

**UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA VETERINÁRIA**

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE  
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA,  
IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E  
COLORAÇÃO DE SELLERS EM AMOSTRA DE  
TECIDO NERVOSO DE CÃES E DE ANIMAIS  
SILVESTRES PARA O DIAGNÓSTICO DA  
CINOMOSE**

**Michelle Gomes Barreto**

**2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA VETERINÁRIA**

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE  
IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA, IMUNOFLUORESCÊNCIA  
INDIRETA E COLORAÇÃO DE SELLERS EM AMOSTRA DE  
TECIDO NERVOSO DE CÃES E DE ANIMAIS SILVESTRES PARA O  
DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE**

**MICHELLE GOMES BARRETO**

*Sob orientação do Professor*  
**Cláudio de Moraes Andrade**  
*e Orientação de*  
**Maria Luíza Carrieri**

Tese submetida como requisito  
Parcial para obtenção do grau de  
Magister Scientiae em Medicina  
Veterinária, Área de Concentração  
Em Microbiologia e Imunologia  
Veterinária

Serópedica, RJ  
Março de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E**  
**IMUNOLOGIA VETERINÁRIA**

MICHELLE GOMES BARRETO

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Microbiologia e Imunologia Veterinária, com requisito parcial para obtenção do grau de **Magister Scientiae** em Medicina Veterinária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/07/2006.

---

Dr.Cláudio de Moraes Andrade  
(Orientador) UFRRJ

---

Dra. Luz Alba Maria Garcete Fornelles  
PESAGRO- RJ

---

Dr.Carlos Henrique Azeredo da Silva  
PESAGRO - RJ

## **DEDICATÓRIA**

**Ao meu grande pai que me deixaste saudade  
e orgulho de ser sua filha;  
A minha mãe pelo direcionamento na vida;  
A minha irmã e ao meu sobrinho Lucas pelos  
momentos felizes;  
Ao Júlio pelo incentivo, ajuda moral e por  
fazer parte da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar o meu agradecimento a todos que participaram de alguma forma na realização desse trabalho, em especial:

Ao Instituto Pasteur (SP) por ter gerado a oportunidade que me permitiu realizar toda minha pesquisa.

Ao prof. Dr. Cláudio de Moraes Andrade pela amizade, bom humor e pelo seu espírito de liderança.

A Dr. Maria Luíza Carrieri (Pasteur) pela orientação, sugestões e confiança.

A Dr Ivonete Kotait (Pasteur) pela receptividade e apoio dado para realização e finalização desse trabalho.

A Dr. Zélia e Dr. Andréia (Pasteur) pela produção do conjugado anti-cinomose, e mais uma vez a Dr Zélia por todo empenho, carinho e experiência.

A todos estagiários do Pasteur Alexandre, Rodrigo, Willian, Aline, Patrícia que me ajudaram em momentos de dificuldades.

A Juliana, Pedro, Karen, Rafael, Bilu, Samira e Graciane (Pasteur) por todo carinho e incentivo.

Aos técnicos Sílvio, Rosângela e Rose (Pasteur) pela experiência técnica.

A todos amigos do curso de Mestrado em especial Adílio e Marcelo pela ajuda.

Ao prof. Dr. Luiz Felipe (UFRRJ) e ao meu amigo Flávio pela ajuda a busca de soro positivo para cinomose.

Aos amigos Dr. Carlos (PESAGRO) e Valdir pelo auxílio.

A amiga Carla Mota por algumas informações e referências dessa dissertação.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3-18
3.1. Histórico.....	3
3.2. Classificação e Morfologia.....	3-4
3.3. Genoma viral.....	4-5
3.4. Replicação.....	5-6
3.5. Resistência aos agentes físicos e químicos.....	6
3.6. Epidemiologia.....	7-8
3.7. Patogenia.....	9
3.8. Sintomas clínicos.....	9-11
3.9. Encefalite por cinomose.....	11-12
3.9.1. Encefalite dos cães jovens.....	11
3.9.2. Encefalite Multifocal dos cães adultos.....	11-12
3.9.3. Encefalite dos cães velhos.....	12
3.10. Diagnóstico.....	12-17
3.10.1. Diagnóstico Viroológico.....	12-14
3.10.2. Diagnóstico Sorológico.....	14-15
3.10.3. Diagnóstico Histopatológico.....	15-16
3.10.4. Diagnóstico Molecular.....	16-17
3.10. Saúde Pública.....	17-18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19-23
4.1. Amostras Analisadas.....	19-21
4.2. Amostra Padrão.....	21
4.3. Técnica de Coloração de Sellers.....	21
4.4. Técnica de Imunofluorescência Direta.....	21-22
4.5. Técnica de Imunofluorescência Indireta.....	23
5. RESULTADOS.....	24-31
5.1. Em cães.....	24-31
5.1.1. Avaliação de cada região do cérebro pela técnica de IFD.....	24-26
5.1.2. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD de acordo com a raça.....	26
5.1.3. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD de acordo com o histórico clínico informado entre Estados.....	27-28
5.1.4. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD com o histórico clínico Informado.....	28-29
5.1.5. Avaliação de Positividade pela técnica de Coloração de Sellers.....	29
5.1.6. Comparação das técnicas de Sellers, IFD e IFI.....	30-31
5.2. Em animais silvestres.....	31
5.2.1. Avaliação de Positividade pelas técnicas de IFD, Sellers e IFI.....	31
6. DISCUSSÃO.....	32-34
7. CONCLUSÃO.....	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36-46

## **LISTA DE SIGLAS, ABREVIACOES E SÍMBOLOS**

CDV - vírus da cinomose

CA - corno de Ammn

CB – cerebelo

TE - tronco encefálico

CN - cérebro normal

SNC - sistema nervoso central

IF- Imunofluorescência

IFD - Imunofluorescência direta

IFI - Imunofluorescência indireta

RNA - cido ribonucléico

PCR - reação de cadeia da Polimerase

ISH- Hibridização *in situ*

ELISA - Enzime-linked Imunosorbance Assay

FC´ - Fixação do complemento

VERO- células de rim de macaco verde

## RESUMO

BARRETO, Michelle Gomes. **Estudo Comparativo das técnicas de Imunofluorescência Direta, Imunofluorescência Indireta e Coloração de Sellers em amostra de tecido nervoso de cães e de animais silvestres para o diagnóstico da cinomose.** Seropédica: UFRRJ, 2006. (Dissertação, Mestrado em Microbiologia e Imunologia Veterinária).

Foi realizado um estudo comparativo do diagnóstico da cinomose pelas técnicas de Imunofluorescência Direta (IFD), Imunofluorescência Indireta (IFI) e Coloração de Sellers em amostras de tecido nervoso de cães e de animais silvestres que morreram com suspeita clínica da virose. Foram utilizados 118 amostras de Sistema nervoso central (SNC) de cães domésticos e de 3 animais silvestres, dois gambás e um mico, utilizando-se Corno de Ammon (CA), Cerebelo (CB) e Tronco Encefálico (TE). O TE foi à região de maior porcentagem de positivos, seguido do CA. A comparação entre a Coloração de Sellers, e a IFD, revelou uma maior sensibilidade nesta última. Na IFI, observamos que para a realização da técnica torna-se necessário à utilização de material fresco. Tendo em vista a utilização das 117 amostras em estado de autólise apresentaram resultados negativos e apenas 1 não autolisado, teve seu resultado positivo nas 3 regiões cerebrais (CA, CB e TE). Não foi possível a comparação com a técnica de IFI, porque nesse trabalho, a técnica só foi possível em materiais conservados, com a vantagem de uma leitura mais fácil. Nesse trabalho foi detectado também cinomose em um gambá pela técnica de IFD.

Palavras chave: cinomose, imunofluorescência, Coloração de Sellers

## ABSTRACT

BARRETO, Michelle Gomes. **Comparative study of the techniques of Direct Immunofluorescence, Indirect Immunofluorescence and Stain Sellers in samples of nervous tissue of dogs and wild animals for diagnostic of the canine distemper.** Seropédica: UFRRJ, 2006. (Dissertation, Master em Microbiology and Immunology Veterinary).

It was performed a study comparative in the diagnostic of the canine distemper through techniques of Direct Immunofluorescence (IFD), Indirect Immunofluorescence (IFI) and Stain Sellers in samples of nervous tissue of dogs and wild animals that died with suspicion clinical of the viruse. Were utilized 118 samples of central nervous system (SNC) of domestic dogs and 3 wild animals, 2 skunks and 1 monkey, utilizing Ammon's horn (CA), cerebellum (CB) and brain stem (TE). The TE was the region of larger percentage of positive, following of CA. The comparison between Stain Sellers and IFD, this last demonstrated a large sensitive. The IFI observed what to the realization of the technique was necessary the utilization of fresh materials. The utilization of the 117 samples in conditions of autolysis presented negative result. However 1 sample not autolysate, it was result positive in the 3 brain regions (CA, CB, TE). It was not possible the comparative with the technique of IFI, because in the work the technique alone was possible in materials conserved, with the advantage of a read more easy. In the work was detected also canine distemper in a skunk through technique of IFD.

Key words: canine distemper, Immunofluorescence, Stain Sellers



## 1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença viral altamente contagiosa de grande importância em cães domésticos e silvestres, produzindo elevada morbidade e mortalidade (MURPHY *et al.*, 1999). A morbidade da cinomose canina varia de 25 a 75%, e a letalidade varia de 50 a 90%, dependendo da cepa do vírus, sendo que somente a raiva apresenta letalidade mais elevada do que a cinomose (ETTINGER & FELDMAN, 1997).

Dentre os agentes etiológicos que podem provocar um quadro semelhante nervoso, estão sendo considerados o vírus rábico, o adenovírus canino tipo 2, o vírus herpes canina e o vírus da doença de Aujeszky, sendo o vírus da cinomose canina (canine distemper vírus - CDV) o mais diagnosticado histologicamente no México depois do vírus rábico (RAMÍREZ, 1989). A doença, atualmente, é encontrada difundida por todo mundo (BAUMANN, 1999).

Na década de 90, a cinomose foi descrita em muitas espécies que não eram conhecidas como susceptíveis ao vírus (APPEL *et al.*, 1991; BARRET *et al.*, 1992), como por exemplo a hiena que não era considerada como hospedeiro natural do CDV (HASS *et al.*, 1996).

A introdução de vacinas vivas modificadas em 1950 e o uso destas, em animais silvestres, reduziram a incidência do CDV em cães, porém devido ao grande número de espécies susceptíveis ao vírus da cinomose canina e de se tratar de um vírus contagioso, a erradicação em cães é praticamente impossível (APPEL, 1972).

Em recentes anos, um aumento no número de casos de cinomose em populações de cães tem sido informado em vários países, como na Dinamarca (BLIXENKRONE-MOLLER *et al.*, 1993), Estados Unidos (PATRONEK *et al.*, 1995), Japão (KAI *et al.*, 1993; SHIN *et al.*, 1995), Finlândia (EK-KOMMONEN *et al.*, 1997) e Alemanha (HASS *et al.*, 1997).

O diagnóstico da infecção pelo CDV é de difícil realização e geralmente é fundamentado nos sinais clínicos (APPEL & SUMMERS, 1999). Em vários casos o diagnóstico clínico é incerto e alterações hematológicas, bioquímicas e mesmo exames realizados no líquido podem não ser conclusivo. Outro agravante é que 25 a 75% dos animais susceptíveis desenvolvem infecção subclínica e eliminam o vírus no ambiente, atuando como fontes de infecção (MORITIZ *et al.*, 2000; SHELL, 1990).

A identificação do antígeno em impressões ou cortes histológicos de SNC corados por métodos de imunofluorescência é um procedimento que dá bons resultados durante os primeiros dias de sintomas e depois de nove semanas de duração da doença (FAIRCHILD *et al.*, 1967; MOTOHASHI *et al.*, 1969; SIMON-VALENCIA *et al.*, 1987). Dependendo da forma da cinomose e da duração da doença, o estômago, pulmão e bexiga urinária e, numa evolução prolongada do processo, preparações do encéfalo, apresentam a maior e mais constante concentração viral (BAUMANN, 1999).

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho consistem:

1. Padronizar a técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) e Imunofluorescência Indireta (IFI) em tecido nervoso de cães, que morreram com suspeita clínica de cinomose;
2. Comparar as técnicas de IFD, Coloração de Sellers e IFI em tecidos nervosos de cães e de animais silvestres, que morreram com suspeita clínica de cinomose.
3. Avaliar a concentração viral em diferentes regiões cerebrais pela técnica de IFD de cães que morreram com suspeita clínica de cinomose;
4. Detectar o CDV em animais silvestres pelas técnicas de IFD, Coloração de Sellers e IFI;

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Histórico

A cinomose apareceu inicialmente na Europa, na Espanha em 1761, introduzida pela Ásia. Da Espanha espalhou por todo continente Europeu (APPEL, 1972).

A cinomose foi reconhecida como uma doença infecciosa de cães domésticos desde meados do século XIX (APPEL, 1991). Edward Jenner foi o primeiro a descrever o curso e aspecto clínico da doença em 1809 (MURPHY *et al.*, 1999). CARRÉ, em 1905 (apud., APPEL, 1972) demonstrou que a doença era de etiologia viral, inoculando a secreção nasal de cães infectados em cães novos. Descreveu-a como infecciosa, acometendo cães jovens associados com gastroenterite, pneumonia, conjuntivite e encefalomielite. Alguns pesquisadores contestaram a etiologia viral da cinomose, atribuindo a doença a várias bactérias (FERRY, 1912; M'GOWAN, 1911). Em 1926, Laidlaw e Dunkin mostraram definitivamente que a cinomose era de etiologia viral (APPEL, 1972).

GOSS *et al.* em 1948 demonstraram, em esfregaços de conjuntiva e da língua corados pela hematoxilina e eosina, inclusões celulares, de aparência homogênea e de cor vermelho-brilhante, e variáveis no tamanho, na forma (redondas ou ovais) e com contorno irregular. Estas inclusões estão presentes no citoplasma e ocasionalmente no núcleo das células epiteliais.

O CDV foi isolado primeiramente em células de rim de cão em 1959. (GRIFFIN & BELLINI, 1996).

### 3.2 Classificação e Morfologia

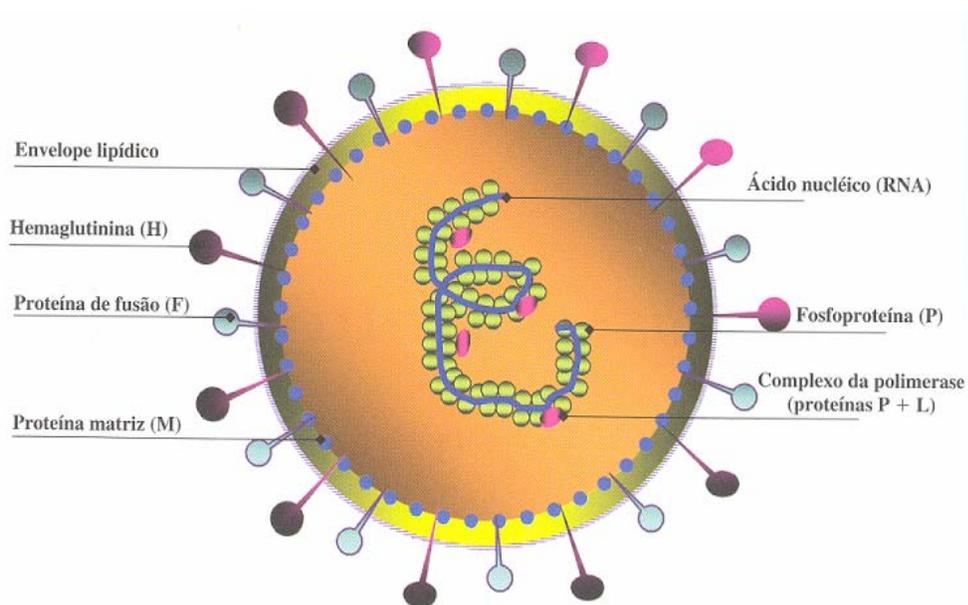
O vírus da cinomose está classificado na família *Paramyxoviridae*. A família *Paramyxoviridae* foi reclassificada em 1993 pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus dentro de duas subfamílias: Pneumovirinae contendo o gênero *Pneumovirus* (vírus que infectam humanos, bovinos e perus) e a subfamília *Paramyxovirinae* contendo três gêneros, *Parainfluenzavirus*, que incluem: parainfluenza bovino tipo 3, parainfluenza humano tipo 1 e 3, parainfluenza murino tipo 1 e parainfluenza símio tipo 10; *Rubulavirus* que incluem: paramyxovírus aviário tipos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, parainfluenza humano tipo 2, 4a e 4b; e caxumba; e *Morbillivirus* que incluem: o vírus da cinomose canina (CDV), vírus do sarampo, vírus da peste bovina, vírus da peste dos pequenos ruminantes e morbillvírus de mamíferos aquáticos (LAMB & KOLAKOFSKY, 1996; CARTER *et al.*, 2004). Esses vírus estão antigenicamente relacionados e consistem apenas de um único sorotipo. (APPEL & SUMMERS, 1999, BROOKS *et al.*, 1998; GOODHEART, 1969).

Apresenta simetria helicoidal, é geralmente esférico com tamanho que varia de 150 a 300 nm de diâmetro, mas pode ser pleomórfico. O nucleocapsídeo viral está envolvido por um envelope lipoprotéico que contém espículas de 9 a 13 nm de comprimento, podendo ser visualizado por microscopia eletrônica (HIRSH & CHUNGZEE, 1999).

Essas espículas são constituídas de duas glicoproteínas transmembranas diferentes. As atividades destas glicoproteínas de superfície ajudam a distinguir os

gêneros da família Paramyxoviridae. A glicoproteína maior H pode exercer tanto atividade de hemaglutinina quanto à da neuramidase, mas, no caso do CDV, não possui hemaglutinina e neuramidase. Essa glicoproteína é responsável pela adsorção da partícula viral ao receptor celular. A outra glicoproteína, (F) está envolvida na fusão e penetração do vírus à célula hospedeira. Três proteínas estão associadas ao RNA viral, a proteína N, a proteína F e a proteína L. A proteína M está localizada na face interna do envelope e interage com as 000proteínas H e F e com o nucleocapsídeo, exercendo um papel importante na maturação do vírion (BARRETT *et al.*, 1985; BARRETT *et al.*, 1987; CORRÊA & CORRÊA, 1992; GALINSKI, 1991; BELLINI, 1995; DIALLO, 1990, MURPHY *et al.*, 1999).

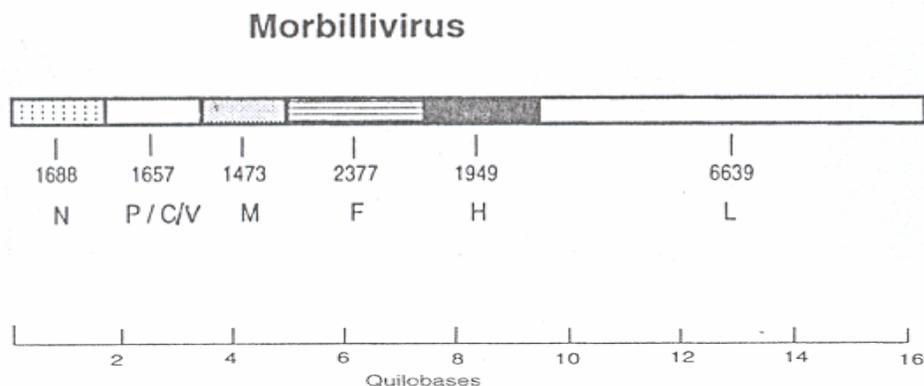
Os vírions podem conter actina como componente estrutural (LAMB & KOLAKOFSKY, 1996; TYRREL & NORRBY, 1978). Esses filamentos de actina estão envolvidos no brotamento da membrana plasmática. Presumidamente a actina pode interagir com o nucleocapsídeo e pode aumentar a estabilidade do vírion (BOHN *et al.*, 1986).



**Figura 1** - Representação esquemática de um *Morbillivirus* (SANTOS *et al.*, 2002)

### 3.3 Genoma viral

Possui genoma constituído de RNA de filamento único, linear com polaridade negativa, com massa em torno de  $4,5 \times 10^6$  (BELLINI *et al.*, 1986; SANTOS *et al.*, 2002, VAINIONPAA *et al.*, 1989). O genoma contém cerca de 15.690 nucleotídeos, com tamanho de 16-20 kb, organizado em seis unidades transcricionais (ORFs) ou genes que codificam oito proteínas [nucleoproteína (N), fosfoproteína (F), proteína rica em cisteína (V), proteína não estrutural (C), proteína matriz (M), proteína de fusão (F), hemaglutinina (H), e uma polimerase/transcriptase (L)]. Cada unidade transcricional codifica um único RNAm, com exceção de uma unidade que codifica três proteínas, essas proteínas são P/C/V (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).



**Figura 2** – Representação esquemática do genoma do *Morbillivirus* (LAMB & KOLAKOFSKY, 1996)

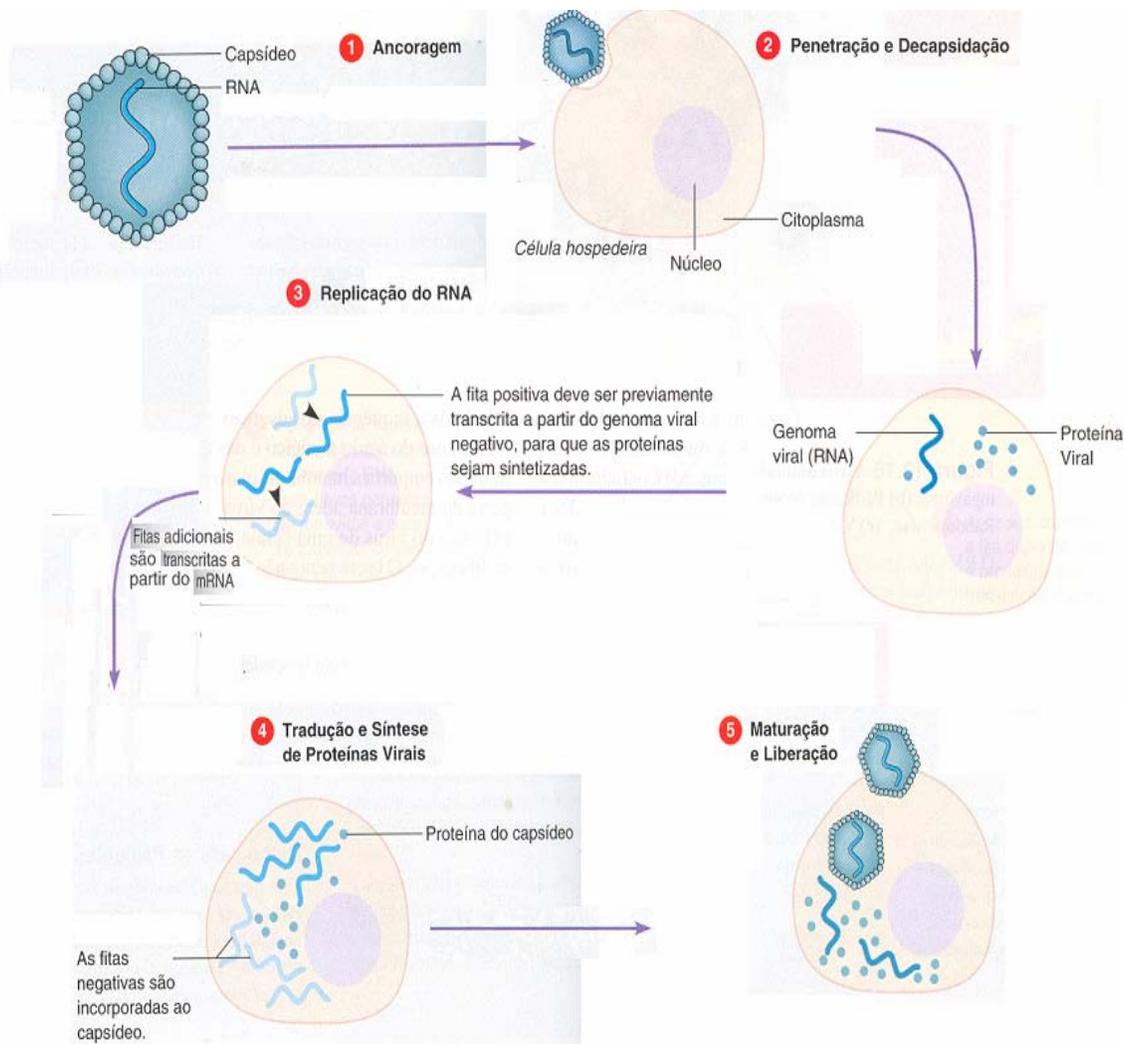
### 3.4 Replicação

A replicação do CDV ocorre no citoplasma. Os paramyxovírus fixam-se às células hospedeiras através da glicoproteína H. A proteína F vai mediar a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, em pH fisiológico, sendo o nucleocapsídeo liberado no citoplasma. A proteína F constitui um fator essencial na infecção e na patogenia dos paramyxovírus. Essa proteína é altamente conservada entre os *Morbillivirus* e é sintetizada na forma de um precursor inativo, F<sub>0</sub>. Para adquirir atividade biológica, o precursor deve ser clivado por proteases da célula hospedeira, dando origem a F<sub>1</sub> e F<sub>2</sub> (BROOKS *et al.*, 1998; LAMB e KOLAKOFSKY, 1996; SANTOS *et al.*, 2002; VAINIONPAA *et al.*, 1989).

A produção de uma protease adequada capaz de clivar o precursor F<sub>0</sub> constitui um importante determinante da permissividade da célula hospedeira *in vitro* e, provavelmente, na gama de hospedeiros e do tropismo tecidual *in vivo*. (BROOKS *et al.*, 1998).

O RNA é transcrito pela polimerase viral em RNAm, que servirá tanto como molde da fita negativa do genoma para a replicação, como para a tradução dos genes em proteínas virais. As proteínas virais são traduzidas nos ribossomos livres, exceto as duas proteínas do envelope (H e F) que são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso e, posteriormente transportadas para o complexo de Golgi, onde sofrem uma etapa final do processamento. (LAMB e KOLAKOFSKY, 1996).

Os nucleocapsídeos são montados no citoplasma e migram para a superfície celular. Eles se ligam em locais na membrana onde estão inseridas as glicoproteínas virais H, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e liberados da célula pelo processo de brotamento, adquirindo um envoltório lipoprotéico, derivado da membrana da célula hospedeira. A proteína M é essencial à formação das partículas, servindo como ligação entre o envoltório viral e o nucleocapsídeo. A proteína F ativada promove a fusão da célula infectada com a membrana de células adjacentes resultando na formação de sincícios, possibilitando a disseminação do vírus entre células (LAMB & KOLAKOFSKY, 1996; SANTOS *et al.*, 2002, VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).



**Figura 3** - Representação do ciclo replicativo dos paramyxovírus (TORTORA *et al.*, 2003)

### 3.5 Resistência aos Agentes Físicos e Químicos

O CDV é sensível a fatores ambientais, como temperaturas e pH, e a diversos desinfetantes, como o éter e os solventes lipídicos. É inativado por luz natural, luz ultravioleta. Portanto, em climas quentes, não sobrevive nos canis após os cães terem sido retirados. É inativado também ao aquecimento a 55 °C por 1 hora, e a 60 °C por 30 minutos (GORHAM, 1966). O vírus pode sobreviver em tecidos por 48 horas a 25 °C e por 14 dias a 5 °C. A estabilidade ótima está em torno de pH 7,0. A infectividade viral é perdida em pH acima de 10,4 ou abaixo de 4,4. (HIRSH & CHUNGZEE, 1999).

Persiste por várias semanas entre 0 °C - 4 °C e a -76 °C ou liofilizado por sete anos ou mais. É inativado com formol a 0,5% em quatro horas; com fenol a 0,75% em 10 minutos a 4 °C e com desinfetantes constituídos por amônia quartenária a 0,3% em 10 minutos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Deve-se ter em mente que a maioria dos estudos sobre inativação viral são conduzidos em condições laboratoriais. Vírus instáveis, como o CDV, podem persistir por longo tempo em ambientes gelados e escuros ou no soro e restos tissulares (HIRSH & CHUNGZEE 1999)

### 3.6 Epidemiologia

O cão constitui o reservatório mais importante do CDV. A importância epidemiológica das espécies selvagens, todavia, necessita ser investigadas com mais detalhes (BAUMANN, 1999).

O CDV é enzoótico, na maior parte do mundo, exceto em regiões quentes e áridas (APPEL, 1987). Surto da doença em cães continua ocorrendo no mundo todo, em países desenvolvidos e em países em desenvolvimento, tanto em cães vacinados como em não vacinados. A epizootia, em cães ocorre em áreas isoladas onde não há a circulação viral por muitos anos e onde há uma população de cães altamente susceptíveis (LEISEWITZ *et al.*, 2001).

A infecção pelo CDV ocorre em animais de todas as faixas etárias, os filhotes, com idade inferior a três meses, parecem ser os mais susceptíveis, pois coincide com a época em que diminui a taxa de anticorpos maternos passivamente transmitidos (RUDE, 1987; SHELL, 1990). Animais que não possuam anticorpos maternos podem contrair a enfermidade bem cedo e, devido ao pouco desenvolvimento do seu sistema imunológico, são acometidos de uma maneira bastante grave. Há casos de animais com mais de 7 anos que adquirem a cinomose, ou por alteração da imunidade ou porque nunca tiveram contato com o vírus (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Os animais infectados e doentes eliminam o agente produtor pelas secreções nasais e lacrimais, assim como pela saliva e urina. Nas fezes nem sempre se consegue evidenciar o vírus. A urina do cão mantém a capacidade infectante por 55 dias (BAUMANN, 1999).

Na década de 90, a cinomose canina reapareceu na Finlândia após 16 anos de ausência de relato da doença no país. Entre 1994 e 1995 ocorreu um surto de cinomose canina nesse mesmo País, em áreas com grande densidade populacional de cães, envolvendo, inclusive, cães vacinados. O número estimado de casos foi aproximadamente de 5.000 cães, sendo que 865 casos foram confirmados por imunofluorescência indireta de células epiteliais de 3.649 amostras. Dos casos confirmados, 73% eram de cães entre três meses a dois anos de idade e 41% destes cães tinham histórico de vacinação completa (EK-KOMMONEN *et al.*, 1997).

Na Suécia a frequência das infecções causadas pelo parvovírus canino, pelo vírus da cinomose canina e pelo vírus da hepatite infecciosa canina, é monitorada pelo Ministério da Agricultura daquele país, para o qual todas as infecções primárias devem ser notificadas (OLSON *et al.*, 1988).

Além da família *Canidae* (cão doméstico, cão selvagem, lobo, raposa, coiote e chagal) outras famílias de carnívoros terrestres são susceptíveis à infecção pelo vírus da cinomose: *Felidae* (leão, tigre), *Hyaenidae* (hiena), *Procyonidae* (jupará, guaxinim, quati), *Mustelidae* (doninha, furão, texugo, gambá e marta), *Viverridae* (lêmure), *Ursidae* (urso, panda) e carnívoros aquáticos: *Phocidae* (foca) (ANDERSON, 1995; APPEL & SUMMERS, 1999; DEEM *et al.* 2000; MOLL *et al.*, 1995; DITERS & NIELSEN, 1978; WOOD *et al.*, 1995; WOLF *et al.*, 1986).

O CDV tem sido estabelecido como um vírus que provoca doença em ambiente aquático, em ambos *habitats* marinhos e de água doce. Todos pinípedes (focas, leões-marinhos, lobos-marinhos e morsas) podem ser um risco sério para infecção com CDV (BARRETT, 1999).

Em 1987, o CDV matou milhares de focas siberianas (*Phoca sibirica*) no lago Baikal, Rússia (GRACHEV *et al.*, 1989). Durante as expedições do início do século passado para a conquista do pólo sul, acreditava-se que os cães utilizados para o transporte de trenós tenham transmitido o vírus da cinomose canina às focas habitantes da costa da Antártida, levando a ocorrência de extensa mortalidade nestes animais.(BARRETT *et al.*, 1992; HARVELL, *et al.*, 1999). Focas do Ártico também poderiam ter sido infectadas com CDV por várias centenas ou milhares de anos atrás, através do contato com carnívoros terrestres como lobo, raposa, cão e urso polar.(BARRETT, 1999).

Foi estimado que mais de 10.000 focas (*Phoca caspian*) morreram durante abril e maio de 2000 ao longo da costa Kazakhstan, evidenciado o CDV como causa primária dessas mortes (KENNEDY *et al.*, 2000).

O cachorro do mato africano (*Lycan pictus*), em 1991, foi extinto da região do Chobe National Park, Botswana, com o possível envolvimento do CDV disseminado por cães domésticos pertencentes a moradores do entorno dessa região (ALEXANDER *et al.*, 1996). Carnívoros selvagens podem ser uma fonte potencial de infecção do CDV para cães e vice-versa (MOLL *et al.*, 1995)

Uma infecção pelo CDV ocorreu em leopardos (*Panthera pardus*), leões (*Panthera leo*), tigres (*Panthera tigris*), e no jaguar (*Panthera onca*) em 1991 e 1992 no Wildlife Waystation, São Fernando, Califórnia, com 17 mortes (APPEL *et al.*, 1994).

Em 1994, no Parque Nacional Serengeti, Tanzânia, 30 leões morreram de CDV, como uma possível fonte de infecção também o cão doméstico das comunidades locais (MELODY, 1996). No Japão, a provável fonte de infecção dos leões com cinomose do zoológico foi atribuída ao cão (ENDO *et al.*, 2004)

KATHY QUIGLEY (2005) relatou o primeiro caso de cinomose no tigre Siberiano na Rússia, suspeitando que o tigre contraiu a doença de cães domésticos infectados.

Para ANDERSON (1995), no entanto, a cinomose continua sendo importante e põe em perigo a vida das espécies silvestres mantidos livres e em cativeiro, mas a ocorrência nesses animais tem pouca ou nenhuma significância para seu controle em animais domésticos.

REGO *et al.*(1997) informou o aparecimento da cinomose em espécies silvestres nativas do território brasileiro das seguintes espécies: lobo (*Crisocyon brachyurus*), raposa (*Cerdocyon thous*) e cachorro do mato (*Galictis vittata*).

A análise do International Studbook for the Maned Wolf revelou as principais causas da morte de lobos guarás em cativeiro no período de 1980-97, sendo a cinomose canina e a parvovirose canina responsáveis por 4% de mortes de lobos-guará (MAIA *et al.*, 1999).

Em 2000, o CDV matou 49 dos 52 cães selvagens mantidos em cativeiro na Tanzânia (MARCO *et al.* 2002). Isso demonstra que as epidemias de CDV podem ser catastróficas.

Infecções clínicas aparentes ocorrem também no macaco japonês (*Macaca fuscata*) (YOSHIKAWA *et al.* 1989).

A cinomose tem sido implicada na doença e mortalidade em pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*) (QIU & MAINKA, 1993). Em uma prova sorológica para CDV, feita na Reserva de Wolong na China, em 8 pandas, dois deles apresentavam anticorpos CDV. (MAINKA *et al.*, 1994).

MARSÍLIO *et al.*, (1997), relatou o primeiro caso de cinomose no urso marrom (*Ursus arctos marsicanus*) no Parque Nacional de Abruzzo, na Itália.

Gatos domésticos são conhecidos por serem susceptíveis ao CDV sem desenvolvimento da doença clínica (APPEL *et al.*, 1974, HARDER *et al.*, 1996). Suínos infectados com o vírus podem desenvolver broncopneumonia (BAUMANN, 1999). Os hamsters e camundongos podem ser infectados experimentalmente, com o vírus (CORRÊA & CORRÊA, 1992). O CDV pode infectar o porco selvagem (APPEL *et al.*, 1991).

### 3.7 Patogenia

A infecção ocorre via inalação dentro do trato respiratório, como também por ingestão. Seguindo uma infecção inicial no epitélio respiratório e macrófagos alveolares, o vírus é transferido dentro de 2 dias para células mononucleares dos linfonodos bronquiais e tonsilas. Durante a primeira semana de exposição, antes do início dos sinais clínicos, o vírus passa através da corrente sanguínea para a medula óssea, baço, timo, linfonodos cervicais e mesentéricos e na lâmina própria do estômago e intestino (MURPHY *et al.*, 1999).

Por cerca de 10 dias pós-infecção, o vírus se estende em locais de replicação primária para tecidos epiteliais e sistema nervoso central (SNC). Para SUMMERS *et al.*, (1979) o exato mecanismo de entrada do vírus da cinomose canina (CDV) dentro do sistema nervoso central (SNC) não está bem esclarecido. O CDV pode ser facilmente achado nas células do plexo coróide e epêndima, sugerindo a entrada do vírus dentro do tecido cerebral através do líquido cerebrospinal (CSF), presumivelmente por células imune infectadas. No CSF, o vírus pode ser detectado em células mononucleares (HIGGINS *et al.*, 1982).

A distribuição do vírus, após 8 a 9 dias, é dependente da resposta imune do hospedeiro. Se a resposta imune for rápida e efetiva ocorre a recuperação completa e a eliminação do vírus (em torno de 14 dias) com ausência ou sinais clínicos suaves. Se a resposta imune falhar o resultado é a disseminação rápida do vírus para todos os tecidos epiteliais e o SNC, resultando no aparecimento de sinais clínicos multissistêmicos (GREENE & APPEL, 1990).

Os sintomas decorrentes dessa generalização do processo podem, eventualmente, desaparecer à medida que o nível de anticorpos aumenta, com a subsequente eliminação do vírus da maioria dos tecidos. A severidade da doença apresentada pelos animais susceptíveis é, quase sempre, inversamente proporcional à resposta imune. (HAGIWARA, 1985).

Cães infectados eliminam vírus nas secreções nasal e ocular durante o curso da doença. O vírus está presente na urina de cães experimentalmente infectados 6 a 22 dias após exposição ao CDV. Fezes de cães infectados também contem vírus. A

doença é transmitida por aerossol, por gotículas infectantes provenientes de secreções corporais de animais infectados ou por contato direto (HIRSH & CHUNGZEE, 1997).

### 3.8 Sintomas Clínicos

Os sintomas clínicos observados na infecção pelo CDV variam dependendo da virulência da cepa viral, condições ambientais, idade e estado imune do hospedeiro (GREENE & APPEL, 1990).

O período de incubação de 3 a 7 dias termina com uma elevação bifásica da temperatura. Ao primeiro pico de febre de 39,5 – 41,0 C°, que dura 8 - 48 horas e põe em evidência o estado virêmico, segue um intervalo sem febre de 1 a 2 dias e uma segunda elevação da temperatura, cuja intensidade depende da gravidade das alterações orgânicas (BAUMANN, 1999).

A doença pode apresentar nas formas: superaguda, aguda e crônica. A forma superaguda da cinomose, leva a morte em 2 a 3 dias com febre elevada é rara, sendo mais freqüente a forma de evolução aguda. Na fase seguinte da doença, que corresponde com o segundo pico febril, é desenvolvido o quadro correspondente a cinomose catarral, exantemático ou nervoso, dependendo da difusão e virulência do vírus. Nesse estágio há ocorrência de uma severa leucopenia (BAUMANN, 1999, MURPHY *et al.*, 1999).

De acordo com CORRÊA (1966); CARTER *et al.*, (2005); SCHLINGMAN, (1993), GEBARA *et al.*, (2004); TIPOLD, (1995); SUMMERS (1984); OZKUL *et al.* (2004); PELLEGRINO *et al.*,(2003), ao complexo dos sintomas oculares, respiratórios, digestivos, exantemáticos e nervosos pertencem:

#### Sintomas Oculares:

Conjuntivite, de início seroso, depois mucoso e após purulento;  
Alopecia periorbital, devido ao exudato irritante;

#### Sintomas Respiratórios:

Espirros, sendo que a descarga nasal se acumula ao redor das narinas, como crostas secas;

Laringite e Bronquite; prosseguindo o processo respiratório, aparecerá traqueíte, bronquiolite, evoluindo para uma broncopneumonia;

#### Sintomas Gastrointestinais:

Vômitos  
Diarreias

#### Sintomas Cutâneos:

Exantema vesiculopustuloso, localizado predominantemente na parte posterior do abdome e face interna das coxas, assim como no conduto auditivo externo;

Hiperqueratose do coxim plantar, pele e nariz;

#### Sintomas Nervosos:

Sintomatologia cerebral: perturbações psíquicas, sensitivas, motoras e convulsões;

Sintomatologia bulbar: salivação abundante, paralisia lábio-glosso-laríngea;  
 Sintomatologia medular: mioclonias nos membros anteriores e/ou posteriores, paraplegias e tetraplegias;  
 Sintomatologia cerebelar: incoordenação motriz, com quedas freqüentes.

A forma nervosa pode apresentar-se no final da fase aguda da cinomose ou no instante em que o animal parecia estar curado, apesar de que também pode predominar desde o princípio em alguns surtos epidêmicos na evolução da doença (BAUMANN, 1999).

Para TIPOLD *et al.* (1992), os sintomas nervosos da cinomose podem ocorrer meses ou anos após uma infecção sistêmica. Segundo WHEELER (1995), é a doença infecciosa do sistema nervoso mais comum no cão.

O sinal mais comum na fase nervosa da cinomose é o aparecimento de mioclonias, que são constatadas mais comumente nos músculos faciais, mastigatórios e apendiculares (BRAUND, 1994) e foram consideradas patognomônicas da cinomose (JONES *et al.*, 2000).

Evidentemente a localização dessas mioclonias está ligada às áreas lesadas do cérebro e medula, com conseqüente irritação ao estímulo neuronal, ou depressão de áreas bloqueadas dos núcleos da base, deixando assim livres os estímulos irritativo-inflamatórios corticais que dão origem as mioclonias (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Há casos em que os animais, devido a meningoencefalite, estão agressivos, simulando raiva, e devido a mioclonia dos músculos mastigatórios, apresentaram sialorréia. Isto ocorre devido a polioencefalomalácia dos lobos temporais. Esta forma específica de encefalite causada pelo CDV afeta principalmente o córtex piriforme, o hipocampo e as estruturas profundas dos lobos temporais (LISIAK & VANDELVE, 1979; BRAUND, 1981; BRAUND, 1994; HIGGINS, 1982; VANDELVE *et al.*, 1980).

Um dos sintomas menos freqüente da cinomose é a hipoplasia do esmalte dentário em cães jovens que adquiriram a infecção antes da erupção da dentição permanente; A lesão, uma vez instalada, persiste por toda a vida do animal (HAGIWARA, 1985).

### **3.9 Encefalite por cinomose**

As propriedades imunossupressoras e neurotrópicas da cepa infectante e a resposta imune adequada por parte do hospedeiro são os fatores que interferem na disseminação do vírus para o SNC, no tipo de lesão produzido e na evolução do processo (HAGIWARA, 1985).

São descritas três formas de encefalite: uma que afeta cães novos, de caráter severo e agudo, na qual os sinais sistêmicos ocorrem ao mesmo tempo em que os neurológicos; outra que atinge cães adultos, do tipo crônica, na qual os distúrbios neurológicos podem aparecer desacompanhados de transtornos sistêmicos por apresentarem aumento no título de anticorpos contra o CDV (BRAUND, 1994). O outro tipo de encefalite crônica é a encefalite do cão idoso, que é de freqüência rara (ETTINGER & FELDMAN, 1997).

#### **3.9.1 Encefalite dos cães jovens**

É acompanhada de sintomas sistêmicos. Os sinais neurológicos são muito variáveis e usualmente sugerem uma distribuição multifocal das lesões. Os sinais corticais e subcorticais incluem os espasmos semelhantes aos da epilepsia, e muita das vezes há mudança da personalidade, tais como depressão e desorientação.

Sinais de localização do tronco cerebral incluem incoordenação, hipermetria, quedas, cabeça inclinada, nistagmo. Ocasionalmente há monoplegia ou paraplegia. O sinal característico desta encefalite é a mioclonia ou espasmos flexores. Usualmente estas mioclonias persistem durante o sono (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

As alterações histopatológicas observadas, determinadas por esta encefalite, incluem lesão desmielinizante multifocal aguda, grave, com necrose da substância branca e corpúsculos de inclusão em astrócitos (GEBARA, 2004a; JONES *et al.*, 2000).

### **3.9.2 Encefalite multifocal dos cães adultos**

Aparecem freqüentemente entre os quatro e seis anos, e esta encefalite tem curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincide com sinais sistêmicos que são vistos em cães novos.

Os sinais neurológicos incluem fraqueza dos membros pélvicos, incoordenação motora generalizada, quedas ocasionais, tremores na cabeça e mioclonia, que podem ou não estar presentes (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

O tipo de lesão que esta encefalite causa nos cães é a encefalite desmielinizante multifocal crônica, grave, associada a corpúsculos intracitoplasmáticos e intranucleares eosinofílicos.

Os cães que desenvolvem esse tipo de lesão apresentam aumento no título de anticorpos contra o CDV (GEBARA, 2004a; RUDE, 1987; SHELL, 1990).

### **3.9.3 Encefalite dos cães velhos**

A encefalite do cão velho é um distúrbio progressivo, detectado geralmente em cães com mais de 6 anos de idade (ETTINGER & FELDMAN, 1997), porém já foi encontrado em animais com menos de 6 anos de idade (BRAUND, 1994).

É subaguda ou crônica, não há sintomas sistêmicos. O mais comum sinal neurológico é a diminuição visual. É uma enfermidade progressiva e acompanhada pelo desenvolvimento de depressão mental, andar compulsivo em círculos, mudança de personalidade e falho em reconhecer pessoas, objetos e outros animais. Sinais de envolvimento do tronco cerebral são raros (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Semelhanças clínicas, patológicas e imunológica entre encefalite do cão velho e a panencefalite esclerosante subaguda do homem (SSPE) tem sido investigada por alguns pesquisadores (LINCOLN *et al.*, 1973; VANDEVELDE *et al.*, 1980). A SSPE é causada pela persistência do vírus do sarampo no sistema nervoso central, determinando uma encefalopatia progressiva, com mudança de personalidade, deterioração mental, movimentos involuntários, rigidez muscular e morte. Normalmente começa 4 a 17 anos após o paciente ter sido recuperado do sarampo (BELLINI, 1995).

Na encefalite do cão velho, há desmielinização, gliose e fibrosamento, e pode haver sinais de atividade recente, com infiltração mononuclear perivascular (CORRÊA

& CORRÊA, 1992).

### **3.10 Diagnóstico**

De acordo com os clínicos veterinários, o diagnóstico da CDV na forma aguda ou subaguda tem sido feito usualmente baseado em sinais clínicos e históricos de cães não vacinados. Entretanto existe a dificuldade para diferenciar CDV de outras doenças, e o diagnóstico fica apenas presumível.

Segundo BELLINNI (1995) a confirmação laboratorial da cinomose é realizada através do diagnóstico virológico, sorológico, histopatológico e molecular.

#### **3.10.1. Diagnóstico virológico**

O diagnóstico virológico é realizado pela pesquisa de partículas virais viáveis através do isolamento do vírus da cinomose.

##### **3.10.1.1. Isolamento do vírus da cinomose**

O isolamento é realizado pela inoculação de sangue e fragmentos de tecido tais como: pulmão, bexiga, estômago e cérebro; em ovos embrionados, cultivo celular e em animais de laboratório (CARTER *et al.*, 2005).

#### **I. Ovos embrionados**

Vários vírus podem ser propagados na membrana córioalantóide de ovos embrionados de galinha (FONSECA, 1994). Em 1948, o CDV foi mantido pela primeira vez em passagens em série em ovos. A cepa desenvolvida foi designada “Onderstepoort”. A virulência foi baixa para furões após a 25 passagens. Em 1949, outra cepa foi desenvolvida e adaptada em ovos, foi chamada “Lerderle”, tendo a virulência baixa entre 24 e 28 passagens (APPEL, 1972). Estas cepas têm sido usadas amplamente para vacinação da cinomose em animais susceptíveis (WINTER, 2004).

As cepas Onderstepoort e Lerderle, produziram na membrana córioalantóide, hiperplasia no epitélio um dia após inoculação, edema e proliferação de células mesenquimais que eram observadas 2 dias pós inoculação. Algumas células epiteliais mostraram picnose e cariorrexe. Após 5 dias, a reação inflamatória era mais evidente, com infiltração leucocitária (APPEL, 1972).

#### **II. Cultivo celular**

O diagnóstico pode ser feito isolando o CDV em cultura de tecido. Entretanto, o isolamento do vírus leva muitos dias ou semanas e, frequentemente, não se obtém sucesso se o cão afetado não estiver no estágio agudo da infecção (APPEL, 1973; APPEL, 1987).

Uma vez adaptado a cultura de tecido, o vírus pode ser propagado em vários tipos celulares de diferentes espécies. O CDV pode ser adaptado em células de cão, furão, ave, bovino e humano. Cultura de células primárias tem sido empregada para adaptação. Células de rim de cão, fibroblasto de embrião de galinha e rim de macaco

verde são comumente usadas para trabalhos experimentais e produção de vacinas (APPEL, 1972; LEDNICKY *et al.*, 2004).

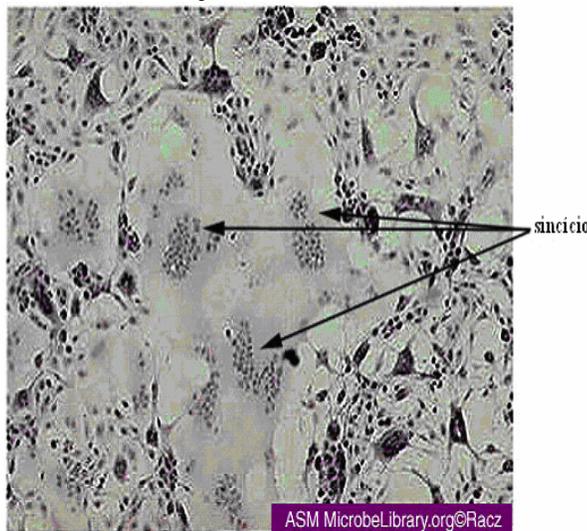
O CDV pode ser cultivado em culturas primária e contínua. O isolamento do CDV virulento tem-se mostrado difícil em cultura de células de rotina. O sucesso maior da replicação viral ocorre durante a cultura direta do tecido alvo, como linfócitos e macrófagos do hospedeiro infectado. Culturas de macrófagos alveolares detectam o vírus em 24 a 48 horas. (GREENE & APPEL, 1990).

Recentemente, linfócitos B de sagüi (B95a) mostraram ser altamente susceptível para o isolamento do CDV (KAI *et al.*, 1993).

## II.A. Efeito citopático

O CDV quando replicado em culturas de células VERO e outras linhagens permissivas, geralmente resulta em mudanças citopáticas, como a formação de células estreladas e pela formação de sincícios, que é a fusão de célula-célula resultando em células gigantes, algumas com 50 ou mais núcleos rodeados por uma única membrana citoplasmática durante o curso da infecção (MURPHY *et al.*, 1999; BELLINI, 1995; KRAKOWKA *et al.*, 1985).

Também o CDV induz a formação de sincício *in vivo* (MORO *et al.*, 2002).



**Figura 4- Formação de sincício**

A apoptose, que é um mecanismo de morte celular programado, é visto na infecção pelo CDV *in vivo* (KUMAGAI *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2002; MORO *et al.*, 2003) e *in vitro* (GUO & LU, 2000). O tempo e a intensidade para a ocorrência do efeito citopático, varia grandemente entre cepas, diferentes tipos celulares, diferentes meios e condições de incubação. Células jovens são sempre mais susceptíveis e produzem efeito citopático mais evidente do que células envelhecidas (APPEL, 1972).

As culturas podem ser examinadas pela técnica de anticorpo fluorescente, quando o efeito citopático não for observado dentro de 48 a 72 horas pós-infecção (GREENE & APPEL, 1990), e pela inibição da hemadsorção (APPEL, 1972).

De acordo com MURPHY *et al.*, (1999), podem ser necessárias várias passagens para mudanças citopáticas serem observadas.

### III. Em animais de laboratório

O vírus pode ser adaptado a furões, camundongos suíços jovens e hamsters desmamados (HIRSH & CHUNGZEE, 1999).

A via de inoculação nesses animais pode ser a intranasal, parenteral e intracerebral.

Furões quando inoculados pela via intranasal desenvolvem febre, conjuntivite, apatia e morte (APPEL, 1972).

A identificação do agente produtor utilizando o furão é extraordinariamente segura, mas, certamente, requer bastante tempo por ter que transcorrer um período de incubação de 8 a 12 dias, além disso, é bastante onerosa. Por estas razões, a prova foi substituída, praticamente, pela técnica das culturas celulares (BAUMANN, 1999).

Camundongos e hamsters quando infectados experimentalmente pela via intracerebral desenvolvem sintomas neurológicos e alguns culminam com a morte (APPEL, 1972).

#### 3.10.2. Diagnóstico sorológico

Vários testes sorológicos são empregados no diagnóstico da cinomose.

Os mais utilizados são a imunofluorescência (IF), a reação Imunoenzimática (ELISA) e a fixação do complemento (FC').

##### 3.10.2.1. Imunofluorescência

A técnica da IF tem adicionado uma nova dimensão no diagnóstico específico do CDV.

A imunofluorescência é, geralmente, feita em impressões do epitélio respiratório, conjuntiva, tonsila, sedimento da urina, medula óssea, estômago, pulmão e encéfalo (GREENE & APPEL, 1990; BAUMANN, 1999; KRISTENSEN & VANDEVELDE, 1978).

Existem 2 tipos básicos de imunofluorescência: Direta (IFD) e Indireta (IFI).

No procedimento direto, o anticorpo anti-cinomose é marcado com o corante isotiocianato de fluoresceína. Já no procedimento indireto, o teste é realizado em duas etapas, na primeira etapa, anticorpos anti-cinomose não marcados são adicionados, numa segunda etapa, um anticorpo antiimunoglobulina conjugado com fluoresceína é adicionado (SANTOS *et al.*, 2002).

A técnica de imunofluorescência direta aplicada ao diagnóstico do CDV é utilizada desde 1956 (MOUTOM, 1956 apud QUEIRÓZ DA SILVA *et al.*, 1999) sendo um dos métodos mais sensíveis e específicos na detecção dos antígenos virais (FERNANDES *et al.*, 2004; ORTEGA-RODRIGUES *et al.*, 1989).

No Brasil, sua utilização para o diagnóstico da cinomose foi feito, primeiramente, por KOTAIT *et al.*, (1990), e, mais tarde, por QUEIROZ DA SILVA *et al.*, (1999).

A técnica de imunofluorescência, quando utilizada em esfregaços do epitélio conjuntival, apresenta um alto grau de sensibilidade, mas é, em geral, somente detectada no início da infecção, antes do desenvolvimento dos sinais neurológicos (COFFIN & LIU, 1957; MOTOHASHI, *et al.*, 1969).

### 3.10.2.2. ELISA

O diagnóstico sorológico pode ser realizado pela mensuração da IgG e IgM anti-CDV, utilizando ensaio imunoenzimático (BLIXENKRONE-MOLLER, 1991; GEMMA *et al.*, 1995; NOON, 1988), mas constitui um problema em cães vacinados (GUY, 1986; SOMA *et al.*, 2003). Os anticorpos da classe IgM podem ser detectados no sangue, na fase aguda da doença, indicando infecção recente pelo CDV. Os anticorpos específicos da classe IgG começam aparecer logo depois da fase aguda da doença, desde os primeiros dias e, geralmente, continuam sendo detectados muitos anos após infecção (APPEL, 1987).

De acordo com ETTING & FELDMAN (1997), testes sorológicos podem, ou não, ser de valia para o diagnóstico da cinomose aguda, porque os cães com cinomose geralmente deixam de responder imunologicamente. Cães que se recuperam de cinomose aguda apresentam títulos mais baixos de anticorpos, com relação aos cães com infecções inaparentes.

VON MESSLING *et al.*, (1999), demonstrou uma nova técnica de ensaio imunoenzimático do tipo “capture-sandwich”, que usa a proteína do nucleocapsídeo expressada em baculovírus recombinante de um tipo selvagem isolado recentemente (2544/Han 95), para detecção de anticorpos específicos para CDV, em soro canino.

### 3.10.2.3. Fixação de complemento

LAIDLAW & DUNKIN (1931), foram os primeiros a empregar o teste de fixação de complemento, na tentativa de estimar o conteúdo viral em vários tecidos. Os anticorpos fixadores de complemento desenvolvem de 3 a 4 semanas após infecção inicial.

### 3.10.3. Diagnóstico histopatológico

O CDV produz corpúsculos de inclusão intranuclear ou intracitoplasmáticos nos neurônios e em outros órgãos (HEADLEY & GRAÇA, 2000), que podem ser corados pelo método de Sellers no qual apresentam coloração acidófila (PEIXOTO *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2004). Podendo ser coradas também pelos corantes de Giemsa e o de May Grunwala (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Segundo GREENE & APPEL (1990) o significado morfológico da inclusão viral da cinomose não é completamente conhecido. Histologicamente é composto por agregados de nucleocapsídeos e “debris” celulares resultantes da ação vírica.

Essas inclusões são encontradas também, em pequeno número em linfócitos e ainda menor em neutrófilos e hemácias. Nos linfócitos e neutrófilos tem mais ou menos 3 nm de diâmetro, quase sempre ovais e são acinzentadas. Nas hemácias são arredondadas, periféricas e com coloração azul brilhante (GOSS *et al.*, 1948). Esses corpúsculos foram descritos pela primeira vez por Lentz em 1907. Essas inclusões acidófilas são semelhantes aos corpúsculos de Negri, da raiva, com a diferença que estes últimos possuem uma estrutura interna, que não ocorre nos da cinomose (BAUMANN, 1999; CORRÊA, 1966).

PEIXOTO *et al.* (2002), usou a técnica de Coloração de Sellers para diagnosticar

cinomose e assim diferenciar da raiva. Foram examinadas 7.292 amostras de cães e dessas 566 (7,7%) resultaram positivas para CDV.

O diagnóstico da cinomose baseado nas inclusões foi estudado por DOBOS-KOVÁS (1975), que descreveu sua presença em células de mucosas de vários órgãos, principalmente da bexiga urinária e do trato respiratório, bem como células gliais e ganglionares do cérebro de animais infectados, utilizando como as técnicas de coloração Hematoxilina e Eosina.

À microscopia óptica, estas inclusões têm de 1 a 15 nm de diâmetro e podem variar muito na forma: ovais, redondas, cilíndricas, piramidais e em bastonetes. Muitas destas inclusões encontram-se rodeadas por halos claros (APPEL, 1972).

É necessária precaução para confirmar o diagnóstico de cinomose, baseado somente na presença de inclusões, pois inclusões típicas citoplasmáticas têm sido identificadas na bexiga de cães normais. Além disto, as inclusões aparecem tardiamente para serem usadas rotineiramente. (GREENE & APPEL, 1990).

À microscopia eletrônica mostram ser estruturas aparentemente sem membrana limitante. Em pequeno aumento são observadas estruturas filamentosas sob a forma de túbulo de 10 nm de diâmetro. Esses túbulos são os nucleocapsídeos víricos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

### 3.10. 4 Diagnóstico molecular

Visa detectar o ácido nucléico viral no sangue e tecidos, pelos métodos de hibridização *in situ* (ISH) e reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### I. Hibridização *in situ* (ISH)

É possível detectar o genoma viral específico usando sondas radiativas (radioisótopos) ou não radiativas (enzimas), inclusive em materiais conservados por muitos anos (SANTOS *et al.*, 2002).

Alguns estudos com hibridização para detecção de seqüências do ácido nucléico viral do CDV em culturas de tecidos e vários tecidos, não obtiveram sinais no tecido do SNC, entretanto a infectividade do CDV e antígenos virais eram detectados no tecido (HASS *et al.*, 1991). ZURBRIGGEN *et al.*, (1993), desenvolveram sondas complementares para o virulento CDV e foram capazes de detectar o RNA viral não somente em culturas primárias de cérebro, mas também no tecido cerebral, pelo uso da *hibridização in situ*.

#### II. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR tem contribuído no diagnóstico de diversas viroses em animais.

Para vírus RNA é precedida de uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR). A RT-PCR tem sido empregada na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas como sangue, soro, urina e fragmentos de órgãos (SHIN *et al.*, 1995; FRISK *et al.*, 1999; GEBARA *et al.* 2004b).

SHIN *et al.* (1995) aplicou a RT-PCR para detectar o gene da nucleoproteína em células VERO infectadas e células mononucleares do sangue periférico. Duas séries de iniciadores (*primers*) foram alvo para 2 regiões do gene NP da cepa Onderstepoort-

1290 e 478 bp.

Estudos da sensibilidade do RT-PCR revelaram que uma célula VERO infectada ou 200 cópias de cDNA era suficiente para detectar produto amplificado por hibridização Southern blot. O amplificado do gene NP foi detectado em 17 de 32 amostras de cães com suspeita clínica. Nenhum produto de RT-PCR foi encontrado em 52 amostras de cães saudáveis.

Um estudo realizado por FRISK *et al.*, 1999, usou o gene NP para demonstrar a presença de amplificações específicas pelo RT-PCR em 86% de amostras de soro e 88% no fluído cerebrospinal de cães com cinomose confirmados pelo método imunohistoquímico. A sensibilidade do teste é dependente das mudanças dentro do gene NP.

GEBARA *et al.*(2004b), aplicou o RT-PCR em 87 amostras de urina de cães que apresentavam sinais clínicos sugestivos de cinomose. Esses animais foram atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina e em clínicas veterinárias de Maringá (PR). Dessas amostras, 41 foi possível à amplificação parcial do gene da NP do CDV.

O genoma RNA dos paramixovirus é fortemente ligado à nucleoproteína formando o nucleocapsídeo (YOSHIDA *et al.*, 1999) e considerando o fato que o gene P é o mais conservado de todos genes do CDV, RZEZUTKA & MIZAK (2002) elaboraram uma seqüência de *primers* para detectar o gene da fosfoproteína do CDV em células mononucleares do sangue periférico ou órgãos internos de cão, raposa, furão e marta pelo método PCR e N-PCR.

As amostras submetidas para o experimento eram digeridas com a proteinase K antes de isolar o RNA, de forma que a produção de RNA livre de proteínas virais era aumentada. O produto 1069 bp foi obtido de 1 das 10 amostras de sangue de cão, 3 dos 14 amostras de órgãos internos de cães e 1 dos 5 orgãos internos de raposa. Reamplificação com o uso dos *primers* CDVa e CDVb demonstrou pelo fragmento 429 bp em seis amostras, negativa ao PCR: 2 amostras de cães, 2 de raposas, 1 de marta e 1 de furão.

De acordo com KIM *et al.*, (2001); JÓJWIK & FRYMUS (2005), o RT-PCR combinado com “nested” PCR aumenta a eficiência no diagnóstico do CDV.

### 3.11. Saúde Pública

Vários pesquisadores evidenciaram pela microscopia eletrônica (REBEL *et al.*, 1974), imunohistoquímico (REBEL *et al.*, 1980; MILLS *et al.*, 1981) e estudos de biologia molecular como hibritização *in situ* (ISH) (GORDON *et al.*, 1991) e reação em cadeia (RT-PCR) (KRANE, 1998; GORDON *et al.*, 1992), vários membros da família *Paramixoviridae* na etiologia da doença de Paget.

A doença de Paget é uma desordem focal crônica no osso, descrita por James Paget em 1877 (PAGET, 1877 apud MEE & SHARPE, 1993), que é particularmente prevalente nas populações da Europa, América e Austrália, e é encontrada nas populações acima de 55 anos de idade (KANIS, 1991).

O processo primário na doença de Paget é a osteólise localizada, que parece resultar de um aumento no número e na atividade dos osteoclastos. Esse processo destrutivo crônico ocorre no quadro de osteogênese reparadora permanente por parte dos osteoblastos, cujos produtos podem sofrer destruição simultânea ou subsequente.

O resultado costuma ser um osso espessado, porém enfraquecido, sem o padrão normal de osso cortical ou trabecular. O osso enfraquecido pode fraturar-se ou deformar-se sob ação de estresse (ANDREOLI *et al.*, 1991).

Os ossos que mais provavelmente terão anormalidades no exame físico são o crânio, as clavículas e os ossos longos (SINGER, 1993).

BAUMGARTNER *et al.*, (1995), encontrou em cães, antígenos CDV nas células da medula, osteoclastos, osteoblastos e raramente em osteócitos. Nesses animais infectados experimentalmente, o antígeno viral era demonstrado no osso metafisário entre 5 a 36 dias após infecção. As lesões associadas, caracterizadas pela necrose de osteoclastos, atrofia e necrose de osteoblastos e células da medula, eram moderadas, e mais proeminentes entre 8 a 32 dias pós-infecção.

Osteosclerose metafisária dos ossos longos variaram de moderada a severa, foi observada macroscopicamente em 8 (19%) de 42 cães com cinomose espontânea. Animais afetados eram de 3 a 6 meses de idade e principalmente de raças grandes. Sumariamente, lesões no osso causado pelo CDV eram somente passageiras e não indicavam persistência viral nos ossos de cães experimentalmente infectados com CDV. Entretanto nenhum sinal clínico relacionado no osso foi observado, o estudo revelou que a infecção nas células do osso metafisário é comum em cães jovens com doença sistêmica e a ocorrência de antígenos virais nessas células resulta em defeitos no modelamento ósseo.

AXTHELM & KRAKOWKA (1986); MEE *et al.*, (1992) também encontraram CDV em células do osso de cães com cinomose.

Alguns pesquisadores não conseguiram detectar a presença do CDV em humanos usando somente RT-PCR, como RALSTON, (1993) e OOI *et al.*, (2000). Para investigar esse achado, HOYLAND *et al.*, (2003) comparou a detecção do CDV por 3 diferentes métodos, ISH, RT-PCR e IS-RT-PCR em 10 pacientes com doença de Paget. O CDV foi detectado em 6 pacientes pelo método ISH, em 5 pacientes pelo método RT-PCR, e em todos 10 pacientes pelo método ISH-RT-PCR. Sua explicação para o fato é o tipo de método utilizado para extração de RNA, pois em tecidos calcificados, como no caso o tecido ósseo, a extração de boa qualidade do RNA se torna uma técnica difícil. Em sua pesquisa ele verificou que o método de extração de RNA o guanidínio-tiocianato foi o de melhor qualidade.

A Esclerose Múltipla é uma enfermidade humana semelhante à panencefalite esclerosante subaguda causada por infecção crônica ou latente pelo vírus do sarampo e a encefalite progressiva da cinomose em cães. As duas enfermidades foram consideradas patologicamente semelhantes (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

A causa da Esclerose Múltipla é ainda incerta, mas há evidências que seria causado pelo vírus do sarampo. Recentemente, foi chamada atenção para a possibilidade do vírus da cinomose ser a causa da Esclerose Múltipla (GREENE & APPEL, 1990). Porém, outros vírus também foram descritos como envolvidos na doença. No entanto, a incapacidade de identificação viral específica no tecido nervoso central dos casos de Esclerose Múltipla, deixa a hipótese sem comprovação direta (GRIGORIADIS & HADJIGEORGIOU, 2006).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras analisadas

Foram analisadas 118 amostras de sistema nervoso central de cães domésticos (*Canis familiaris*), com raça definida (96) e sem raça definida (22), e de três animais silvestres, dois gambás (*Didelphis marsupialis*) e um mico (*Callithrix* sp).

Os cães tinham idade variando de 3 meses a 14 anos. Todas as amostras (cães e de animais silvestres) foram enviadas ao Instituto Pasteur no período de junho a agosto de 2005. Os cães eram provenientes de municípios dos estados de São Paulo (75), Minas Gerais (30) e Alagoas (13), como visto nos Quadros 1, 2 e 3.

**Quadro 1.** Local de procedência das amostras de cães, por municípios do Estado de São Paulo (continua)

Município	Sem raça definida	Com raça definida	Total
Guaraçai	2	0	2
Osasco	1	0	1
Hortolândia	1	1 (York shire)	2
Batatas	0	1 (Pitbull)	1
Barretos	1	0	1
Guarujá	1	2 (Poodle, Pinscher)	3
Borborema	1	0	1
Itapetininga	0	3 (Border collie, Dálmata, Poodle)	3
Votupuranga	1	0	1
São José da Boa Vista	1	0	1
Campinas	1	1 (Pitbull)	2
Araras	2	1 (Pitbull)	3
Indaiatuba	6	0	6
Onda Verde	2	0	2
Mongaguá	1	0	1
Mauá	0	1 (Pitbull)	1
Ribeirão Preto	2	1 (Doberman)	3
Porto Feliz	1	1 (Poodle)	2
São José do Rio Pardo	0	1 (Pitbull)	1
Sumaré	2	0	2
Cajamar	1	0	1
Perequê	1	0	1
Sertãozinho	1	0	1
Engenheiro Coelho	1	0	1
Praia Grande	1	0	1
Taboão da Serra	1	2 (Shinauzer, Rotweiller)	3
São Paulo (Vila	1	0	1

Mariana)			
Bom Jesus dos Perdões	1	0	1
Diadema	1	0	1
São Sebastião	1	0	1
Brotas	1	0	1
Cabreúva	1	0	1
Rio Grande da Serra	1	0	1
Bauru	1	0	1
Colina	2	0	2
Limeira	2	0	2
Santa Bárbara d' Oeste	3	0	3
Barueri	2	0	2
Valinhos	1	0	1
Guariba	1	0	1
Mauá	1	3 (Pitbull, Poodle e Weimaraner)	4
Conchal	1	0	1
Franca	1	0	1
Caconde	1	0	1
Jales	1	0	1
Brejo Alegre	1	0	1
<b>Total</b>	<b>57</b>	<b>18</b>	<b>75</b>

**Quadro 2.** Local de procedência das amostras de cães por municípios (ou bairros) do Estado de Minas Gerais

Município	Sem raça definida	Com raça definida	Total
Uberaba	3	1 (Pitbull)	4
Betim	1	0	1
Tupaciguara	1	0	1
Teófilo Otoni	1	0	1
Barbacena	0	1 (Husk Siberiano)	1
Belo Horizonte	11	0	11
São José da Lapa	1	0	1
Sardoá	1	0	1
Bom Jesus dos Perdões	1	0	1
Montes Claros	1	0	1
Gov. Valadares	3	1 (Pastor alemão)	4
Mogi das Cruzes	1	0	1
São João Batista da Glória	0	1 (Pincher)	1
Patos de minas	1	0	1
<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	<b>30</b>

**Quadro 3.** Local de procedência das amostras de cães por municípios do Estado de Alagoas.

Município	Sem raça definida	Com raça definida	Total
Maceió	13	0	13
Total	13	0	13

Das amostras dos animais silvestres, um gambá era proveniente de Campinas (SP), o outro de Araçatuba (SP), e o mico de São Candido (MG).

Nas fichas de envio de amostras de alguns cães, constavam informações como idade, raça, sintomas e outros não. No caso das amostras de animais silvestres, estas informações não estavam disponíveis.

#### **4.2 Amostra Padrão**

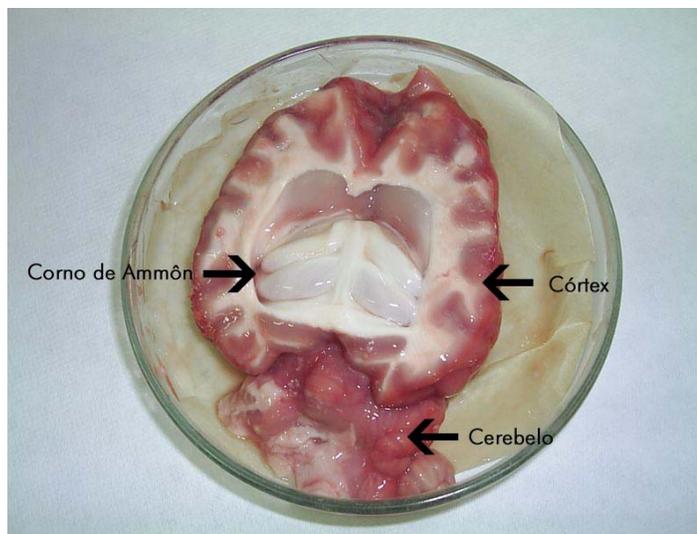
Para todas as técnicas realizadas neste estudo, foi usada como amostra padrão para cinomose uma amostra de cão positivo, CDV-IP5027/2005, pelas técnicas de diagnóstico e confirmada por sequenciamento genético. Para o controle negativo, foi utilizada amostra de SNC de camundongo, proveniente do Bioterio de Criação do Instituto Pasteur.

#### **4.3 Técnica de Coloração de Sellers (TIERKEL & ATANASIU, 1996).**

Foram preparadas impressões do SNC em lâminas, e realizada fixação e coloração pelo corante de Sellers, composto por álcool metílico, azul de metileno e fucsina básica. A presença de corpúsculos de Lentz de coloração rósea, intranuclear ou intracitoplasmático, foi pesquisada ao microscópio óptico.

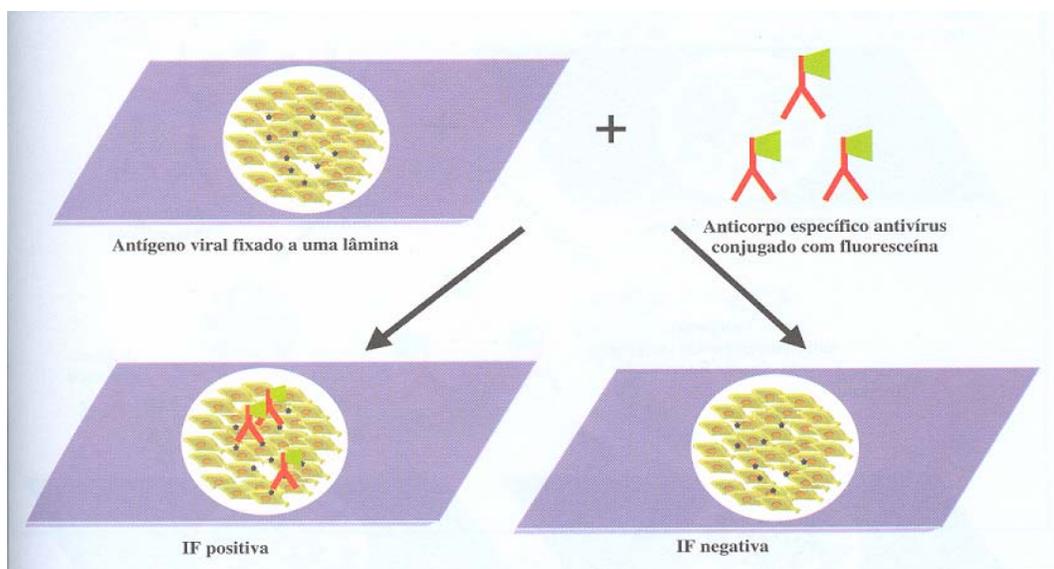
#### **4.4 Imunofluorescência Direta em tecido**

Foi utilizado conjugado anti-cinomose, produzido pelo Instituto Pasteur a partir de soro hiperimune de coelhos. Foram preparadas impressões em 3 lâminas de cada um dos fragmentos: cerebelo (CB), corno de Amonn (CA) e tronco encefálico (TE).



**Figura 5.** Cérebro de cão, mostrando as regiões de corno de Ammon, córtex e cerebello (imagem de câmara digital)

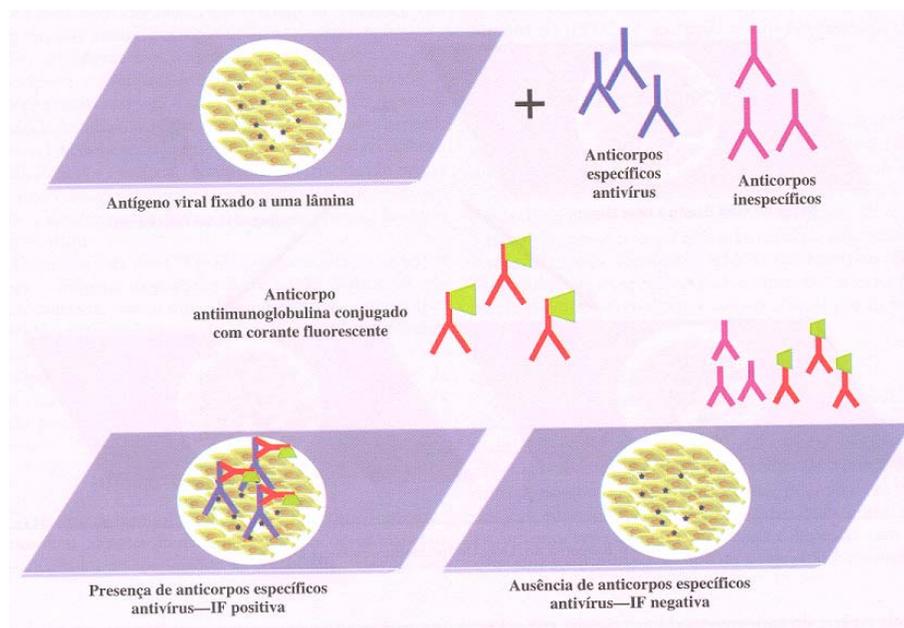
As lâminas contendo impressões de tecido nervoso para pesquisa do CDV foram fixadas em acetona PA gelada por 45 min, coradas com conjugado diluído em cérebro normal (CN), pH entre 7,4 e 7,6 e contendo 0,1% do corante azul de Evans. Posteriormente foram incubadas a 37°C por 45 minutos, em câmara úmida, e lavadas por imersão em PBS durante 10 minutos e 3 vezes em água destilada por 1 minuto. Após secagem em estufa a 37°C, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH entre 8,0 e 8,5) e lamínula e examinadas em microscópio Leitz® com sistema epiluminação.



**Figura 6.** Esquema do teste de Imunofluorescência Direta (SANTOS *et al.*, 2002).

#### 4.5 Imunofluorescência Indireta em tecido

Foram preparadas impressões em lâminas das 118 amostras (CA, CB e TE). Essas amostras foram mantidas congeladas a  $-21^{\circ}\text{C}$  por 8 meses. As lâminas foram fixadas com acetona PA gelada por 45 minutos, após adicionou-se o anticorpo primário (soro de cão anti-cinomose), diluído em suspensão de cérebro de camundongo normal 1: 5, deixando por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em camara úmida, lava-se depois 3 vezes com PBS, por 5 minutos, e 1 vez com a água destilada, por 1 minuto. E deixou-se secar. Após esse procedimento, acrescentou-se o anticorpo secundário conjugado (anti-IG de cão) diluído 1: 280 em PBS e contendo 0,1% de azul de Evans, ficando por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , lavando-se, depois, com PBS 3 vezes, por 5 minutos, e água destilada 1 vez, por 1 minuto.



**Figura 7.** Esquema do teste de Imunofluorescência Indireta (SANTOS *et al.*, 2002).

## 5 RESULTADOS

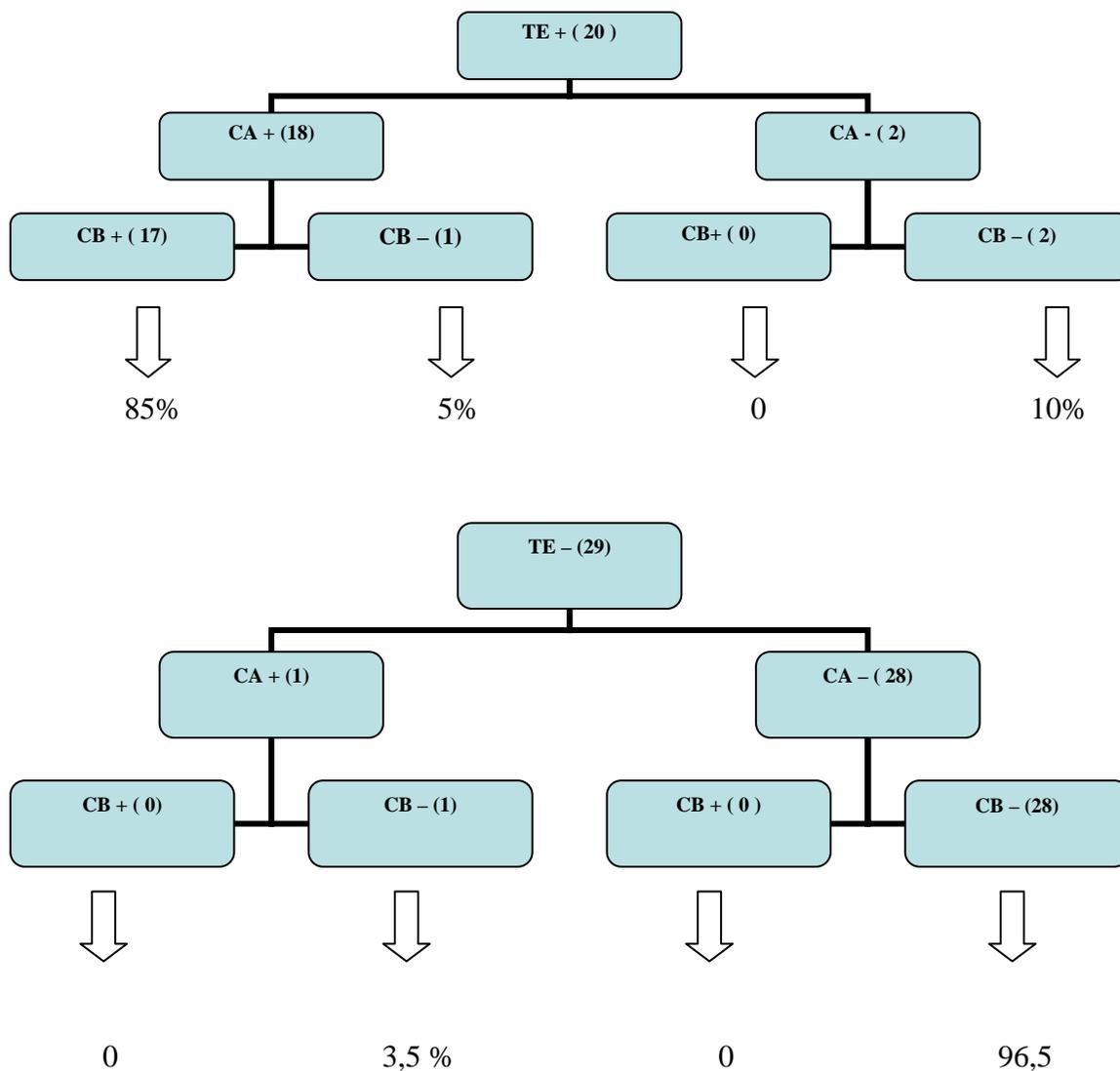
### 5.1. Em Cães

#### 5.1.1. Avaliação de cada região do cérebro pela técnica de IFD

Dos 118 cães, 49 constavam com as três regiões; corno de Ammon (CA), cerebelo (CB) e tronco encefálico (TE). De acordo com a tabela 1, o TE apresentou a porcentagem maior de positivos para cinomose.

**Tabela 1.** Resultados de cada região do SNC examinada das amostras que apresentavam CA, CB e TE pela técnica de IFD.

Região examinada	Positivo		Negativo		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
CA	19	38,6	30	61,2	49	100
CB	17	34,7	32	65,3	49	100
TE	20	40,8	29	59,2	49	100



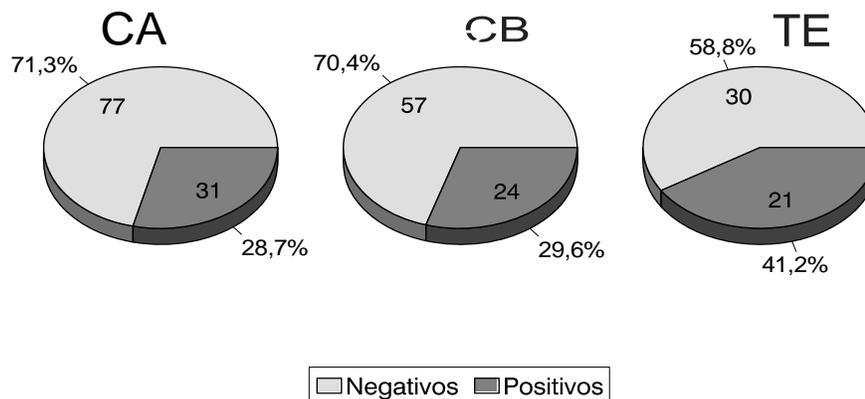
**Figura 8.** Fluxograma de resultados das amostras que apresentavam CA, CB e TE pela técnica de IFD

De acordo com a figura 8, 17 cães foram positivos nas 3 regiões examinadas, e 28 cães foram negativos nas 3 regiões examinadas.

Quando TE apresentou resultado positivo, em 85 % (17/20) dos casos, CA e CB apresentaram, também, resultados positivos e uma chance de 5 % do CB ser negativo quando TE e CA forem positivos. Em 10 % dos casos somente o TE é positivo, sendo CA e CB negativos.

Quando TE apresenta resultado negativo, em 96,5 % dos casos, o CA e o CB também serão negativos. Há uma chance de 3,5 % do CA ser positivo, quando o CA e CB forem negativos.

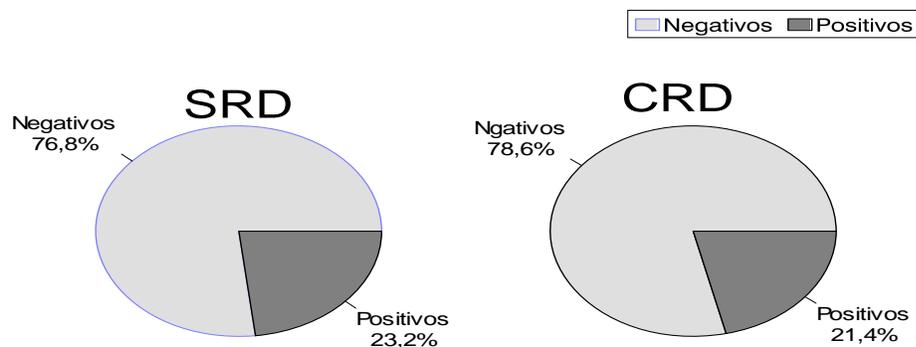
Na figura 9 avalia o percentual de positivos de cada região do cérebro de todos os cães (118) pela técnica de IFD. Do total de 108 amostras de CA enviados ao Instituto, 31 (22,3%) foram positivas ao CDV, de 81 amostras de CB, 24 (22,9%) foram positivos e de 51 amostras de TE, 21 (29,2%) foram positivos.



**Figura 9.** Positividade para cinomose, pela técnica de IFD por região do SNC todas as amostras

### 5.1.2. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD, de acordo com a raça

Os animais foram divididos em cães com raça definida (CRD) e cães sem raça definida (SRD). Os SRD apresentaram um percentual de 23,2% de positivos, e os CRD 21,4% de positivos, como visto na figura 10.

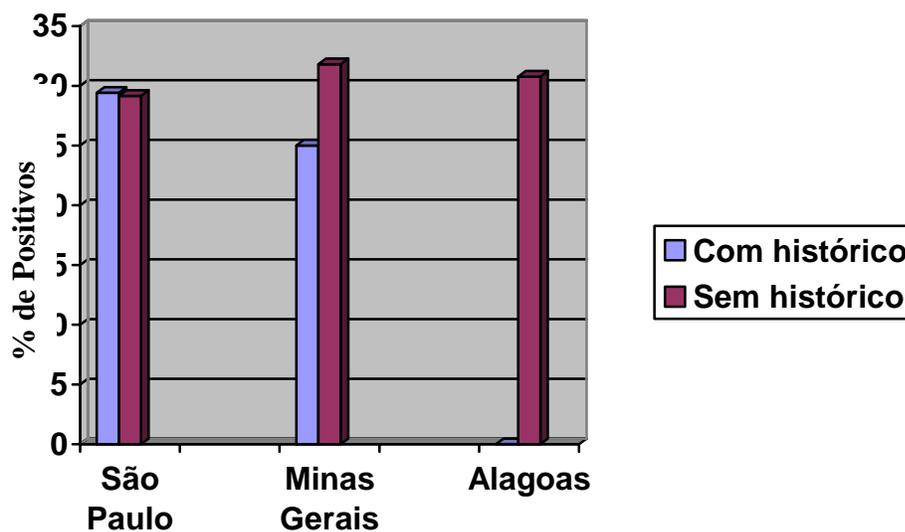


SRD=Sem raça definida    CRD=Com raça definida

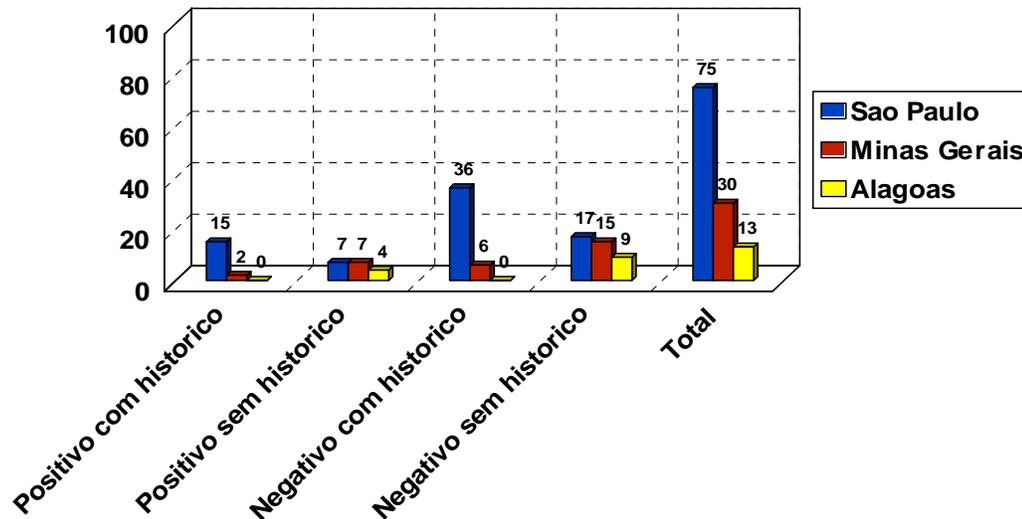
**Figura 10.** Positividade para cinomose, pela técnica de IFD, de acordo com a raça

### 5.1.3. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD de acordo com o histórico clínico informado, entre Estados.

De acordo com a figura 11, todos os animais foram positivos a técnica de IFD, foi dividido em cães com histórico clínico e cães sem histórico clínico. O Estado de São Paulo mostrou uma porcentagem de positivos de 29,41% quando apresentavam histórico clínico e 29,16% de positivos quando não apresentavam histórico clínico. No estado de Minas Gerais, os animais que apresentavam histórico clínico representavam 25% e 31,81% quando não apresentavam histórico clínico. No estado de Maceió, todos animais enviados ao Instituto Pasteur não vieram acompanhados com histórico clínico, obtendo um resultado de 30,76% de animais positivos sem histórico clínico.



**Figura 11.** Porcentagem de positivos para cinomose, pela técnica de IFD, de acordo com o histórico clínico informado e Estado de procedência.

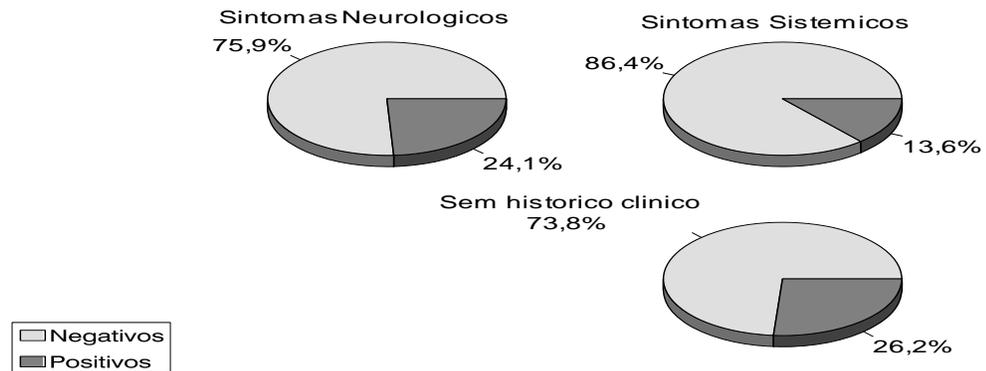


**Figura 12** – Resultados **em números** obtidos nas amostras pela técnica de IFD, com e sem histórico clínico oriundas dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Alagoas.

De acordo com a figura 12, o Estado de São Paulo enviou 51 amostras de cães com histórico clínico, o que resultou em 15 positivos e 36 negativos pela técnica de IFD e das 24 amostras sem histórico clínico, 7 foram positivas e 17 negativas. O Estado de Minas Gerais enviou 22 amostras sem histórico clínico (7 positivos e 15 negativos) e 8 com histórico clínico (2 positivos e 6 negativos). O Estado de Alagoas enviou 13 amostras sem histórico clínico, que resultou em 4 positivos.

#### **5.1.4. Avaliação de Positividade pela técnica de IFD de acordo com o histórico clínico informado**

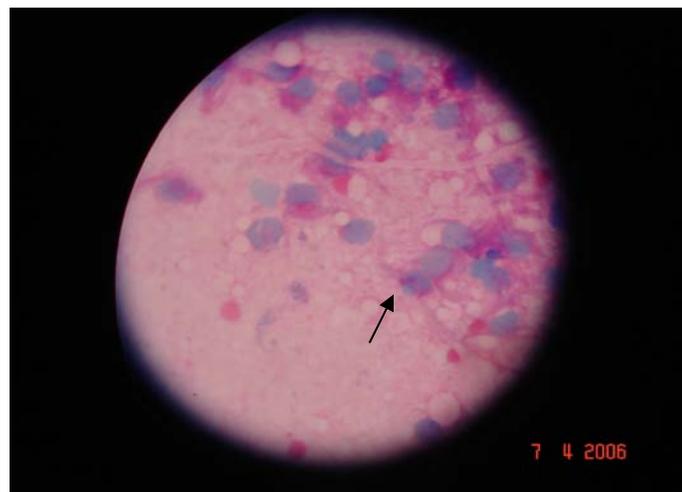
Como visto na figura 12, os cães foram divididos com base na sintomatologia apresentada de acordo com seus históricos. Dos cães que apresentavam sintomas neurológicos, 24,1% tiveram resultado positivo para cinomose; 13,6% positivos para cães que apresentaram sintomas sistêmicos e 26,2% para cães sem histórico clínico.



**Figura 13.** Relação de Positividade pela técnica de IFD de acordo com o histórico clínico informado

#### 5.1.5. Avaliação de Positividade pela técnica de Coloração de Sellers

Em 118 amostras de tecido nervoso de cães, 18,64 % resultaram positivas ao CDV, e 81,35% negativas pela técnica histológica, utilizando-se a coloração de Sellers.



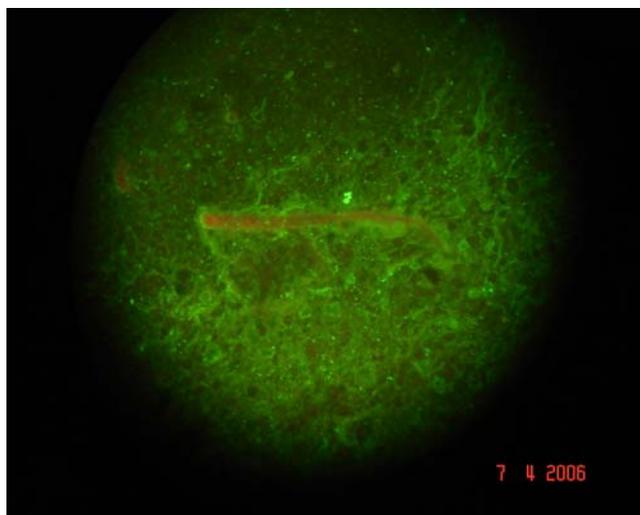
**Figura 14.** Microfotografia por câmara digital do Corpúsculo de Lentz pela técnica de coloração de Sellers em tecido nervoso de cão (cerebelo)

### 5.1.6. Comparação das técnicas de Sellers, IFD e IFI

A técnica de IFI foi realizada 8 meses após avaliação pela técnica de IFD. Por essas amostras serem congeladas e descongeladas algumas vezes, estas não se mantiveram em bom estado de conservação. Os resultados pela técnica de IFI foram negativos para o diagnóstico da cinomose. Apenas 1 amostra foi positiva, essa amostra se manteve bem conservada, inclusive com as regiões, corno de Ammon, cerebelo e tronco encefálico (todas as três regiões foram positivas). Essa amostra também foi positiva no Sellers e na IFD foi positiva apenas no CA.

**Tabela 2.** Resultados obtidos pelas técnicas de Sellers, IFD e IFI do total de amostras examinadas

Total de amostras	Sellers	IFD	IFI	
118			(+)1	
			(+)15	(-)14
		(+)22		(+) 0
			(-) 7	(-) 7
				(+) 0
			(+) 22	(-) 22
		(-)96		(+) 0
			(-) 76	(-)76



**Figura 15.** Microfotografia por câmara digital da Imunofluorescência Indireta em tecido nervoso de cão positivo para cinomose (tronco encefálico)

Pela coloração de Sellers 22 cães (18,6%) foram positivos para cinomose, pela IFD 35 (29,2%) foram positivos e pela IFI 1 (0,8%) foi positivo ao CDV, como visto na tabela 4.

**Tabela 3.** Resultados das amostras pelas técnicas: Sellers, IFD e IFI

Técnica realizada	Positivo		Negativo		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%
Sellers	22	18,6	96	81,3	118	100
IFD	35	29,2	83	70,3	118	100
IFI	01	0,8	117	99,1	118	100

## 5.2. Em animais silvestres

### 5.2.1. Avaliação de Positividade pelas técnicas de IFD, Sellers e IFI

O primeiro gambá foi positivo ao CDV pela técnica de IFD, sendo negativo no Sellers e na IFI. Esse gambá era proveniente de Campinas (SP). O outro gambá e o mico foram negativos nas três técnicas. Também durante a realização da técnica de IFI, essas amostras estavam em processo de autólise.

## 6 DISCUSSÃO

A cinomose é a moléstia viral mais prevalente dos cães (ETTINGER & FELDMAN, 1997), e a principal doença no diagnóstico diferencial da raiva em cães (QUEIROZ DA SILVA *et al.*, 2004; RAMÍREZ, 1989).

Neste trabalho, foram analisadas 118 amostras de cérebros de cães com suspeita clínica de cinomose, pelo método de Coloração de Sellers e Imunofluorescência Direta e Imunofluorescência Indireta.

A IFD tem sido indicada por diversos autores para o diagnóstico da cinomose em cães (KRISTENSEN & VANDEVELDE, 1978; MOTOHASHI *et al.*, 1969; SIMON-VALENCIA *et al.*, 1987), no Brasil a técnica de IFD foi primeiramente utilizada para o diagnóstico da cinomose em 1990 (KOTAIT *et al.*, 1990), posteriormente por QUEIRÓS DA SILVA *et al.*, (1999), (2004), SILVA *et al.*, 2004 e FERNANDES *et al.*, 2004.

As amostras positivas para cinomose pela técnica de IFD apresentaram inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas de forma arredondada, sendo também encontrada inclusões arredondadas pela IFD por QUEIRÓS DA SILVA *et al.*, (2004).

A técnica de IFD permitiu diferenciar qual seria a região que apresentou melhor sensibilidade. Em algumas amostras, foi possível a preparação de impressões de Corno de Ammon, Cerebelo e Tronco Encefálico. Em outras amostras isso não foi possível, devido ao estado de conservação ou por não conter determinada região. Apenas em 49 amostras de 118 cães foi possível a identificação das 3 regiões, apresentando-se como amostras completas. O TE foi a região que mais apresentou resultados positivos, devido ao fato dessa região ser um caminho para atingir o SNC, de acordo com BRAUND, (1994). O CB foi a região que menos apresentou resultados positivos.

Na análise dessas três regiões, 1 cão teve seu resultado positivo apenas no CA, sendo negativos no TE e CB, o que representa uma chance de 3,5 % deste fato acontecer. O que acontece com maior frequência é quando o TE for negativo, apresenta 96,5 % de chance de o CA e o CB também serem negativos. Resultados semelhantes foram obtidos por FERNANDES *et al.*, (2004), que verificaram no TE a região mais acometida. Já para QUEIRÓS DA SILVA *et al.*, (2004), não foi detectada diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as porcentagens de positivos observados para cada um dos fragmentos e, tampouco, uma localização preferencial do vírus. No entanto, esse pesquisador analisou corno de Ammon, cerebelo e córtex; no referido trabalho não foi analisado o tronco encefálico.

Neste presente trabalho, quando se comparou a positividade em relação à raça, não foi verificada diferença significativa, devido à insuficiência de amostras para tal análise.

Quando se comparou a positividade de acordo com o histórico clínico informado entre Estados, o Estado de São Paulo teve um índice um pouco maior de positividade quando apresentavam históricos clínicos, enquanto que, em Minas Gerais o resultado foi inverso, apresentando um percentual de positividade maior quando não continham históricos clínicos. No Estado de Alagoas, nenhum dos animais enviados ao Instituto Pasteur vieram acompanhados de históricos clínicos.

Do histórico clínico, 24,1% corresponderam aos positivos que apresentavam apenas sintomas neurológicos, 13,6% dos positivos que apresentavam sintomas sistêmicos e 26,2% que não tinham histórico clínico informado.

O diagnóstico histopatológico foi descrito como grande valor para o diagnóstico da cinomose, analisado pela coloração por Hematoxilina-Eosina (DOBOS-KOVÁCS, 1975).

Nesse estudo o método histopatológico para a identificação de corpúsculos de inclusão foi a coloração de Sellers. As amostras positivas apresentaram inclusões intranucleares e/ou intracitoplasmáticas de forma arredondada, eosinofílicas (de coloração rósea) típicas da cinomose, obtendo 18,64% de positivos.

PEIXOTO *et al.*, (1999), pesquisaram 2.283 amostras provenientes de todo o Estado enviado ao laboratório de diagnóstico de raiva, do Instituto Pasteur de SP, no período de junho de 1998 a agosto de 1999. Das amostras pesquisadas pela coloração de Sellers, 53 (2,3%) foram positivas para o CDV.

Em 1999, QUEIRÓZ DA SILVA *et al.*, analisou 892 amostras de SNC de cães pela coloração de Sellers no período de 1981 a 1991, destas 57(6,4%) foram positivas para cinomose.

Outros autores (HEADLEY & GRAÇA, 2000), mencionam corpúsculos de inclusões além do SNC em outros órgãos, como na bexiga urinária, pulmão, estômago, rim e tonsilas.

A técnica de IFD apresentou maior sensibilidade quando comparada com a técnica de coloração de Sellers. Do total de 118 amostras examinadas, 35 apresentaram positividade ao CDV pela técnica de IFD, enquanto que, apenas 15 foram positivas pela coloração de Sellers. Entretanto, das 73 amostras negativas pela IFD, 7 foram positivas pela coloração de Sellers.

Resultados semelhantes foram feitos por SILVA *et al.*, (2004) que concluiu que a técnica de IFD apresenta maior confiabilidade em relação à técnica de Coloração de Sellers.

Nesse estudo foi possível a padronização da técnica de IFI aplicada ao diagnóstico da cinomose, apesar de mais trabalhosa do que a IFD, a leitura é facilitada pela visualização de inclusões fluorescentes maiores e mais nítidas. Uma desvantagem da IFI nesse experimento, é que seu emprego só foi possível em amostras frescas. Foram feitas 118 amostras do mesmo material da IFD e Sellers para a realização da técnica de IFI, mas devido ao fato dessas amostras terem sido congeladas e descongeladas repetidas vezes todas, exceto uma amostra, obtiveram resultados negativos. A amostra com resultado positivo manteve em bom estado de conservação, inclusive foi possível a identificação das 3 regiões (CA, CB e TE) que foram positivas. Essa amostra teve seu resultado positivo no Sellers, e na IFD apenas o CA foi positivo, o CB e o TE foram negativos.

Não há dados na literatura referente a IFI em tecido nervoso de cães para o diagnóstico da cinomose.

Uma ampla expansão de hospedeiros naturais para o CDV tem ocorrido desde 1988. Tem sido descrito em macacos japoneses (*Macaca fuscata*) (YOSHIKAWA *et al.*, 1989), porco do mato (*Tayassu tajacu*) (APPEL *et al.*, 1991) em grandes felídeos como leões, tigres e jaguás (APPEL *et al.*, 1994).

No Brasil, REGO *et al.*, (1978) relataram cinco casos confirmados de cinomose de um total de 13 óbitos de animais silvestres brasileiros das espécies *Galictis vittata*

(cachorro do mato), *Crisocyon brachyurus* (lobo) e *Cerdocyon thous* (raposa), mantidos em cativeiro no Zoológico Municipal de Taboão da Serra (SP). A histopatologia observaram-se a presença de corpúsculos de inclusão em diferentes localizações como no SNC, no estômago e no intestino.

Nessa pesquisa 2 gambás e 1 mico foram submetidos à técnica de IFD, Sellers e IFI sendo que um gambá foi positivo ao CDV pela IFD. Sendo a primeira ocorrência de cinomose em gambás no Brasil.

Uma observação a ser feita que essas amostras também estavam em processo de autólise.

Entre janeiro de 1981 e outubro de 1985, tecido cerebral de 192 gambás que foram negativos a anticorpos contra raiva foram obtidos de 2 laboratórios de saúde pública de Illinois (denominados A e B). Lesões no cérebro eram detectadas microscopicamente em 17 de 91 (18,7%) gambás no laboratório B e espécimes de 30 de 101 (29,7%) gambás no laboratório A. Lesões nos 3 gambás (1 do laboratório A e 2 do B) eram causados por um parasitismo cerebral (*Skrjabingylus chitwoodorum*) Lesões nos outros 44 gambás eram caracterizados por infiltrados de células mononucleares, não supurativas e focos de células gliais de diferente severidade. Inclusões eram somente achadas em 5 dos 44 gambás com lesão no cérebro pelo método de coloração por Hematoxilina e Eosina. Dezesete de 36 (47,2%) gambás tiveram anticorpos contra CDV usando o método de ELISA. Porém, a infecção pelo CDV não foi detectado nos 19 gambás restantes com encefalite, possivelmente devido a diminuição da sensibilidade ao teste por causa do tecido autolizado (WOOLF *et al.*, 1986). Resultados semelhantes foram obtidos por DITERS & NIELSEN, (1978) que encontraram inclusões intranucleares eosinofílicas no baço e no pulmão de um gambá da espécie *Mephitis mephitis*, pelo método de coloração de hematoxilina-eosina.

## 7 CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados no presente trabalho podemos concluir que:

1. A técnica de Imunofluorescência Direta (IFD) deve ser o teste de escolha para o diagnóstico *postmortem* da cinomose e quando comparada com a técnica de Coloração de Sellers, apresentou maior sensibilidade.
2. Como diagnóstico diferencial, a IFD é o teste de escolha para ser empregada na rotina laboratorial, uma vez que a raiva pode ser, clinicamente, confundida com cinomose.
3. O tronco encefálico foi a região que apresentou maior número de inclusões causadas pelo vírus da cinomose canina (CDV) em cães, pela técnica de IFD.
4. É conveniente fazer impressões em lâminas das três regiões cerebrais: corno de Ammon (CA), cerebelo (CB) e tronco encefálico (TE), pois há uma chance de 3,5 % do CA ser positivo, quando o TE e o CB apresentarem resultados negativos.
5. Não é recomendável o emprego da técnica da IFI em tecidos autolisados, onde observaram-se apenas resultados negativos.
6. No presente trabalho observou-se ser imperioso o trabalho com amostras em bom estado de conservação, oriundas de uma necrópsia bem feita, com o envio das regiões cerebrais completas, a conservação das mesmas durante o transporte e a rapidez no envio das amostras.

### Recomendações de Pesquisa

Esse estudo sugere uma maior investigação nas espécies silvestres para verificar qual o risco da infecção por cinomose, nesta população animal inclusive na respectiva fonte dessa infecção.

Mesmo não sendo possível uma avaliação quanto à sensibilidade e especificidade entre as técnicas de IFD e IFI, sugere-se novas pesquisas com a técnica de IFI aplicadas ao diagnóstico *postmortem* da cinomose, uma vez que esta técnica foi padronizada durante a realização deste trabalho.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, E.C. Morbillivirus infections in wildlife in relation to their population biology and disease control in domestic animals. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p.319-332, 1995.

ANDREOLI, T.E. *et al.* **Medicina Interna Básica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.469.

ALEXANDER, K.A *et al.* Canine distemper-related mortality among wild dogs (*Lycaon pictus*) in chobe national park, Botswana. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.27, n.3, p.426-427, 1996.

APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Recent Advances in Canine Distemper Diseases, 1999. Disponível: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso em 10/10/2004.

APPEL, M.J.G *et al.* Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of diagnostic investigation*, v.6, n.3, p.277-288, 1994.

APPEL, M.J.G. Where next for canine distemper? Scientific Correspondence. **Nature**. v.353, p.353, 1991.

APPEL, M.J.G. *et al.* Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). **Archives Virology**, v.119, p.147-152, 1991.

APPEL, M.J.G. **Virus infections of carnivores**. New York: Elsevier Science Publishers, 1987, p. 133-59.

APPEL, M. *et al.* Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.803-806, 1974.

APPEL, M. & ROBSON, D.E. A microneutralization test for canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v.34, p. 1459-1463, 1973.

APPEL, M.J.G. Canine distemper virus. **Virus Monography**. Springer-Verlag: New York, 1972, 96p.

AXTHELM, M.K. & KRAKOWKA, S. Immunocytochemical methods for demonstrating canine distemper virus antigen in aldehyde-fixed paraffin-embedded tissue. **Journal Virology Methods**, v.13, p. 215-229, 1986.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.3-13, 1999.

BARRETT, T. *et al.* Round table on morbilliviruses in marine mammals. **Veterinary Microbiology**, v.33, p.287-295, 1992.

BARRETT, T. *et al.* The nucleotide sequence of the gene encoding the F protein of canine distemper: a comparison of the deduced amino acid sequence with other paramyxoviruses. **Virus Research**, v.8, p.373-386, 1987.

BARRETT, T.; SHRIMPTON, S.B.; RUSSEL, S.E. Nucleotide sequence of the entire protein coding region of canine distemper virus polymerase-associated (P) protein mRNA. **Virus Research**, v.3, p.367-372, 1985.

.BAUMANN, G. Cinomose canina. In: BEER, J. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Editora Roca, 1999, 398 p.

BAUMGÄRTNER, R. *et al.* Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.201-209, 1995.

BELLINI, W.J. Measles (Rubeola) Virus. In: LENNETTE, E.H.; LENNETTE, D.A.; LENNETTE, E.T. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections**. EUA: American Public, 1995. p.447-454.

BELLINI, W.J. *et al.* Matrix Genes of Measles virus and Canine Distemper Virus: Cloning, Nucleotide Sequences, and Deduced Amino Acid Sequences. **Journal Virology**, v.58, n.2, p.408-416, 1986.

BLIXENKRONE-MOLLER, M. *et al.* Studies on manifestation of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v. 37, p.163-173, 1993.

BLIXENKRONE-MOLLER, M. *et al.* Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal Veterinary Diagnostic Investigation**, v.3, p.3-9, 1991.

BOHN, W. *et al.* Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. **Virology**, v.149, p.91-106, 1986.

BRAUND, K.G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. 2.ed. St. Louis: Mosby, 1994. 477p.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Medical Microbiology**. 21 ed. EUA: Appleton & Lange, 1998. 713p.

CARLTON, W.W & McGAVIN, M. **Patologia veterinária especial**. 2.ed. Porto Alegre: ArtMed, 1998. p.672

CARTER, G.R; WISE, D.J; FLORES, E.F. General Characteristics, Structure and Taxonomy of Viruses. A Concise Review of Veterinary Virology: Paramyxoviridae. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2004. Disponível em [www.ivi.org](http://www.ivi.org). Ultimo acesso: 16/10/2005

COFFIN, D.L. & LIU, C. Studies on canine distemper infection by means of fluorescent-labeled antibody- II. The pathology and diagnosis of the naturally-occurring disease in dogs and the antigenic nature of the inclusion body. **Virology**, v.3, p.132-145, 1957.

CORRÊA, W.M. & CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos mamíferos domésticos**. Editora Médica e Científica LTDA, 1992. p. 655-670.

CORRÊA, O. **Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Seropédica, 1966. p.219-238.

DEEM, S.L. *et al.* Canine Distemper in terrestrial carnivores: a review. **Journal of Wildlife Medicine**, v.31, p. 441-451, 2000.

DIALLO, A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. **Veterinary Microbiology**, v.23, p.155-163, 1990.

DITERS, W.R & NIELSEN, S.W. Toxoplasmosis, Distemper, and Herpesvirus infection in a sukhunk (*Mephitis mephitis*). **Journal Wildlife Disease**, v.14, p.132-136, 1978.

DOBOS-KOVÁCS, M. Studies on the diagnostic value of cell inclusions in canine distemper. **Acta Veterinary Academic Science Hung.**, v.25, n.2-3, p.185-200, 1975.

EK-KOMMONEN, C. *et al.* Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Veterinary Record**, v.141, p. 380-383, 1997.

ENDO, Y. *et al.* Prevalence of Canine distemper vírus, Feline Immunodeficiency Vírus and Feline Leukemia Vírus in Captive African Lions (*Panthera leo*) in Japão. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 66, n.12, p.1587-1589, 2004.

ETTINGER, S. J. & FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 1 ed. Manole: São Paulo, 1997. p.315-319.

FAIRCHILD, G.A; WYMAN, M.; DONOVAN, E.F. Fluorescent Antibody Technique as a Diagnostic: Detection of Viral Antigen in Epithelial Tissues of Experimentally Infected Dogs. **America Journal Research**, v.28, n.124, p.761-769, 1967.

FERNANDES, P.R.T *et al.* Positividade na Imunofluorescência Direta de diferentes regiões cerebrais de cães com cinomose. In: 8ª Mostra Científica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Botucatu, 2004.

FERRY, N.S. *Bacillus bronchisepticus* (*Bronchicanis*): The cause of Distemper in dogs and a similar disease in other animals. **The Veterinary Journal**, v.68, p.376-391, 1912

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

FONSECA, M.E.F. Diagnóstico laboratorial das Viroses Humanas. In: OLIVEIRA, H.S.L. **Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994. p.44-60

GALINSKI, M.S. Paramyxoviridae: Transcription and Replication. **Advances in virus Research**, v.39, p.129-163, 1991.

GEBARA, C.M.S. *et al.* Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56 n.2, p.168-174, 2004a .

GEBARA, C.M.S. *et al.* Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.156, n.4, 2004b .

GEMMA, T.N *et al.* Sorological survey of canine distemper vírus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Veterinary Medical Science**, v.57, p.761-763, 1995.

GOODHEART, C.R. **An Introduction to Virology**. W.B. Saunders Company: Philadelphia, 1969. cap.3.

GORDON, M.T. *et al.* Canine distemper virus sequenced from pagetic bone. **Bone Mineral.**, v.19, p.159-174, 1992.

GORDON, M.T.; ANDERSON, D.C.; SHARPE, P.T. Canine distemper virus localized in bone cells of patients with Paget's disease. **Bone**, v.12, p.195-201, 1991.

GORHAM, J.R. The epizootiology of distemper. **Journal of the America Veterinary Medical Association**, v.149, p.610-622, 1966.

GOSS, L.W; COLE, C.R; ENGEL, H. Inclusion bodies, with special application to clinical diagnosis of canine distemper. **Journal of the America Veterinary Medical Association**, v.112, p.236-237, 1948.

GRACHEV, M.A. *et al.* Distemper Vírus in Baikal seals. **Nature**, v.338, p.209, 1989.

GREENE, C.E. & APPEL, M.J. **Canine Distemper. Infectious Diseases of the dog and cat**. W.B.Saunders Company: Philadelphia, 1990. p.226-240.

GRIFFIN, D, E.; BELLINI, W, J. Measles Virus. In: FIELDS, B.N; KNIPE,P.M; HOWLEY, P.M. **Fundamental virology**, 3 ed. Philadelphia: Raven Publishers. 1996. p.1267-1312.

- GRIGORIADIS, N. & HADJIGEORGIOU, G.M. Virus-mediated autoimmunity in multiples sclerosis. **Journal of Autoimmune Diseases**, v.3, n.1, p. 1-8, 2006.
- GUO, A & LU, C. Canine distemper virus causes apoptosis of VERO cells. **Journal Veterinary Medicine B**, v.47, p. 183-190, 2000.
- GUY, J.S. Diagnosis of canine viral infections. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.16, p.1145-1156, 1986.
- HAGIWARA, M.K. **Cães e Gatos**, v. 5, p.42-48, nov. / dez., 1985.
- HARDER, T.C. *et al.* Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. **Journal of General Virology**, v.77, p.397-405, 1996.
- HARVELL, C.D. *et al.* Emerging Marine Diseases- Climate links and anthropogenic factors. **Science**, v.285, n.3, 1999.
- HASS, L. *et al.* Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v.48, p.165-171, 1997.
- HASS, L. *et al.* Epizootic of canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyenas (*Crocuta crocuta*). **Veterinary Microbiology**, v.49, p.147-152, 1996.
- HASS, L. *et al.* 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. **Journal of Genetic Virology**, v.72, p.825-832, 1991.
- HEADLEY, S.A. & GRAÇA, D, I. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v.37,n.2, 2000.
- HIGGINS, R.J. A primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. **Acta Neuropathology**, v.58, p.1-8, 1982.
- HIRSH, D.C. & CHUNGZEE, Y. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 464 p.
- HOYLAND, J.A. *et al.* Comparison of in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ-RT-PCR for the detection of canine distemper virus RNA in Paget's disease. **Journal of Virological Methods**, v.109, p.253-259, 2003.
- JÓJWIK, A. & FRYMUS, T. Comparison of the Immunofluorescence assay with RT-PCR and Nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Veterinary Research Communications**, v.29, p.347-359, 2005.

JONES, C.T.; HUNT, D.H.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. p.1415.

KAI, C. *et al.* Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus clinical cases. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 55, p.1067–1070, 1993.

KANIS, J.A. Paget's disease of bone (Osteitis Deformans). In: BENNETTE, J.C.; PLUM, F. **Cecil Textbook of Medicine**. EUA: W. B. Saunders Company, 1991, p.1384-1387.

KATHY QUIGLEY. Veterinarians Discover First Known Case of Canine Distemper in a Wild Tiger. Wildlife Conservation Society, 2005. Disponível em: [www.wcs.org/353624/4371246](http://www.wcs.org/353624/4371246)( ultimo acesso 17/05/05)

KENNEDY, S. *et al.* Mass Die-Off OF Caspian Seals caused by Canine Distemper Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v.6, n.6, nov-dez, 2000.

KIM, Y. *et al.* Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. **Journal Veterinary Science**, v.2, n.1, p.59-63, 2001.

KOTAIT, I *et al.* Diagnóstico diferencial de raiva e cinomose pela histopatologia e imunofluorescência direta. In: Encontro de Virologia, v.5, 1990, São Lourenço. Anais... São Lourenço: MG, p.107, 1990.

KRAKOWKA, S.; AXTHELM, M.K.; JOHNSON, G.C. Canine distemper virus. In: OLSEN, R.G.; KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, J.R. **Comparative pathobiology of viral diseases**. Boca Raton: CRC, 1985. v.2, p.137-164.

KRANE, S.M. Paget's Disease of Bone. In: FAUCI, A.S. *et al.* **Principles of Internal Medicine**. New York: McGraw-Hill, 1998, p.2266-2269.

KRISTENSEN, D.V.M & VANDEVELDE, M. Immunofluorescence Studies of Canine Distemper Encephalitis on Paraffin-Embedded Tissue. **America Journal Veterinary Research**, v.39, n6, p.1017-1021, 1978.

KUMAGAI, K. *et al.* Lymphoid Apoptosis in Acute Canine Distemper. **Pathology**, p.175-181, 2003.

LIDLAW, P.P. & DUNKIM, G.W. Studies in dog distemper. VI. Dog distemper antiserum. **Journal Company Pathology**, v.44, p.1-25, 1931.

LEISEWITZ, A.L. *et al.* Canine distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of the literature. **Journal South Africa Veterinary Association**, v.72, p. 127-136, 2001.

LAMB, R.A. & KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: FIELDS, B.N; KNIPE, P.M; HOWLEY, P.M. **Fundamental virology**, 3 ed. Raven Publishers: Philadelphia, 1996. p. 1177-1204.

LEDNICKY, J.A. *et al.* Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and VERO cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in sub genomic sections of the fusion and phospho protein genes. **Journal of Virology Methods**, v.118, p.147-157, 2004.

LINCOLN, S.D. *et al.* Studies of dog encephalitis. II. Electron microscopic and immunohistologic findings. **Veterinary Pathology**, v.10, p. 124-129, 1973.

LISIAK, J.A & VANDEVELDE, M. Poliencephalomalacia associated with canine distemper infection. **Veterinary Pathology**, v.16, p.650-660, 1979.

MAIA, O.B *et al.* Avaliação pós-vacinal de lobos guarás *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) contra os vírus da cinomose e parvovirose caninas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, p.415-420, 1999.

MAINKA, S.A; XIANMENG, Q; TINGMEI, H; APPEL, M.J. Serologic survey of giant pandas (*Ailuropoda melanoleuceuca*), and domestic dogs and cats in the Wolong Reserve, China. . **Journal of Wildlife Disease**, 30, n.1, p.86-89, 1994.

MARCO, W.GV.B. *et al.* Distemper Outbreak and its effect on African Wild Dog Conservation. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.2, 2002.

MARSÍLIO, F. *et al.* Serologic survey for selected viral pathogens in Brown bears from Italy. **Journal of Wildlife Disease**, v.33, n.2, p.304-307, 1997.

MEE, A.P.; SHARPE, P.T. Dogs, Distemper and Paget's disease. **BioEssays**, v.15, n.12, p.783-789, 1993.

MEE, A.P. *et al.* Detection of canine distemper virus in bone cells in the metaphyses of distemper-infected dogs. **Journal of Bone Mineral Research**, v.7, p.829-834, 1992.

MELODY, E. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions . **Nature**, 379, p. 441-445, 1996.

M'GOWAN, J.P. Some observations on a laboratory epidemic, principally among dogs and cats in which the animals affected presented the symptoms of the disease called "distemper". **Journal Pathology and Bacteriology**, v.15, p.372-426, 1911.

MILLS, B.G. *et al.* Immunohistological demonstration of respiratory syncytial virus antigens in Paget's disease of bone. **Proceedings of the National Academy Science of United States of America**, v.78, p.1209-1213, 1981.

MOLL, P.VAN. *et al.* Distemper in carnivores: An epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.193-199, 1995.

MORITIZ, A.; FRISK, A.L.; BAUMAGRTNER, W. The evaluation of diagnostic procedures for detection of canine distemper virus infection. **Europe Journal Company Animal Practice**, v.10, p.37-45, 2000.

MORO, L. *et al.* Apoptosis in the Cerebellum of Dog with Distemper. **Journal Veterinary Medicine B**, v. 50, p.221-225, 2003.

MORO, L. *et al.* Ocorrência de apoptose em leucócitos no esfregaço de sangue periférico e em sincícios na infecção in vivo pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v..55, n.1, 2002.

MOTOHASHI, T.; NAKAGAWA, H.; OKADA, T. Fluorescent antibody technic in diagnosis of canine distemper. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v.56, p1057-1060, 1969.

MURPHY, F.A. *et al.* **Veterinary Virology**. 3 ed. California: Academic Press, 1999. 615 p.

NOON, K.F *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **America Journal of Veterinary Research**, v.41, n.4, p.1460-1466, 1988.

OLSON, P.; KLINGEBORN, B.; HEDHAMMAR, Å. Serum antibody response to canine parvovirus, canine adenovirus-1, and canine distemper virus in dogs with known status of immunization: a study of dogs in Sweden. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.9, p.1460-1466, 1988.

OOI, C.G. *et al.* Absence of Measles virus and Canine Distemper virus transcripts in long term bone marrow cultures from patients with Paget's disease of bone. **Bone**, v.37.p.417-421, 2000.

ORTEGA-RODRIGUEZ, C. *et al.* Aportation al estudio del diagnostico del moquillo canino en perros infectados de forma natural. **Medicina Veterinaria México**, v.6, n.12, p.715-718, 720-721, 1989

OZKUL, A. *et al.* Determination and phylogenetic analysis of canine distemper virus in dogs with nervous symptoms in Turkey. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n.1, p.125-132, 2004.

PATRONEK, G.J. *et al.* Canine distemper infection in pet dogs: a case control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. **Journal of the American Animal Association**, v.31, p.230-235, 1995.

PEIXOTO, Z.M.P. *et al.* Frequência da cinomose em cães com sintomatologia nervosa, no período de junho de 1998 a agosto de 1999, no Estado de São Paulo. In: Reunião Anual do Instituto Biológico, 1999, São Paulo, SP. Resumos. São Paulo, 12 RAIB, 1999.

PEIXOTO, Z.M.P. *et al.* Diagnóstico diferencial da raiva e cinomose, no estado de São Paulo, no período de março de 2000 a fevereiro de 2002. In: **XXIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, 2002, Gramado. Anais...Gramado: RS, 2002.

PELLEGRINO, F., SURANTI, A., GARIBALDI, L. **Síndromes Neurológicas em cães e gatos**. São Caetano do Sul: Interbook, 2003. 376 p

QUEIROZ DA SILVA, L.H. *et al.* Emprego das técnicas de Sellers e Imunofluorescência Direta no diagnóstico diferencial da raiva e cinomose em amostras de origem canina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.21, n.6, p.232-236, 1999.

QUEIROZ DA SILVA, L.H.; MORINISHI, C.K.; NUNES, C.M. Diagnóstico Diferencial entre a raiva e a cinomose canina em amostras de cérebro de cães examinadas no período de 1998 a 2001 na região de Araçatuba, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, n.3, p.317-321, jul ./ set., 2004

QIU, X & MAINKA, S.A. A review of mortality in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuceuca*). **Journal of Zoo and Wildlife medicine**, v. 24, p. 425-429, 1993.

RALSTON, S.H. Paget's disease of bone. **British Medical Journal**, v.306, p.332-333, 1993.

RAMÍREZ, R.I. Diagnóstico de moquillo canino por imunofluorescencia directa, en perros diagnosticados clínicamente como rabiosos. **Veterinaria Mexico**, v.20, p.161-167, 1989.

REBEL, A.; MALKANI, K.; BASLE, M. Anomalies nucleaires des osteoclasts de la maladie osseuse de Paget. **Nouv. Pres. Med.** v.3, p.1299-1301, 1974.

REBEL, A. *et al.* Viral antigens in osteoclasts from Paget's disease of bone. **Lancet**, v.2, p.344-346, 1980.

REGO, A.A.M.S *et al.* Distemper in Brazilian wild canidae and mustelidae: case report. **Brazilian Journal of Veterinary Research animal Science**, v.34, p.156-158, 1997.

RUDE, T.A. Canine distemper virus: Infection and prevention. **Canine Practice**, v.14, p.16-24, 1987.

RZEZUTKA, A.; MIZAK, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.95-103, 2002

SANTOS, N.S.O; ROMANOS, M,T,V.; WIGG, M.D. **Introdução à Virologia Humana.**: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 243 p.

SCHLINGMAN, A.S. Studies on Canine Distemper: A Comparison of Natural and Experimental Virus Infections. **Journal America Veterinary Medicine Association**, v.82, p. 164-188, 1993.

SHELL, L.G. Canine distemper. **Company Small Animal**, v.12, p.173-179, 1990.

SHIN, Y.S. *et al.* Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.57, p.439-45, 1995.

SILVA, ACR *et al.* . Production of anti-canine distemper vírus fluorescent conjugate. In: **XV Encontro Nacional de Virologia**, 26 a 29 de setembro de 2004, São Paulo.

SIMON-VALENCIA, M.C. *et al.* Contribución al estudio del diagnóstico del moquillo en perros: II. Estudio sobre algunas técnicas de aislamiento del virus del moquillo. **Medicina Veterinaria**, v.4, p.333-340, 1987.

SINGER, R.F. Doença de Paget dos Ossos (Osteíte Deformante). In: WYNGAARDEN, J.B. *et al.* **Tratado de Medicina Interna**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.1461-1463.

SOMA, T. *et al.* Detection of canine distemper vírus antigen in canine serum and its application to diagnosis. **Veterinary Record**, v.153, p.499-501, 2003

SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. **Acta Neuropathology**, v.46, p.1-10, 1979.

SUMMERS, B.A. Canine Distemper encephalomyelitis: Variation with virus strain. **Journal Company Pathology**, v.84, p.65-75, 1984.

TIERKEL, E.S.; ATANASIU, P. Rapid microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological tests. In : MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWSKI, H. **Laboratory techniques in rabies**. Geneva: World Organization, 1996. p. 55-85.

TIPOLD, A. Diagnosis of Inflammatory and Diseases of the Central Nervous System in Dogs: A Retrospective Study. **Journal of Veterinary International Medicine**, v.9, p.304-313, 1995.

TIPOLD, A.; VANDELVE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v.33, p.466-470, 1992.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, 804 p.

TYRREL, D.L. & NORRBY, E. Structural polypeptides of measles virus. **Journal General Virology**, v.39, p.219-229, 1978.

VAINIONPAA, R.; MARUSYK, R.; SALMI, A. The Paramyxoviridae: Aspects of molecular structure, pathogenesis, and immunity. **Advances in virus Research**, v.37, p. 211-243, 1989.

VANDEVELDE, M.; KRISTENSEN, B.; BRAUND, K.G.; GREENE, C.E.; SWANGO, L.J.; HOERLEIN, B.F. Chronic Canine Distemper Virus Encephalitis in Mature Dogs. **Veterinary Pathology**, v.17, p.17-29, 1980.

VAN REGENMORTEL, M.H.V. *et al.* **Virus Taxonomy**. California: Academic Press, 2000. p. 549-561.

VON MESSLING, V.; HARDER, T.C.; RAUTENBERG, V.M.P.; NOLTE, I.; HAAS, L. Rapid and Sensitive Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Canine Distemper Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.4, p.1049-1056, 1999.

ZURBRIGGEN, A.; MULLER, C.; VANDEVELDE, M. In situ hybridization of virulent canine distemper virus in brain tissue, using digoxigenin-labeled probes. **American Journal Veterinary Research**, v. 54, n.9, p.1457-1461, 1993.

WHEELER, S.J. Manual of small animal neurology. Gloucestershire: **British Small Animal Veterinary Association**, p.256, 1995.

WINTER, V.P. **Índice Terapêutico Veterinário- Pequenos Animais**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas, 2004. 637p.

WOOD, S.L.; THOMSON, G.W.; HAINES, D.M. Canine distemper virus-like infection in a captive African lioness. **Canadian Veterinary Journal**, v.36, p.34-35, 1995.

WOOLF, A.; GREMILLION-SMITH, C.; EVANS, R.H. Evidence of canine distemper virus infection in skunks negative for antibody against rabies virus. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.189, n.9, p.1086-1088, 1986.

YOSHIKAWA, Y. *et al.* Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Veterinary Microbiology**, v.20, p.193-205, 1989.

YOSHIDA, E. *et al.* Epitopes and nuclear localization analyses of canine distemper virus nucleocapsid protein by expression of its deletion mutants. **Veterinary Microbiology**, v.66, p.313-320, 1999.

