RT-PCR (Transcrição Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase) é considerada o teste de escolha para o diagnóstico *intra vitam* da cinomose (SHIN et al., 1995; ALCAIDE, 1999; FRISK et al., 1999; JÓZWIK; FRYMUS, 2005; SAITO et al., 2005). Apesar da elevada sensibilidade do teste, ausência de detecção pode ocorrer em diferentes amostras biológicas de um mesmo animal, sendo que a possibilidade de obtenção de resultados positivos aumenta com o aumento no número de coletas de diferentes

amostras biológicas (FRISK et al., 1999; SHIN et al., 2004); sendo indicadas duas ou mais diferentes amostras biológicas por animal, independentemente da forma clínica de apresentação da cinomose (SHIN et al., 2004). Como secreções ocular e nasal nem sempre estão presentes, a saliva não se mostrou uma boa amostra biológica (ALCAIDE, 1999); urina foi, pelo menos, tão sensível quanto líquido (SAITO et al., 2005) sendo que a coleta do mesmo envolve riscos e custos extras.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho visou avaliar o uso de zaragatoas ocular e genital, células mononucleares do sangue periférico (cMNs) e urina no diagnóstico *intra vitam* de cinomose em cães com sintomatologia neurológica compatível com cinomose, na presença ou não de outras alterações sistêmicas, através da RT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 VÍRUS PADRÃO

Para a realização da sensibilidade analítica da RT-PCR e como controle positivo, foi utilizada a amostra padrão vacinal Lederle, cedida pelo Laboratório BIO-VET.

3.2 ANIMAIS

Foi utilizada uma amostragem de conveniência de 50 cães com sintomatologia neurológica compatível com cinomose atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ-USP), na AILA (Aliança Internacional do Animal) e no Centro Veterinário Pet care. Com a finalidade de evitar resultado positivo devido vírus vacinal, foram incluídos apenas animais não vacinados ou vacinados há mais de 50 dias, pois de acordo com diferentes estudos, RNA vacinal é detectado pela PCR até três a 14 dias após aplicação de vacina com vírus vivo atenuado (SHIN et al., 1995; KIM et al., 2001; JÓZWIK; FRYMUS, 2005). Os dados de vacinação, idade, raça e sexo estão discriminados no apêndice A.

3.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.3.1 Zaragatoas Ocular e Genital

O material foi obtido por fricção em conjuntiva palpebral e mucosa genital (preucial ou vaginal) utilizando-se zaragatoas estéreis. As amostras foram, então, imediatamente acondicionadas em microtubos de 1,5mL contendo 500µL de TE (10mM de TrisHCl, 1mM de EDTA, pH 8,0) estéril.

3.3.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico (cMNs)

As amostras de sangue foram colhidas através de punção das veias cefálica, femoral ou jugular, das quais 5mL foram dispostos em tubos de vidro, com EDTA com tampa de borracha. As células mononucleares foram separadas do sangue venoso por sedimentação, utilizando Ficoll® Histopaque 1077 (Sigma) em períodos inferiores a duas horas, em relação ao momento da coleta. Após diluição em PBS estéril (PO₄ 0,01M, NaCl 0,15M, pH7,2) na razão de 1:2, realizou-se homogeneização e sua transferência para tubos contendo 3mL de Ficoll®. Essa transferência foi realizada delicadamente com utilização de pipeta Pasteur estéril, para evitar refluxo. Finalmente, os tubos foram fechados e centrifugados a uma rotação de 1250 x g, durante 30 minutos. O Ficoll®, juntamente com o plasma, foi desprezado e foi feita a colheita do anel de linfócitos, que foi colocada num outro tubo de plástico estéril e acrescentado PBS para lavagem das células, centrifugando-se, em seguida, a uma rotação

de 1200 x g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o anel suspenso com PBS. No total, foram feitas três lavagens das células, para exclusão total do Ficoll®. Após essa fase, o botão de células foi suspenso com 500µL de TE.

3.3.3 Urina

As amostras de urina foram colhidas por cistocentese (10mL) e dispostas em tubos plásticos estéreis de 15mL, com tampa rosqueada. As urinas foram centrifugadas a 2600 x g, durante 10 minutos, à 4°C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 uL de PBS e centrifugado, novamente, a uma rotação de 2600 x g, durante 10 minutos. Após homogeneização e nova centrifugação a 2600 x g, desprezou-se o sobrenadante e o sedimento foi suspenso em 500 µL de TE. A extração foi realizada a partir desse material ou diretamente a partir da urina, sem o processo de centrifugação e lavagem, nos casos em que não foi possível recuperar o sedimento.

3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram mantidas à 4°C, durante o transporte ao laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da FMVZ- USP, SP.

3.4.1 Extração do RNA

Foram utilizados 250 μ L das amostras, incluindo os controles positivos e negativos, adicionados a 750 μ L TRIzol LS (Invitrogen, Carlsbad, USA), em microtubos de 1,5mL, que foram vigorosamente homogeneizadas, e incubados em temperatura ambiente por cinco minutos. Água altamente purificada (Sistema Milli-Q, Millipore), isenta de inibidores que pudessem impedir a amplificação de produtos contaminantes de PCR foi utilizada como controle negativo. O controle positivo constituiu-se de vacinas polivalentes, com vírus vivo atenuado para cinomose, Octa-Cino-Vacin®, Laboratório Bio-Vet S/A, Vargem Grande, São Paulo, diluídas em 1mL de TE em intervalo inferior a 15 dias. Foram então adicionados 200 μ L de clorofórmio e, após homogeneização por agitação durante 15 segundos, foram centrifugados a uma rotação de 12000 x g à 4°C, durante cinco minutos. Após centrifugação, foram formadas duas fases distintas: a inferior fenólica que continha proteínas e debris celulares e a superior (fase aquosa) que continha o RNA. O sobrenadante da fase superior foi coletado e precipitado, volume a volume, com propanol, vigorosamente homogeneizado e deixado precipitar à -20°C por duas horas ou *overnight*. Após esse período, a mistura foi novamente centrifugada a 12000 x g durante 25 minutos à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de RNA foi então lavado com 1mL de etanol (75%). A mistura foi homogeneizada vigorosamente e centrifugado a 7500 x g, à 4°C, por cinco minutos, desprezando-se o sobrenadante. Finalmente, os tubos foram invertidos e deixados secar em temperatura ambiente por 30 minutos seguidos por banho seco, à 56°C, por 10 minutos com tampa aberta, sendo a seguir suspensos em 60 μ L de água DEPC. Após vigorosa homogeneização e centrifugação

foram incubados com tampa fechada, novamente, em banho seco, à 56°C, durante 10 minutos. Foram então aliqüotados 50µL das amostras, seguidas por denaturação (95°C por três minutos) e incubados, a seguir, em gelo por um período mínimo de dois minutos. O RNA foi extraído até o passo de precipitação e convertido em DNA complementar (cDNA) em tempo máximo de 48 horas. Foram processadas amostras de um animal por vez, além de duas amostras controles, sendo, uma negativa e outra positiva.

3.4.2 Síntese de cDNA

Após denaturação foi realizada a transcrição reversa: adicionaram-se 50µL do produto extraído ao mix de volume final de 50 µL, contendo 21 µL água destilada tratada DEPC, 10 µL 1X RT- tampão, 10 µL de iniciadores randômicos, 4 µL dNTP (100 mM) e 5µL MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µL Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Essa mistura foi preparada no gelo e transferida ao termociclador automático MJ Research PTC 200 DNA engine, Watertown, MA, USA, ciclo 25°C por 10 minutos, seguido por 37°C por duas horas.

3.4.3 Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*)

Foram usados os oligonucleotídeos iniciadores que se ligam a regiões altamente conservadas do gene que codificam para a nucleoproteína,

desenhados com o auxílio do Programa Primer Premier 5.0 a partir das seqüências obtidas no GenBank (gi 5733642; gi 44889612; gi 39726306; gi 38324706; gi 37654441; 9630645; gi 39938462; gi 37654450; gi 14150871; gi 11120547; gi 3335048; gi 4127626; gi 5533386; gi 5533394; gi 37626039; gi 5533392; gi 5533390; gi 5533388; gi 5533396; gi 60921; gi 99867035), alinhados pelo CLUSTAL W. Foram utilizados dois iniciadores externos e um iniciador interno. CDV-NP- F₁ (5'ATCCCCAGGRAACAAGCCTAGAA 3') e CDV-NP-R₁ (5' CCTTGGTGATGCCAAGCTCG 3') foram usados na primeira amplificação. Os iniciadores CDV-NP- F₁ and CDV-NP- R₂ (5'CGAAATTTAACCTCCCATG 3') foram utilizados na segunda amplificação (hemi-nested PCR). O tamanho do produto amplificado foi de 440 pares de base, para os iniciadores CDV-NP- F₁ e CDV-NP-R₁, e de 331 pares de base para os iniciadores CDV-NP-F₁ e CDV-NP-R₂.

3.4.4 Reação em Cadeia pela Polimerase Reversa

Para evitar resultados falso-positivos, através da contaminação pelo produto amplificado, foram utilizados três fluxos laminares apropriados, um para extração do ácido nucléico 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, é utilizado um jogo de pipetas automáticas, minimizando, dessa forma, a contaminação entre os três diferentes ambientes.

A hnPCR foi realizada em volume final de 50 μ L contendo 5 μ L de cDNA e dos controles, 8 μ L dNTP (1,25mM), 2,5 μ L de cada um dos dois iniciadores (10pmol/ μ L) CDV-NP-F1 e CDV-NP-R1, 3 μ L MgCl₂ (25mM), 5 μ L de tampão 10X concentrado, 0,3 μ L da enzima AmpliTaq DNA polimerase (5U/ μ L) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 23,7 μ L de água ultrapura q.s.p., seguida de uma segunda amplificação com os *primers* CDV-NP-F1 e CDV-NP-R₂, com as mesmas condições de reação. Foi acrescentado um controle negativo a cada três amostras e foi mantido um controle positivo por animal. A reação foi realizada no termociclador acima referido, sendo que as condições de reação foram uma desnaturação inicial de dois minutos à 95°C, 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidos por uma extensão final de 10 minutos à 72°C, sendo então as amostras mantidas à 4°C. Ao término, as amostras e controles foram armazenados à 4°C.

3.4.5 Visibilização dos Produtos Amplificados de Semi-Nested PCR

Os produtos da hn-PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão Tris-Borato-EDTA (0,045M Tris-Borato, 1mM EDTA), corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL (SAMBROOK et al., 1989). Juntamente com a amostra, foi adicionado azul de bromofenol (2,0 μ L/5 μ L da amostra). A eletroforese foi realizada sob corrente de 100V, durante, aproximadamente, 40 minutos. Em seguida, os fragmentos amplificados foram observados em transluminador de luz ultravioleta e comparados ao padrão de peso molecular.

3.4.6 Determinação da Sensibilidade Analítica

A fim de se avaliar a sensibilidade analítica da hn-PCR na detecção do vírus da cinomose canina, foram feitas diluições seriadas na base 10 em TRIzol com a amostra Lederle que foi previamente titulada em placa em cultura primária de FEG (fibroblasto de embrião de galinha), pelo Laboratório Bio-Vet.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sensibilidade analítica da hn-PCR foi de $10^{0,55}$ DICT 50/mL. Outros autores obtiveram um limiar de detecção pela RT-PCR de 10^1 DICT₅₀ (JÓZWIK; FRYMUS, 2005) e de 10^2 (KIM et al., 2001) e pela nPCR 10^{-1} DICT₅₀ (JÓZWIK; FRYMUS, 2005) e 10^0 (KIM et al., 2001). Estes resultados mostram que a hn-PCR apresenta uma sensibilidade analítica equivalente a nPCR.

O vírus da cinomose canina foi detectado pela hn-PCR em, pelo menos, uma amostra biológica em 43 dos 50 cães estudados. O maior número de resultados positivos ocorreu em zaragatoas genitais (40), seguido de urina e zaragatoas oculares (37) e cMNs (33) (Tabela 1, Apêndice D).

As manifestações neurológicas observadas com maior frequência nos animais positivos (43) em, pelo menos, uma amostra biológica foram: alteração locomotora (41), sendo que a maior parte dos animais evoluiu para tetraparesia com incapacidade de se manter em estação; mioclonia (28); convulsão (16); vocalização (16); nistagmo (11); alteração de estado mental (nove); tremor de intenção (oito) e inclinação lateral de cabeça (cinco casos). Já entre os sintomas extras neurais, além de prostração e disorexia, observou-se: hiperqueratose nasal ou de coxins (22), secreção ocular purulenta (18), secreção nasal purulenta (14), secreção ocular mucosa ou esclera congesta (15), êmese (11) e diarreia (11). Os sintomas extraneurais, relatados ou observados, estão discriminados no apêndice B e os sintomas neurológicos no apêndice C.

Vinte e sete animais (54%) foram positivos e sete negativos (14%), nas quatro amostras biológicas avaliadas. Não foi possível descartar a possibilidade de que animais com resultados negativos nas quatro amostras biológicas pesquisadas estivessem com cinomose, especialmente em dois cães que apresentavam mioclonia, pois de acordo com Frisk et al. (1999), o vírus está presente somente no sistema nervoso central em alguns animais com cinomose.

Em 16 casos (32%) ocorreu discordância de resultados, ou seja, foram obtidos resultados positivos e negativos nas diferentes amostras biológicas de um mesmo animal. Ocorreu ausência de detecção do vírus da cinomose em somente uma amostra biológica na urina (quatro casos) e nas cMNs (quatro casos), porém a urina foi a única amostra biológica positiva em outros três casos (Tabela 1). Assim, semelhante ao observado por outros autores (FRISK et al., 1999; SHIN et al., 2004) a associação de coleta de diferentes amostras biológicas por animal aumentou o número de resultados positivos, mas no caso específico deste estudo, isso foi válido somente na associação de coleta de zaragatoas genitais e urina. Não se obteve maior número de resultados positivos ao acrescentar coletas de zaragatoas oculares e cMNS às coletas associadas de zaragatoa genital e urina. Essa diferença de resultados pode ter ocorrido devido utilização de diferentes metodologias, amostras biológicas, assim como no tipo de seleção de animais em relação ao trabalho realizado por Shin et al. (2004). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que, em casos individuais, zaragatoa ocular ou cMNS possam vir a aumentar o número de resultados positivos em uma população maior de animais, utilizando a mesma metodologia. A coleta de zaragatoa ocular é menos invasiva e não

exige procedimentos anteriores à extração do RNA, despendendo menor gasto de tempo e custo, sendo ambas menos invasivas que a coleta de líquido. Assim, coleta de zaragatoa ocular preferencialmente ou associada à coleta do sangue pode ser vantajosa em casos individuais, especialmente se a coleta de urina não for possível.

Observou-se número muito maior de animais positivos nas quatro amostras biológicas em cães que apresentaram ou estavam apresentando sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares (26/35), do que naqueles que não apresentaram esses sintomas (1/8) (Tabela 2). Frisk et al. (1999) observaram produtos amplificados fracos e ausência na detecção do vírus da cinomose em diferentes amostras biológicas (soro, sangue total e líquido), em animais com diagnóstico de cinomose, confirmado por imunistoquímica do sistema nervoso central. Amude et al. (2006) obtiveram resultados negativos de urina de um e de líquido de três cães com sintomatologia, exclusivamente neurológica, com diagnóstico de cinomose confirmado pela PCR e pela presença de lesões histopatológicas características no sistema nervoso central. Embora no presente trabalho as amostras biológicas utilizadas tenham sido diferentes das dos autores supra citados, os resultados obtidos corroboram com os dos outros autores, confirmando maior facilidade no diagnóstico em animais que tenham apresentado ou estejam apresentando sintomas respiratórios, gastrintestinais ou oculares, pois nesses casos existe grande probabilidade (74,3%) de detectar um animal positivo com uma única amostra biológica considerando cMNs, urina, zaragatoa ocular e genital.

No tocante a forma de evolução clínica, ocorreu concordância de resultados positivos nas quatro amostras biológicas em 24 (70,6%) animais que

estavam apresentando sintomatologia progressiva no momento das coletas dos materiais biológicos, enquanto essa concordância de resultados positivos ocorreu em apenas três dos nove animais que apresentavam recuperação total ou parcial dos sintomas neurológicos (Tabela 2). Em relação ao tempo de evolução, maior número de concordância de resultados positivos nas quatro amostras biológicas ocorreu nos animais com menos de 60 dias de evolução (23/33) que naqueles que apresentavam mais de 60 dias do aparecimento dos sintomas no momento das coletas das amostras biológicas (4/10). Estes resultados estão de acordo com os de Shin et al. (2004), que haviam observado que, em casos crônicos ou de animais em convalescença, o vírus da cinomose pode ter sido eliminado ou estar presente em quantidades muito pequenas nos tecidos epiteliais e fluidos orgânicos. Considerando a vacinação, verificou-se maior concordância de resultados positivos nos animais não vacinados adequadamente (19/26) que nos animais vacinados adequadamente (3/8).

Tão importante quanto o número de amostras biológicas colhidas por animal, é a escolha das mesmas, levando em consideração além da probabilidade maior de detecção, rapidez, praticidade e ausência de riscos na coleta. Exame físico e anamnese cuidadosos, principalmente no referente à apresentação prévia de sintomas respiratórios, oculares ou digestivos, tipo e tempo de evolução e vacina, podem ser de fundamental importância não só na seleção do número e amostra biológica a ser coletada, como na interpretação de resultados. Os resultados obtidos em função da metodologia utilizada no presente trabalho, sugerem a coleta conjunta de pelo menos duas amostras biológicas (zaragatoas genitais e urina) para realização de hn-PCR,

especialmente nos casos de animais suspeitos de cinomose, que não apresentaram sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares, bem como nos animais vacinados, cronicamente infectados ou convalescentes.

Tabela 1- Resultados da hemi-nested-PCR para gene da nucleoproteína do vírus da cinomose em diferentes amostras biológicas (cMNs, zaragatoa ocular, zaragatoa genital e urina), de 50 cães que apresentaram alteração neurológica compatível com cinomose- São Paulo-Brasil-2007

Número de cães	cMNs^{1,2}	Zaragatoa ocular²	Zaragatoa genital²	Urina²
27	+	+	+	+
7	-	-	-	-
4	-	+	+	+
4	+	+	+	-
3	-	-	-	+
2	+	-	+	+
2	-	+	+	-
1	-	-	+	+
Total	33	37	40	37

1: cMNs células mononucleares do sangue periférico, 2: +, presença de produto amplificado, - ausência de produto amplificado

Tabela 2- Fatores que podem estar envolvidos na detecção do vírus da cinomose pela hn-PCR na concordância de resultados positivos nas quatro amostras biológicas avaliadas por animal: presença ou ausência de sintomas respiratórios, digestivos ou ocular; recuperação ou piora progressiva da sintomatologia neurológica; tempo de evolução dos sintomas iniciais até o momento da coleta das amostras biológicas inferior ou superior a 60 dias e presença ou ausência de vacinação adequada. São Paulo- Brasil- 2007

Fatores que podem estar envolvidos na concordância de resultados positivos	Total	Animais positivos	%
Presença de sintomas respiratórios, gastrintestinais ou oculares	35	26	74,3
Ausência de sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares	8	1	12,5
Animais com sintomatologia progressiva no momento da coleta	34	24	70,6
Animais apresentando recuperação parcial ou total dos sintomas neurológicos no momento da coleta	9	3	33,3
Tempo de evolução inferior a 60 dias	33	23	69,7
Tempo de evolução maior ou igual a 60 dias	10	4	40,0
Animais vacinados adequadamente*	8	3	37,5
Animais não vacinados adequadamente*	26	19	73,0

* Foram considerados como animais vacinados adequadamente os cães em esquema de vacinação segundo as recomendações propostas pela *American Veterinary Medical Association* e *American Animal Hospital Association*, que consiste de vacinação a cada três a quatro semanas, entre seis e 16 semanas de idade, revacinação no primeiro ano, seguida por revacinação em intervalo inferior a três anos (Greene, 2006).

5 CONCLUSÕES

Tão importante quanto o número de amostras biológicas colhidas por animal, é a escolha das mesmas, levando em consideração além da probabilidade maior de detecção, rapidez, praticidade e ausência de riscos na coleta. Exame físico e anamnese cuidadosa, principalmente no referente à apresentação prévia de sintomas respiratórios, oculares ou digestivos, tipo e tempo de evolução e vacina, podem ser de fundamental importância não só na seleção do número e amostra biológica a ser coletada, como na interpretação de resultados.

Os resultados obtidos em função da metodologia utilizada no presente trabalho, sugerem a coleta conjunta de, pelo menos, duas amostras biológicas (zaragatoas genitais e urina) para realização de hn-PCR, especialmente nos casos de animais suspeitos de cinomose, que não apresentaram sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares, bem como nos animais vacinados, cronicamente infectados ou convalescentes.

REFERÊNCIAS

ALCAIDE, R. **Cinomose canina**: detecção do RNA viral pela cadeia de polimerase (RT-PCR) em cães com diagnóstico clínico da doença. 1999. 67 f. Dissertação (Mestrado-Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ante mortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p.679-687, 2006.

APPEL, M. J. G.; GILLESPIE, J. H. Canine distemper virus. In GARD, S.; HALLAUER, C.; MEYER, K. F. (Ed.). **Virology monographs**. New York: Springer-Verlag, p. 1-96,1972.

FRISK, A. L.; KONING, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3634-43, 1999.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**, 3rd ed. Local: Saunder Elsier, p. 25-41, 2006.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorecence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 347-359, 2005.

KIM, Y. H.; CHO, K. W.; YOUN, A. Y.; YOO, H. S.; HAN, H. R. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT_PCR combined with nested PCR. **Journal Veterinary Science**, v. 2, p. 59-63, 2001.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; BAUMGAERTNER, W.;LEKKAS, S.; KONTOS, R. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis, **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 47-56, 2002.

SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S A.;ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse trascriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis, **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 116-119, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, vol.3, 1989.

SHIN, Y. J.; CHO, K. O.; CHO, H. S.; KANG, S. K.; KIM, H. J.; KIM, Y. H.; PARK, H. S.; PARK N.Y. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, p. 83-86, 2004.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v 57, p. 439-45, 1995.

THOMAS, W. B.; STEISS, J. E. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 129-33, 1993.

TIPOLD, A., VANDEVELDE, M., JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 466-70, 1992.

TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B., BRACARENSE, A. P. F. L.; MEGID, J.; DIAS JUNIOR, R. F. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, n. 27, p. 229-235, 1997.

Apêndices

Apêndice A Identificação dos animais, vacinação, idade (meses ou anos), raça, sexo, - São Paulo- Brasil- 2007

ID	Vacinação ¹	Idade ²	Raça ³	Sexo ⁴
1	Nsi	2a	Cocker Spaniel	M
2	Não	5a	SRD	F
3	Nsi	7m	Husky Siberiano	F
4	1 ^a 10m	5a	Poodle	F
5	incorreta	3m	Poodle	M
6	incorreta	2,5m	Pinscher	F
7	Nsi	ind	Pequinês	M
8	incorreta	1,5a	Beagle	M
9	<2a	ind	Dachshund	M
10	Nsi	2,5a	Bull Terrier	F
11	incorreta	2a	Poodle	M
12	Nsi	ind	SRD	F
13	incorreta	1a2m	Labrador	F
14	incorreta	1a2m	Fila Brasileiro	M
15	<3a	7a	SRD	F
16	<2a	5a	SRD	M
17	6m	3a	SRD	M
18	Nsi	ind	SRD	M
19	Não	6a	Poodle	F
20	Não	4a	SRD	F
21	incorreta	5a	Bull Terrier	F
22	<há 1,5a	7a	Cocker Spaniel	F
23	incorreta	11a	Dachshund	F
24	no esquema	4m	SRD	M
25	incorreto	1a5m	Labrador	F
26	1,5 ^a	6a	SRD	M
27	1 ^a 7m	>2a	SRD	F
28	incorreta	5a	Dachshund	F
29	Não	11m	SRD	F
30	Não	4a	Poodle	F
31	Não	5a	SRD	M
32	incorreta	1,7a	Dachshund	M
33	4m	3,5a	Poodle	F
34	Não	4a	Fila Brasileiro	F
35	5m	9a	Bulldog Inglês	M
36	Nsi	2a	Poodle	M

Continua

				Conclusão
ID	Vacinação¹	Idade²	Raça³	Sexo⁴
37	incorreta	13a	SRD	F
38	Nsi	3a	SRD	M
39	Não	2a	Cocker Spaniel	F
40	Não	4a	Poodle	M
41	Nsi	1a	Bull Terrier	M
42	Não	5a	Poodle	M
43	Não	2a	Poodle	F
44	Não	4a	SRD	M
45	Não	2m	SRD	F
46	Nsi	ind	SRD	F
47	não	2a	SRD	F
48	Nsi	4a	Dachshund	F
49	Nsi	2a	SRD	M
50	incorreta	9a	Cocker Spaniel	F

1: a, anos; nsi, período superior a 2 meses da última vacina, mas proprietários não souberam informar data

2: ind, informação não disponível; m, meses; a, anos; não, vacinação inadequada

3: SRD, sem raça definida

4: F, fêmea, M, macho

Apêndice B- Identificação dos animais, outras alterações sistêmicas extra neurais (respiratórios, digestivos ou oculares) menos freqüentes observadas anteriormente (no período máximo de dois meses) ou no momento das coletas dos espécimes clínicos- São Paulo- Brasil- 2007

ID	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares antes da coleta ³	Alterações digestivas ou coletas	respiratórias, Outras alterações na extra neurais
1	-	secreção nasal purulenta,	T40°C, hiperqueratose
2	secreção nasal purulenta	secreção ocular mucosa	
3	-	diarréia, êmese, secreção ocular mucosa	39,9°C, hiperqueratose, caquexia
4	êmese	-	
5	-	secreção ocular mucosa	Caquexia
6	secreção nasal purulenta, êmese, diarréia, secreção ocular purulenta		
7	-	-	
8	-	-	hiperqueratose, otite
9	êmese	-	hiperqueratose
10	-	-	
11	-	-	
12	dispnéia	secreção ocular mucosa	hiperqueratose
13	-	secreção ocular mucosa	hiperqueratose
14	-	diarréia, dispnéia, secreção nasal purulenta, secreção ocular purulenta	40°C
15	-	êmese, secreção nasal serosa, tosse, secreção ocular mucosa esternutação	
16	-	-	
17	-	-	hiperqueratose
18	-	-	hiperqueratose

Continua

		Continuação	
ID	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares antes da coleta ³	Alterações digestivas ou coletas	Alterações respiratórias, Outras alterações extra neurais
19	êemese, secreção ocular purulenta, tosse, esternutação, secreção nasal purulenta	secreção nasal serosa	39,9°C*, hiperqueratose
20	-	diarréia	
21	êemese	-	hiperqueratose
22	tosse, secreção ocular purulenta	-	otite
23	secreção ocular purulenta, esternutação	secreção nasal purulenta	hiperqueratose
24	-	-	pústulas abdominais
25	-		
26		secreção nasal serosa, secreção ocular mucosa	
27	melena	-	
28	secreção ocular purulenta	-	
29	-	secreção ocular mucosa	caquexia
30	êemese, secreção nasal purulenta, secreção ocular purulenta	-	T 40,5°C*, otite*, pústulas abdominais*
31	-	secreção nasal purulenta, esternutação, melena, secreção ocular purulenta	40,3°C, hiperqueratose
32	-	-	hiperqueratose
33	hematoquesia, secreção ocular purulenta	-	
34	melena	diarréia, secreção ocular mucosa,	hiperqueratose, caquexia
35	secreção nasal purulenta	-	40°C*, hiperqueratose

Continua

 Conclusão

ID	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares antes da coleta ³	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares na coleta	Outras alterações extra neurais
36	-	secreção ocular mucosa	
37	êmese, melena	secreção nasal purulenta, esternutação	hiperqueratose
38	secreção nasal purulenta, tosse, esternutação, melena, secreção ocular purulenta	-	hiperqueratose
39	hematoquesia	secreção ocular purulenta	
40	-	êmese, secreção ocular purulenta	hiperqueratose otite, pústulas abdominais
41	-	-	
42	-	secreção ocular purulenta	miíase
43	tosse	-	hiperqueratose
44	-	tosse, secreção ocular mucosa	
45	-	êmese, diarréia, secreção nasal serosa, esternutação, secreção ocular purulenta	
46	diarréia	secreção nasal purulenta, esternutação, secreção ocular purulenta	hiperqueratose
47	-	secreção ocular mucosa	
48	secreção nasal serosa, esternutação	secreção ocular mucosa	hiperqueratose
49	-	secreção nasal purulenta, tosse, secreção ocular purulenta	hiperqueratose
50	-	esternutação, secreção ocular purulenta	hiperqueratose, otite

*; alterações foram observadas anteriormente (no período máximo de dois meses), mas não estavam presentes no momento da coleta das amostras biológicas.

Apêndice C- Animais, sintomas neurológicos observados ou relatados e evolução clínica. São Paulo- Brasil- 2007

ID	Alterações neurológicas , evolução
1	mioclonia, vocalização, tetraparesia, eutanasiado
2	paraparesia, alteração de latido*, recuperação total
3	convulsão, vocalização, eutanasiada
4	inclinação lateral de- cabeça, convulsão, nistagmo, estrabismo, vocalização, eutanasiado
5	tetraparesia, nistagmo, órbito
6	tetraparesia, tremor de intenção, hipermetria, estrabismo, nistagmo, estupor, eutanasiado
7	mioclonia, tetraparesia
8	mioclonia*, inclinação lateral de cabeça*, andar compulsivo*, tetraparesia, estrabismo* nistagmo, atrofia músculos mastigatórios, vocalização, estupor, eutanasiado
9	tetraparesia, alteração de latido, órbito
10	nistagmo, inclinação lateral de cabeça, ataxia, convulsão, cegueira
11	inclinação lateral de cabeça, hipermetria, tremor de intenção, nistagmo, paralisia facial
12	mioclonia, convulsão, tremor de intenção, tetraparesia*, andar compulsivo, estupor, eutanasiado
13	mioclonia, convulsão , eutanasiado
14	mioclonia, convulsão, nistagmo, estupor, órbito
15	mioclonia, tetraparesia, vocalização, eutanasiada
16	inclinação lateral de cabeça, andar compulsivo, estrabismo, tetraparesia, órbito
17	tetraparesia*, inclinação lateral de cabeça, recuperação total
18	mioclonia, ataxia, eutanasiado
19	ataxia *, convulsão, recuperação total
20	tetraparesia, eutanasiado
21	claudicação, atrofia músculos mastigatórios, paralisia facial, megaesôfago, ataxia, órbito
22	inclinação lateral de cabeça*, cegueira, midríase, melhora parcial
23	mioclonia, tetraparesia, vocalização, eutanasiado
24	mioclonia, tetraparesia, pleurótomo, estupor, órbito
25	mioclonia*, ataxia*, tremor de intenção*, recuperação total
26	mioclonia, tremor de intenção, vocalização, hipermetria/tetraparesia, órbito
27	tetraparesia*/paraparesia*, tremor de intenção, convulsão, vocalização, nistagmo*, recuperação total
28	mioclonia, convulsão, tetraparesia, inclinação lateral de cabeça, nistagmo, eutanasiado
29	mioclonia, ataxia, alteração latido, eutanasiado
30	ataxia*, recuperação total

Continua

Conclusão

ID Alterações neurológicas, evolução

- 31 mioclonia, anisocoria, tetraparesia, nistagmo, vocalização, óbito
- 32 andar compulsivo, estupor, eutanasiado
- 33 mioclonia, tetraparesia, alteração de latido, óbito
- 34 mioclonia, óbito
- 35 tetraparesia, nistagmo, estupor, óbito
- 36 mioclonia, vocalização, óbito
- 37 convulsão, eutanasiado
- 38 mioclonia, convulsão, tetraparesia, eutanasiado
- 39 mioclonia, vocalização, ataxia, óbito
- 40 inclinação lateral de cabeça, tetraparesia, convulsão, vocalização, estrabismo, pleurótomo, nistagmo, estupor, eutanasiado
- 41 mioclonia, melhora parcial
- 42 vocalização, tetraparesia, nistagmo, convulsão, estupor, eutanasiado
- 43 mioclonia, tremor de intenção, tetraparesia, vocalização, óbito
- 44 tremores *, recuperação total
- 45 tremor de intenção, ataxia, óbito
- 46 mioclonia, tremor de intenção, tetraparesia, opstótomo, eutanasiado
- 47 mioclonia, claudicação, nistagmo, estupor, tetraparesia, eutanasiado
- 48 paraparesia*, mioclonia
- 49 mioclonia, convulsão, nistagmo, tetraparesia, eutanasiado
- 50 convulsão, paraparesia, eutanasiado

*, alterações foram observadas anteriormente (no período máximo de dois meses), mas não estavam presentes no momento da coleta das amostras biológicas.

Apêndice D- Detecção do vírus da cinomose canina por hemi-nested-PCR em diferentes amostras clínicas: células mononucleares do sangue periférico, zaragatoa ocular, zaragatoa genital e urina, de 50 cães com sintomatologia neurológica- São Paulo- Brasil- 2007

n°	CMNS ^{1,2}	Zaragatoa ocular ²	Zaragatoa genital ²	Urina ²
1	+	+	+	+
2	-	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	-
5	-	+	+	+
6	+	+	+	+
7	-	-	-	+
8	+	-	+	+
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	+	+	+	-
13	+	+	+	-
14	+	+	+	-
15	+	+	+	+
16	-	-	-	-
17	-	-	-	+
18	+	-	+	+**
19	+	+	+	+**
20	+	+	+	+**
21	-	-	-	+**
22	-	+	+	+**
23	+	+	+	+**
24	-	-	+	+**
25	-	+	+	-*
26	+	+	+	+**
27	-	+	+	-**
28	-	-	-	-**
29	+	+	+	+**
30	+	+	+	+**
31	+	+	+	+**
32	+	+	+	+**
33	+	+	+	+**
34	+	+	+	+**
35	-	-	-	-**
				Continua

n°	CMNS ^{1, 2}	Zaragatoa ocular ²	Zaragatoa genital ²	Conclusão Urina ²
36	+	+	+	+**
37	+	+	+	+**
38	+	+	+	+**
39	+	+	+	+**
40	+	+	+	+**
41	-	+	+	+**
42	+	+	+	+**
43	+	+	+	+**
44	+	+	+	+**
45	+	+	+	+**
46	+	+	+	+**
47	+	+	+	+***
48	-	-	-	-**
49	+	+	+	+***
50	+	+	+	+***

1: cMNs células mononucleares do sangue periférico; 2: +, presença de produto amplificado, - ausência de produto

amplificado; ** extração realizada a partir da urina direta.

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infecto-contagiosa, de distribuição cosmopolita, causada por um vírus RNA envelopado, do gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* (APPEL; GILESPIE, 1972), que acomete uma ampla variedade de hospedeiros, sendo o cão seu principal reservatório (HEADLEY; GRAÇA, 2000).

A sintomatologia clínica e a taxa de letalidade variam com a virulência da estirpe viral; espécie, idade e imunocompetência do hospedeiro (TIPOLD et al., 1992). A cinomose afeta cães de qualquer idade, raça e sexo (TIPOLD et al., 1992). Embora a cinomose ocorra com maior frequência em filhotes com histórico de não vacinação (GREENE, 2006), pode acometer animais vacinados (BLIXANKRONE-MOLLER et al., 1993; TIPOLD, 1996). Sintomas respiratórios, digestivos e oculares, com intensidade variável, podem ocorrer previamente ou associados a sintomas neurológicos (BRAUND, 1994). Os sintomas neurológicos assim como os sintomas extraneurais, podem ocorrer isolados ou em diferentes associações (TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002). Hiperqueratose nasal e digital também pode ser vista (BRAUND, 1994).

Cães com encefalomielite pelo vírus da cinomose podem apresentar uma ampla variedade de manifestações neurológicas, podendo evoluir de forma aguda, subaguda ou crônica (GREENE, 2006). Três formas clínico-patológicas têm sido descritas: encefalomielite de animais jovens, encefalomielite multifocal de cães adultos e encefalite do cão idoso (GREENE, 2006).

Apesar da freqüente distribuição multifocal das lesões no sistema nervoso central (BRAUND, 1994), o quadro neurológico pode se manifestar clinicamente por sintomatologia focal em até 84,9% dos casos (KOUTINAS et al., 2002). Embora a presença de mioclonia (contração muscular rítmica e espontânea de um ou mais grupos musculares) seja altamente sugestiva de cinomose, a mesma pode estar ausente em mais de 50% dos casos, além de ser observada, com menor freqüência, em outras meningoencefalomielites e, esporadicamente, em intoxicação por chumbo (TIPOLD et al., 1992; TIPOLD, 1995).

O diagnóstico clínico é difícil, particularmente nos casos de manifestação neurológica focal nos quais outros sintomas sistêmicos, prévios ou concomitantes, a outras alterações neurológicas (além da mioclonia) estão ausentes (TIPOLD et al., 1992; KOUTINAS et al., 2002; GREENE, 2006).

2 OBJETIVOS

Descrever as principais alterações clínicas observadas ou relatadas pelos proprietários durante a evolução clínica de cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR, em , pelo menos uma amostra biológica (Capítulo 1).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Utilizou-se uma amostragem de conveniência de 50 cães com sintomatologia neurológica, compatível com cinomose, positivos pela heminested PCR em pelo menos uma amostra biológica, em, pelo menos, uma amostra biológica (capítulo1). Os animais foram atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ-USP), na AILA (Aliança Internacional do Animal) e no centro Veterinário Pet Care, no período de 20/10/2004 a 31/05/2007. Foram anotados dados de anamnese relativos à raça, sexo, idade, evolução dos sintomas, vacinação, presença de contactantes sintomáticos, assim como presença de outros sintomas sistêmicos prévios aos sintomas neurológicos, realizou-se análise descritiva dos resultados obtidos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 50 cães estudados, 30 (60%) eram fêmeas e 20 (40%) machos. Vinte e nove animais (58%) tinham definição racial: Poodle (10), Cocker Spaniel (quatro); Bull Terrier, Labrador Daschund e Fila Brasileiro (dois animais de cada raça); Husky Siberiano, Pinscher, Pequinês, Golden Retriever, Schnauzer, Boxer e Beagle (um animal) e os outros 21 (42%) dos cães não tinham definição racial (Apêndice A).

Foram arbitrariamente considerados como filhotes animais com menos de um ano de idade; adultos animais com mais de um e menos de nove anos, e idosos, os animais com mais de 10 anos de idade. Utilizando essa classificação, a população avaliada consistiu de 30 (60%) adultos; 14 (28%) filhotes e dois (4%) idosos, sendo que em quatro casos a idade era desconhecida.

Todos os animais do presente estudo apresentaram, em algum momento da evolução clínica, sintomas inespecíficos, como disorexia e prostração, com duração e intensidade variáveis. Os sintomas neurológicos surgiram simultaneamente em 15 casos (30%) ou até, no máximo, 30 dias após aparecimento de outras alterações respiratórias, digestivas ou oculares (50%). Apenas um animal apresentou sintomatologia neurológica quatro meses após início de diarreia crônica, não sendo possível comprovar se a mesma estava relacionada à cinomose. Também foram observadas hipertermia (sete casos) e caquexia (sete casos, sendo cinco filhotes).

Manifestações respiratórias, oculares ou digestivas, isoladas ou associadas, foram observadas em 41(82%) dos cães ao exame físico ou relatados na anamnese, tanto nos 11 filhotes (78,57%), quanto em 26 cães adultos (86,7%) e idosos (dois casos). O sintoma não neurológico observado com maior frequência (66%) foi alteração ocular (variando de esclera congesta a secreção ocular purulenta, Tabela 1, Apêndice B); seguido de alteração respiratória (53,5%) e digestiva (44%) conforme descrito na Tabela 2. Apenas nove cães (18%) não apresentaram sintomas gastrintestinais, respiratórios e oculares durante toda evolução clínica, sendo que desses animais, apenas três apresentaram sintomatologia exclusivamente neurológica na ausência de quaisquer outros sintomas (exceto disorexia e prostração). Em nove casos (oito animais adultos e um filhote) havia ocorrido recuperação total dos sintomas sistêmicos, embora os sintomas neurológicos estivessem em progressão. Embora tenha sido relatado que a encefalomielite de cães adultos, devido ao vírus da cinomose raramente sejam precedidos por sintomas sistêmicos (SHELL, 1990; BRAUND, 1994). Vandevelde e Cachin, (1993) observaram sintomatologia gastrintestinal, respiratória e ocular em 50% dos casos, enquanto Tipold et al. (1992) observaram sua presença em 66,7% dos cães com sintomatologia neurológica, resultados bem mais próximos aos obtidos .

Hiperqueratose nasal ou digital ocorreu em 22 animais (44%), enquanto apenas 4 (8%) apresentaram pústulas abdominais. Dois dos quatro animais que apresentaram pústulas abdominais recuperaram-se. Os resultados obtidos corroboram com o descrito pela literatura: pústulas abdominais raramente estão associadas com envolvimento do sistema nervoso central, enquanto cães

com hiperqueratose nasal e digital costumam apresentar complicações neurológicas (TUDURY et al., 1997; GREENE, 2006).

Os sintomas neurológicos referidos como mais freqüentes na encefalomielite pela cinomose incluem: mioclonia; convulsão; ataxia cerebelar, vestibular ou sensorial; cegueira; tetraparesia/ paraparesia e paraplegia (VANDEVELDE; CACHIN, 1993; TUDURY et al., 1997; SILVA et. al., 2006).

Os sintomas neurológicos observados com maior freqüência foram: alteração locomotora (74%) (sendo que a maior parte dos casos evoluiu para tetraparesia com incapacidade de se manter em estação) e mioclonia (54%). Dois animais apresentaram mioclonia após mais de dois meses de evolução de outros sintomas neurológicos, enquanto que em outros quatro cães a mioclonia era bem evidente de inicialmente, desaparecendo com o passar do tempo, apesar da piora progressiva da doença. Silva et al.(2006) observaram mioclonia em 38,4%, enquanto Tudury et al. (1997) observaram sua presença em 75,3% dos animais estudados, e Tipold et al. (1993) a relataram em menos de 50% dos casos. Variação nas freqüências dos diferentes sintomas neurológicos podem estar relacionadas tanto à forma de seleção de animais estudados, quanto ao tempo de evolução, cepa viral, idade e imunocompetência do hospedeiro.

Vocalização, apesar de não ser citada pela maioria dos autores, ocorreu em 16 casos (32%); sendo juntamente com a tetraparesia e estupor a razão da solicitação de eutanásia por grande parte dos proprietários,sendo que não foi possível distinguir se a vocalização ocorria devido ansiedade, dor ou delírio. Este sintoma foi mais freqüentemente observado à noite, sendo que, na maior parte dos casos, os animais paravam de vocalizar, temporariamente, quando

em contato físico com seus donos. Aparentemente, o referido sintoma não respondeu ao tratamento à base de analgésicos (associação tramal, dipirona e gabapentina).

A maior parte dos animais, evoluiu desfavoravelmente (76%): 23 cães foram eutanasiados devido à gravidade dos sintomas neurológicos, enquanto outros 16 vieram a óbito devido piora dos sintomas sistêmicos e neurológicos. Dos nove animais que se recuperaram dos sintomas extraneurais (oito adultos e um filhote), seis apresentaram piora progressiva dos sintomas neurológicos. Ocorreu evolução favorável em 10 animais: quatro manifestaram apenas sintomas neurológicos discretos (ataxia em dois casos, mioclonia e tremor um caso cada), enquanto os outros seis apresentaram recuperação parcial ou total de quadros neurológicos mais severos (Tabela 3, Apêndice C). Dentre os animais que evoluíram favoravelmente, oito eram adultos e dois filhotes (oito meses e outro de um ano), sendo que em um caso a evolução é desconhecida. Esses resultados estão de acordo com Tipold et al. (1992) e Vandeveld e Cachin, (1993), que também observaram prognóstico reservado na maior parte dos casos de cinomose com sintomatologia neurológica. Os resultados sugerem prognóstico reservado para animais com sintomatologia neurológica devido à cinomose, independentemente da idade, embora adultos possam apresentar recuperação (principalmente dos sintomas extraneurais) mais evidente que os filhotes.

No tocante a utilização ou não de vacina contra o vírus da cinomose, 14 não tinham sido vacinados e 17 tinham sido vacinados incorretamente, num total de 62% dos animais. Outros 10 cães não haviam sido vacinados desde

que foram adquiridos, há no mínimo dois meses, sendo desconhecido o histórico de vacinação prévia nesses casos.

Foram considerados vacinados corretamente os cães vacinados ou aqueles que seguiam o esquema de vacinação, de acordo com as recomendações propostas pela *American Veterinary Medical Association* e pela *American Animal Hospital Association*, que consiste de vacinação a cada três a quatro semanas, entre seis e 16 semanas de idade; revacinação no primeiro ano de vida, seguida por revacinação em intervalo inferior a três anos (GREENE, 2006).

Gouveia et al. (1987) observaram que 67,4% dos cães necropsiados com diagnóstico de cinomose não haviam sido vacinados, enquanto Tudury et al. (1997), consideram falta de vacinação um fator predisponente para ocorrência da doença, pois apenas 18,5% haviam sido submetidos a um programa correto de vacinação no Brasil. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com aqueles referidos por Tudury et al. (1997), em que grande parte da população canina não obedece ao esquema de imunização adequado.

Entre os erros de vacinação encontrados, os mais freqüentes ocorreram na imunização dos filhotes (12 casos). Foram observados: intervalo inadequado entre as doses, término da vacinação antes de 16 semanas de idade (momento em que anticorpos maternos ainda podem estar presentes prejudicando a resposta à vacinação), atraso na primeira revacinação anual e intervalo de vacinação superior a três anos, sendo que na maioria desses casos os animais foram vacinados apenas quando filhotes. Embora alguns proprietários tenham alegado condição financeira insuficiente, a maioria

desconhecia a importância de seguir o esquema adequado de vacinação. Cães que não recebem imunização periódica podem perder a proteção e tornarem-se susceptíveis à infecção (GREENE e Appel, 1990). Também foram observados casos de vacinação de animais doentes ou que haviam apresentado, há pouco tempo, sintomas sistêmicos (provavelmente já infectados pelo vírus da cinomose). Foi observada falha na proteção contra cinomose em cinco cães vacinados, em intervalo superior a um e inferior a três anos.

Em 10 casos (20%) a vacinação havia sido realizada de acordo com as recomendações da literatura, em clínicas veterinárias ou casas agropecuárias, sendo que em cinco deles a aplicação da vacina havia sido realizada há menos de um ano. Embora vacinas sejam consideradas efetivas, existem inúmeras causas de falhas vacinais que podem estar relacionadas ao hospedeiro, a fatores vacinais e à má práxis (GREENE; APPEL, 1990). Diversos autores questionam a necessidade de revacinação anual de cães adultos, pois acreditam que animais vacinados mantêm elevados títulos de anticorpos contra o vírus da cinomose vários anos após vacinação (GORE et al., 2005). No entanto, Monti, (2004), em um estudo realizado no Brasil, verificou grande porcentagem de títulos abaixo do valor considerado protetor em cães vacinados corretamente (tanto em clínicas veterinárias, quanto em lojas agropecuárias). Somado ao fato de que no Brasil a prevalência da cinomose varia de 6,1% (Gouveia et al., 1987) a 11,7% (HEADLEY; GRAÇA, 2000), de acordo com a região e metodologia empregada no seu diagnóstico, sugere-se que enquanto programas de esclarecimento para a população não forem

realizados, seja mais prudente manter esquema de revacinação anual dos animais adultos.

Em outros cinco casos, a vacinação havia sido realizada há menos de um mês da coleta das amostras biológicas, sendo em dois casos a vacinação tinha sido feita a menos de 21 dias. Embora diferentes estudos experimentais tenham sido conduzidos com a finalidade de se determinar o período de tempo em que seja possível detecção de RNA vacinal, diferentes períodos de tempo (três a 14 dias) foram obtidos utilizando diferentes metodologias, em pequeno número de animais saudáveis isolados em ambiente protegido (SHIN et al., 1995; KIM et al., 2001; JÓZWIK e FRYMUS, 2005). JÓZWIK e FRYMUS, (2005) detectaram o RNA viral vacinal até três dias após vacinação, utilizando nested/PCR, no sangue total de sete filhotes e de um cão adulto, obtendo resultados positivos somente. Kim et al. (2001), utilizando Nested/PCR, obtiveram resultados positivos dois e sete dias da vacina, não apresentando nenhum resultado positivo após sete dias. Por outro lado, Shin et al. (1995) detectaram o vírus da cinomose no sangue, de sete a 14 dias da vacina, mas não após 21 dias (estudo realizado com três cães). Provavelmente, em animais de uma população não protegida por condições experimentais, dependendo da metodologia utilizada, esse período possa ser superior a 14 dias. Como não foi possível realizar a coleta e processamento de diferentes amostras biológicas em animais saudáveis, utilizando a mesma metodologia empregada nos animais suspeitos, naqueles cinco casos nos quais a vacina foi aplicada, há menos de um mês, não foi possível descartar a possibilidade de detecção de vírus vacinal. Já nos demais 43 animais, pode-se descartar a possibilidade de detecção do antígeno vacinal, pois já havia decorrido mais de dois meses da

administração da vacina no momento das coletas das amostras biológicas. Em cinco casos, os animais poderiam já estar infectados pelo vírus da cinomose no momento em que foi realizada a vacinação, mas não foi possível descartar a possibilidade de encefalite pós-vacinal (sintomas neurológicos se manifestaram de um a 15 dias da aplicação da vacina com vírus vivo atenuado, período que pode ocorrer encefalite pós- vacinal (SHELL, 1990).

Outro dado relevante na anamnese (além do esquema utilizado na vacinação e da ocorrência prévia de sintomas extraneurais) a presença de contactes com sintomas sugestivos de cinomose em 10 casos (20%).

Tabela 1- Alterações respiratórias, gastrintestinais e oculares observadas isoladamente ou associadas, anteriormente (no período máximo de dois meses) ou no momento das coletas de amostras biológicas e número de animais em que as mesmas foram observadas, nas diferentes idades, nos 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR- São Paulo-Brasil- 2007

Sintomas observados ou relatados	Total N= 50	Filhotes N= 14	Adultos N= 30	Idosos N= 2	Ind N= 4
Secreção ocular purulenta	18	4	12	1	1
Secreção ocular mucosa ou esclera congesta	15	5	9	0	1
Secreção nasal purulenta	14	2	9	2	1
Êmese	11	4	6	1	0
Diarréia	11	6	4	0	1
Esternutação	9	1	5	2	1
Tosse	7	1	6	0	0
Melena	5	0	4	1	0
Secreção nasal serosa	5	2	3	0	0
Hematoquesia	2	0	2	0	0
Dispneia	2	0	1	0	1

Tabela 2- Sintomas respiratórios, gastrintestinais e oculares observados anteriormente (no período máximo de dois meses) ou no momento das coletas das amostras biológicas, segundo faixa etária, dos 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR- São Paulo- Brasil- 2007

Sintomas	Total (N=50)	Filhotes (N= 14)	Adultos (N= 30)	Idosos (N= 2)	Idade desconhecida (N= 4)
Oculares	33	9	21	1	2
Respiratórios	23	5	14	2	2
Digestivos	22	6	14	1	1
Respiratório ou digestivo ou ocular	41	11	24	2	2

Tabela 3- Sintomas neurológicos observados isoladamente ou associados, durante a evolução clínica, segundo faixa etária, dos 50 cães positivos para cinomose pela hemi-nested PCR- São Paulo- Brasil- 2007

Sintomatologia Neurológica	Total N= 50	Filhotes N= 14	Adultos N= 30	Idosos N= 2	Idade desconhecida N = 4
Mioclonia	27	6	16	1	4
Tetraparesia	22	5	14	1	2
Convulsão	17	4	11	1	1
Vocalização	16	3	12	1	0
Nistagmo	12	2	10	0	0
Estupor	9	3	5	0	1
Ataxia	9	3	5	0	1
Tremor de intenção	8	2	4	0	2
Inclinação lateral de cabeça	5	0	5	0	0
Estrabismo	4	1	3	0	0
Paraparesia	3	1	3	0	0
Andar compulsivo	3	1	2	0	1
Alteração latido	3	1	2	0	0
Atrofia dos músculos da mastigação	3	1	2	0	0
Claudicação	2	1	2	0	0
Hipermetria	2	1	1	0	0
Pleurótomo	2	1	1	0	0
Tetraplegia	2	1	1	0	0
Tremor	1	0	1	0	0
Paralisia Facial	1	0	1	0	0
Megaesôfago	1	0	1	0	0
Midríase bilateral	1	0	1	0	0
Cegueira	1	0	1	0	0
Opstótomo	1	0	0	0	1
Anisocoria	1	0	1	0	0

5 CONCLUSÕES

Apesar de sintomas extraneurais terem sido observados (ou relatados) em 82% dos cães com sintomatologia nervosa, em muitos casos os sintomas foram discretos, realçando a importância do exame clínico detalhado.

Os dados obtidos reforçam a necessidade de esclarecimento dos proprietários sobre a imunização periódica, nas diferentes faixas etárias e não somente enquanto filhote.

REFERÊNCIAS

ALCAIDE, R. **Cinomose canina**: detecção do RNA viral pela cadeia de polimerase (RT-PCR) em cães com diagnóstico clínico da doença. 67 f. Dissertação (Mestrado-Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ante mortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, p. 679-687, 2006.

APPEL, M. J. G.; GILLESPIE, J. H. Canine distemper virus. In GARD, S.; HALLAUER, C.; MEYER, K. F. (Ed.). **Virology monographs**. New York: Springer-Verlag, p. 1-96, 1972.

BRAUND, K.G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**, 2nd edition, ed Mosby, 1994.

FRISK, A. L.; KONING, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3634-43, 1999.

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

GORE, T.C.; LAKSHMANAN, N.; DUCAN, K.L.; COYNE, M.J.; LUM, M.A.; STERNER, F.J. Three-year duration of immunity in dogs following vaccination against canine adenovirus type-1, canine parvovirus and canine distemper virus. **Veterinary Therapeutics**, v. 6, n.1, p. 5-14, 2005.

GOUVEIA, A. M. G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A. L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 9-45, 1987.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**, 3rd ed. Local: Saunder Elsier, p. 25-41, 2006.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 37, n. 2, São Paulo, 2000.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorecence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 347-359, 2005.

KIM, Y. H.; CHO, K. W.; YOUN, A. Y.; YOO, H. S.; HAN, H. R. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT_PCR combined with nested PCR. **Journal Veterinary Science**, v. 2, p. 59-63, 2001.

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; BAUMGAERTNER, W.; LEKKAS, S.; KONTOS, R. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 47-56, 2002.

MONTI, F.S. **Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG**. 56f. Dissertação de Mestrado Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.

SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S A.;ALFIERI, A. F. Detection of canine distemper virus by reverse trascriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Reserch in Veterinary Science**, v. 80, p. 116-119, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed., vol.3, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SHELL, L. G. **Canine distemper. Continuing Education**, n12, p.173-179, 1990.

SHIN, Y. J.; CHO, K. O.; CHO, H. S.; KANG, S. K.; KIM, H. J.; KIM, Y. H.; PARK, H. S.; PARK N.Y. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, p. 83-86, 2004.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, n. 57, p. 439-45, 1995.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; GRAÇA, D.L.; KOMMERS, G.D; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em case. Pesquisa Veterinária Brasileira –**Brazilian Journal of Veterinary Research**, vol.27, n.5, p. 215-220, Maio 2007.

THOMAS, W. B.; STEISS, J. E. A retrospective evaluation of 38 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, p. 129-33, 1993.

TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of central nervous system in dogs: A retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.9, n. 5, p. 304-314, 1995.

TIPOLD, A., JAGGY, A., ZURBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M. Neurological signs in canine distemper encephalomyelitis – a clinical study. **European Journal of Companion Animal Practice**, n. 33, p. 466-470, 1996.

TIPOLD, A., VANDEVELDE, M., JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, p. 466-70, 1992.

TUDURY, E. A.; ARIAS, M. V. B., BRACARENSE, A. P. F. L.; MEGID, J.; DIAS JUNIOR, R. F. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, n. 27, p. 229-235, 1997.

VANDEVELDE, M.; CACHIN, M. The neurologic form of canine distemper. IN **Current Veterinary Therapy XI Small Animal Practice**, Saunders, 1993.

APÊNDICES

Apêndice A. Identificação dos animais, vacinação, idade (meses ou anos), raça, sexo, presença ou não de contactantes sintomáticos- São Paulo- Brasil- 2007

ID	Vacinação ¹	Idade ²	Raça ³	Sexo ⁴	Contactante sintomático
1	Nsi	2a	Cocker Spaniel	M	não
2	Não	5a	SRD	F	não
3	Nsi	7m	Husky Siberiano	F	sim
4	1 ^a 10m	5a	Poodle	F	sim
5	Incorreta	3m	Poodle	M	sim
6	Incorreta	2,5m	Pinscher	F	não
7	Nsi	ind	Pequinês	M	não
8	Incorreta	1,5a	Beagle	M	não
9	Nsi	ind	SRD	F	não
10	Incorreta	1 ^a 2m	Labrador	F	não
11	Incorreta	1 ^a 2m	Fila Brasileiro	M	sim
12	<3a	7a	SRD	F	não
13	6m	3a	SRD	M	não
14	Nsi	ind	SRD	M	não
15	Não	6a	Poodle	F	não
16	Não	4a	SRD	F	não
17	Incorreta	5a	Bull Terrier	F	não
18	<há 1,5 ^a	7a	Cocker Spaniel	F	não
19	Incorreta	11a	Dachshund	F	não
20	no esquema	4m	SRD	M	não
21	Incorreto	1 ^a 5m	Labrador	F	não
22	1,5 ^a	6a	SRD	M	sim
23	1 ^a 7m	>2a	SRD	F	não
24	Não	11m	SRD	F	não
25	Não	4a	Poodle	F	não
26	Não	5a	SRD	M	não
27	Incorreta	1,7a	Dachshund	M	não
28	4m	3,5a	Poodle	F	não
29	Não	4a	Fila Brasileiro	F	sim
30	Nsi	2a	Poodle	M	não
31	Incorreta	13a	SRD	F	não
32	Nsi	3a	SRD	M	não
33	Não	2a	Cocker Spaniel	F	sim
34	Não	4a	Poodle	M	sim

Continua

ID	Vacinação ¹	Idade ²	Raça ³	Sexo ⁴	Conclusão
					Contactante sintomático
35	Nsi	1a	Bull Terrier	M	Não
36	Não	5a	Poodle	M	Sim
37	Não	2a	Poodle	F	Sim
38	Não	4a	SRD	M	Não
39	Não	2m	SRD	F	Não
40	Nsi	ind	SRD	F	Não
41	Não	2a	SRD	F	Não
42	Nsi	2a	SRD	M	Não
43	incorreta	9a	Cocker Spaniel	F	Não
44	Nsi	<4m	SRD	M	Ind
45	incorreta (há 24d)	6m	Golden Retriever	F	Não
46	incorreta (há 27 d)	9m	SRD	F	Não
47	durante esquema (há 25d)	8m	SRD	F	Não
48	incorreta (há 8 d)	3m	Schnauzer	F	Não
49	incorreta (há 12d)	5m	Poodle	M	Sim
50	incorreta	7m	Boxer	F	Não

1: a, anos; nsi, período superior a 2 meses da última vacina, mas proprietários não souberam informar data

2: ind, informação não disponível; a, anos; m, meses; não, vacinação inadequada

3: SRD, sem raça definida

4: F, fêmea, M, macho

Apêndice B Identificação dos animais, outras alterações sistêmicas extraneurais (respiratórios, digestivos ou oculares) menos freqüentes observadas anteriormente (no período máximo de dois meses) e no momento das coletas dos espécimes clínicos -São Paulo- Brasil- 2007

ID	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares anamnese ou melhora ³	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares
1		secreção nasal purulenta, secreção ocular mucosa
2	secreção nasal purulenta	secreção ocular mucosa*
3	-	diarréia, êmese, secreção ocular mucosa
4	emese*	-
5	-	secreção ocular mucosa
6	secreção nasal purulenta, êmese, diarréia, secreção ocular purulenta*	
7	-	-
8	-	-
9	dispnéia	secreção ocular mucosa
10	-	secreção ocular mucosa
11	-	diarréia, dispnéia, secreção nasal purulenta, secreção ocular purulenta
12	-	êmese, secreção nasal serosa, tosse, secreção ocular mucosa esternutação
13	-	-
14	-	-
15	emese, secreção ocular purulenta, tosse, esternutação, secreção nasal purulenta *	secreção nasal serosa*
16	-	diarréia
17	emese*	-
18	tosse, secreção ocular purulenta *	-

Continua

		Continuação	
ID	Alterações digestivas ou anamnese ou melhora ³	respiratórias, ou oculares	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares
19	secreção ocular purulenta, esternutação		secreção nasal purulenta
20	-		-
21	-		-
22			secreção nasal serosa, secreção ocular mucosa
23	melena*		-
24	-		secreção ocular mucosa
25	êmese, purulenta, purulenta*	secreção nasal, secreção ocular	-
26	-		secreção nasal purulenta, esternutação, diarreia, secreção ocular purulenta, melena,
27	-		-
28	hematoquesia, purulenta*	secreção ocular	-
29	melena		diarreia, secreção ocular mucosa,
30	-		secreção ocular mucosa
31	êmese, melena		secreção nasal purulenta, esternutação
32	secreção nasal purulenta, tosse, esternutação, melena, secreção ocular purulenta *		-
33	hematoquesia		secreção ocular purulenta
34	-		êmese, secreção ocular purulenta
35	-		-
36	-		secreção ocular purulenta
37	tosse*		-
38	-		tosse, secreção ocular mucosa*
39	-		êmese, diarreia, secreção nasal serosa, esternutação, secreção ocular purulenta
40	diarreia		secreção nasal purulenta, esternutação, secreção ocular purulenta
41	-		secreção ocular mucosa

Continua

		Conclusão
ID	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares anamnese ou melhora ³	Alterações respiratórias, digestivas ou oculares
42	-	secreção nasal purulenta, secreção ocular purulenta, tosse,
43	-	esternutação, secreção ocular purulenta
44	-	secreção nasal purulenta, secreção ocular purulenta
45	-	secreção ocular mucosa
46	-	esclera congesta
47	-	-
48	diarréia	êmese, secreção nasal serosa
49	-	diarréia, secreção ocular purulenta
50	tosse	diarréia

*; alterações foram observadas anteriormente (no período máximo de dois meses), mas não estavam presentes no momento da coleta das amostras biológicas.

Apêndice C Identificação dos animais, sintomas neurológicos observados ou relatados e evolução clínica- São Paulo-Brasil- 2007

ID	Alterações neurológicas , evolução
1	mioclonia, vocalização, tetraparesia, eutanasiado
2	paraparesia, alteração de latido*, recuperação total
3	convulsão, vocalização-eutanasiada
4	inclinação de cabeça, convulsão, nistagmo, estrabismo, vocalização, eutanasiado
5	tetraparesia, nistagmo, órbito
6	tremor de intenção, hipermetria, estrabismo, nistagmo, estupor, eutanasiado
7	mioclonia, tetraparesia
8	mioclonia*, inclinação cabeça*, andar compulsivo*, tetraplegia, estrabismo* nistagmo, atrofia músculos mastigatórios, vocalização, estupor, eutanasiado
9	mioclonia, convulsão, tremor de intenção, andar compulsivo, estupor, eutanasiado
10	mioclonia, convulsão, eutanasiado
11	mioclonia, convulsão, nistagmo, estupor, órbito
12	mioclonia, tetraparesia, vocalização, eutanasiada
13	tetraparesia*, inclinação de cabeça, recuperação total
14	mioclonia, ataxia, eutanasiado
15	ataxia *, convulsão, recuperação total
16	tetraparesia, eutanasiado
17	claudicação, atrofia músculos mastigatórios, paralisia facial, megaesôfago, ataxia, órbito
18	inclinação de cabeça*, cegueira, midríase, melhora parcial
19	mioclonia, tetraparesia, vocalização, eutanasiado
20	mioclonia, tetraparesia, pleurótomo, estupor, órbito
21	mioclonia*, ataxia*, tremor de intenção*, recuperação total
22	mioclonia, tremor de intenção, vocalização, hipermetria/tetraparesia, órbito
23	tetraparesia*/paraparesia*, tremor de intenção, convulsão, vocalização, nistagmo*, recuperação total
24	mioclonia, ataxia, alteração latido, eutanasiado
25	ataxia*, recuperação total
26	mioclonia, anisocoria, tetraparesia, nistagmo, vocalização, órbito
27	andar compulsivo, estupor, eutanasiado
28	mioclonia, tetraparesia, alteração de latido, órbito
29	mioclonia, órbito

Continua

	Conclusão
ID	Alterações neurológicas , evolução
30	mioclonia, vocalização, óbito
31	convulsão, eutanasiado
32	mioclonia, convulsão, tetraparesia, eutanasiado
33	mioclonia, vocalização, ataxia, óbito
34	inclinação de cabeça, convulsão, vocalização, estrabismo, pleurótomo, nistagmo, estupor, eutanasiado
35	mioclonia, melhora parcial
36	vocalização, tetraparesia, nistagmo, convulsão, estupor, eutanasiado
37	mioclonia, tremor de intenção, tetraparesia, vocalização, óbito
38	tremores*, recuperação total
39	tremor de intenção, ataxia, óbito
40	mioclonia, tremor de intenção, tetraparesia, opstótomo, eutanasiado
41	mioclonia, claudicação, nistagmo, tetraparesia, eutanasiado
42	mioclonia, convulsão, nistagmo, tetraparesia, eutanasiado
43	convulsão, paraparesia, eutanasiado
44	ataxia, eutanasiado
45	convulsão, vocalização, tetraparesia, eutanasiado
46	paraparesia/tetraparesia, mioclonia, eutanasiado
47	mioclonia*, melhora parcial
48	convulsão, eutanasiado
49	mioclonia, vocalização, convulsão, óbito
50	tetraplegia, mioclonia, convulsão tipo goma de mascar, atrofia músculos mastigatórios, estupor, eutanasiado

*, alterações foram observadas anteriormente (no período máximo de dois meses), mas não estavam presentes no momento da coleta das amostras biológicas.