

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**ALINE CARVALHO GALANTE**

**IMUNOCROMATOGRAFIA, OBSERVAÇÕES CLÍNICA,  
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES  
(*Canis familiaris*) COM SUSPEITA DE CINOMOSE**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2009**

**ALINE CARVALHO GALANTE**

**IMUNOCROMATOGRAFIA, OBSERVAÇÕES CLÍNICA,  
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES  
(*Canis familiaris*) COM SUSPEITA DE CINOMOSE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira**

**COORIENTADOR: Prof. Antonio Peixoto Albernaz**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES**

**2009**

**ALINE CARVALHO GALANTE**

**IMUNOCROMATOGRÁFIA, OBSERVAÇÕES CLÍNICA,  
HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA DE CÃES  
(*Canis familiaris*) COM SUSPEITA DE CINOMOSE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, na Área de Concentração de Sanidade Animal.

Aprovada em 2 de julho de 2009.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Maulori Curié Cabral (Doutor, Microbiologia) - UFRJ

---

Prof. Cláudio Baptista de Carvalho (Doutor, Medicina Veterinária) - UENF

---

Prof. Antonio Peixoto Albernaz (Doutor, Produção Animal) - UENF

---

Prof<sup>a</sup>. Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira (Doutora, Microbiologia) - UENF  
(Orientadora)

**Aos**

**Meus pais, Joel dos Santos Galante e Rute Carvalho Galante, e meus irmãos,  
Alan Carvalho Galante e Jocimar Carvalho Galante.**

**Ao meu noivo, Luiz Fernando Pereira Vieira.**

**E, ao meu pequenino cão, Bam Bam.**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente em todos os momentos de minha vida. Resguardando-me todos os dias, não deixando que nada de mal me acontecesse e nem a ninguém próximo de mim. Iluminando-me nos momentos que me encontrei perdida. E no momento que pensei em desistir, Ele mostrou-me que esta não era a decisão a ser tomada. Graças Lhe dou!

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, onde concluí o curso de Medicina Veterinária. Ali, desde o programa de Iniciação Científica (PIBIC), aprendi a pesquisar e me possibilita mais um passo neste caminho da investigação.

À minha orientadora, Professora Sílvia Regina Ferreira Gonçalves Pereira, que me escolheu para ser sua aluna no PIBIC e acreditou no meu potencial. Orientou-me na monografia, direcionou-me no mestrado e deixou em mim traços importantes para o processo de pesquisa.

Ao meu coorientador, Professor Antonio Peixoto Albernaz, que fez parte da minha formação acadêmica e deixou o laboratório de Patologia Clínica à minha disposição.

Aos Médicos Veterinários, Maria Angélica Dutra Viestel, Ricardo Benjamin Machado Alves, André Lacerda de Abreu Oliveira, Sérgio Campos, Cristina Leite Francisco Gualberto Ramos e José Leonardo Gualberto Ramos, por sempre trocarem ideias e se fazerem presentes em momentos do experimento.

Aos técnicos de laboratório, Josias Alves Machado e Orlando Augusto Melo Júnior, que realizaram os exames laboratoriais do experimento e ajudaram a sanar muitas das minhas dúvidas.

Ao técnico José Evaldo Machado, que sempre colhia a quantidade de sangue necessária, com o cuidado para não causar dor, angústia ou sofrimento aos animais.

À Natasha Dalfior Signorelli, aluna de Iniciação Científica (PIBIC), que me ajudou com as amostras sempre que necessário.

Às estagiárias do Laboratório de Patologia Clínica, Rebeca, Nathália, Thainá, Beatriz, Críscila e Valdinélia. Tiveram uma enorme paciência comigo, dando

entrada nas amostras, guardando os soros e correndo com os laudos, sempre com um sorriso no rosto. Obrigada meninas!

A todos os alunos inscritos na Disciplina “Clínica Médica dos Pequenos Animais”, no ano de 2008, que sempre se lembraram de mim quando imaginavam que poderia haver um cão com cinomose na rotina clínica.

Aos alunos de pós-graduação, Renato Moran Ramos e Daniela Fantini Vale, por se fazerem presentes quando foram necessárias anestesia e colheita de líquido dos animais.

Aos meus familiares, mãe, pai, irmãos e cunhada que, mesmo não sendo da área, participaram, perguntando e vivenciando todas as minhas conquistas e derrotas. Mãe, pai, obrigada por tantas orações e por não me deixarem desistir.

Ao meu noivo, Luiz Fernando Pereira Vieira, que viveu o experimento intensamente como se fosse dele, dando ideias, soluções e ajudando na prática sempre que necessário, o meu carinho.

A Sabina Secchin Scárdua Vieira, minha cunhada, que foi uma luz imprescindível na análise dos dados. Obrigada.

Ao meu pequeno cão-filho Bam Bam, o *pinscher* mais lindo da face da Terra. Dormiu no meu colo todas as vezes que fiquei horas à frente do computador pesquisando e escrevendo. Por ter sido forte, sempre que pedia para não ficar doente quando eu chegava do hospital e ele nem me dava tempo de trocar de roupa.

A todos os proprietários e seus respectivos cães que participaram do experimento. Sempre foi muito duro olhar para vocês e dizer que seus animais eram positivos para a cinomose canina, sempre foi difícil quando eles não conseguiram permanecer entre nós!

**“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”**

**“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.”**

**(Antoine de Saint-Exupéry)**

## RESUMO

A cinomose canina é uma enfermidade infectocontagiosa de distribuição mundial. O agente etiológico é um vírus-RNA, helicoidal e envelopado, classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*, espécie *Canine distemper virus*. A família *Paramyxoviridae* é composta por vírus responsáveis por grande parte das viroses que acometem tanto animais quanto humanos. Dentre as viroses ocasionadas, encontram-se: a parainfluenza, o sarampo, a caxumba, a doença de Newcastle e a cinomose canina. Esta última é uma das moléstias virais mais importantes dos caninos domésticos, pelas altas taxas de morbidade e letalidade. Geralmente, esta infecção viral acomete cães jovens não vacinados ou com falha vacinal, embora animais adultos e vacinados não estejam livres. Ainda que haja vacinas efetivas para prevenção e controle da cinomose canina, muitos animais ainda morrem devido à virose. O diagnóstico da cinomose canina na cidade de Campos dos Goytacazes, como na maioria das cidades do Brasil, baseia-se no histórico, sintomatologia clínica, hemograma e bioquímica do sangue. O presente trabalho objetivou realizar diagnóstico rápido e específico da cinomose canina, por meio de um *kit* diagnóstico fundamentado no método imunocromatográfico, técnica que detecta qualitativamente o antígeno do CDV, em cães com suspeita clínica da doença. Realizaram-se *swabs* conjuntivais e colheita de líquido para testar os animais pela técnica. Paralelamente, observaram-se clínica, hematológica e bioquimicamente os cães positivos para a cinomose canina. Entre março e novembro de 2008, foram diagnosticados clinicamente positivos para cinomose canina 64 cães, mas, em apenas 30, o resultado confirmou-se pela imunocromatografia (46,87%). Não houve prevalência, pela imunocromatografia, quanto à idade, sexo e raça no grupo dos positivos. Várias raças foram examinadas (fila, pastor belga, labrador, pit bull, poodle e pinscher), porém, 40% dos animais positivos foram aqueles sem raça. A estação do ano teve relação com a frequência da cinomose canina, estando associada à primavera (50%). A falha no esquema vacinal não foi estatisticamente diferente entre positivos e negativos. Nenhum sinal clínico (sistêmico ou neurológico) apresentou diferença significativa entre positivos e negativos, demonstrando que o diagnóstico baseado apenas nos sinais clínicos



observados gera uma grande possibilidade de falso positivo. Secreção ocular, diarreia, febre e secreção nasal foram as alterações sistêmicas mais comuns. As alterações neurológicas mais comuns foram paresias, mioclonia, incoordenação, opistótono e nistagmo. O hemograma apresentou características associadas à positividade da cinomose canina. Na série vermelha, as alterações não foram significativas quando comparados positivos e negativos. Na série branca, houve alterações associadas à positividade da cinomose canina, mais especificamente a neutrofilia e a linfopenia (56,7% em ambas). As plaquetas não apresentaram alterações significativas quando comparados positivos e negativos. Quarenta por cento dos cães positivos apresentaram a infecção viral concomitante com hemoparasitoses. As alterações bioquímicas não puderam ser associadas à presença do CDV. Concluiu-se que os sinais clínicos devem servir apenas como uma triagem para o diagnóstico laboratorial e não como uma forma de diagnóstico definitivo. Sempre que possível, o Clínico Veterinário deve realizar o diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina. O ensaio imunocromatográfico mostrou-se rápido e de fácil realização.

Palavras-chave: virologia, clínica médica, *paramyxoviridae*, canídeos.

## ABSTRACT

The canine distemper is a contagious infectious disease of worldwide distribution. The etiologic agent is a RNA virus, helical and enveloped, classified in the order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, genus *Morbillivirus*, *Canine Distemper virus* species. This family has viruses that infect a broad range of animals and humans. Among the virosis caused are: parainfluenza, measles, mumps, Newcastle disease and canine distemper. The last is the most important infectious disease of domestic dogs, because it has high rates of morbidity and letality. Usually, canine distemper affects young dogs, unvaccinated or with failure vaccination, but adults animals and vaccinated are not free of viral infection. Although there are effective vaccines for prevention of canine distemper, many animals still die due to the viral disease. The diagnosis of canine distemper in the city of Campos dos Goytacazes, as in most cities in Brazil, is based only on history, clinical signs, hemogram and biochemistry analysis. This study aimed to achieve rapid and specific diagnosis of canine distemper through a diagnostic kit based on the immunochromatographic method, technique that qualitatively detects the antigen of CDV in dogs with clinical suspicion of disease. Conjunctival swabs and cerebrospinal fluid were collected to test the animals by immunochromatography. In positive animals was achieved the characterization clinical, biochemical and hematological. Between March and November of 2008 64 dogs were clinically diagnosed positive for canine distemper, but in only 30 the result was confirmed by the immunochromatography (46.87%). There was no prevalence for age, sex and breed in the positive group by immunochromatography. Several breeds were present (Brazilian row, Belgian shepherd, labrador, pit bull, poodle and pinscher), but the mongrel was 40% of the animals that were positive by immunochromatography. The season of the year had relationship with canine distemper, being associated with the spring (50%). The failure in the vaccination scheme was not statistically different between positive and negative. No clinical signs (neurological or systemic) showed significant difference between positive and negative, showing that the diagnosis based only on clinical signs generates a great possibility of false positive. Ocular secretion, diarrhea, fever and nasal secretion were the most common systemic signs.

The most common neurological disorders were paresis, myoclonus, incoordination, opisthotonos and nystagmus. The hemogram showed the positive characteristics associated with canine distemper. In the red cells alterations were not significant when compared positive and negative. The leucogram had alterations associated with the canine distemper, more specifically neutrophilia and lymphopenia (56.7% in both). The platelets showed no significant alterations when compared positive and negative. Forty percent of positive dogs showed concomitant infection with hemoparasitosis. The biochemical alterations could not be associated with the presence of CDV. It was concluded that the clinical signs should serve only as a screening for the laboratory diagnosis and not as a definitive diagnosis. Always that is possible, the Clinical Veterinarian must perform the *ante mortem* laboratory diagnosis of canine distemper. The immunochromatographic test was fast and easy to perform.

Key words: virology, medical clinic, *paramyxoviridae*, canideos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um <i>Morbillivirus</i> .....	27
<b>Figura 2.</b> Realização do <i>swab</i> conjuntival em cão.....	57
<b>Figura 3.</b> Procedimento de uso do <i>Anigen Rapid CDV Ag Test kit</i> <sup>®</sup> .....	58
<b>Figura 4.</b> Colheita de líquido em cão.....	59
<b>Figura 5.</b> Componentes do <i>kit</i> de imunocromatografia .....	61
<b>Figura 6.</b> Princípio de funcionamento do teste de imunocromatografia.....	62
<b>Figura 7.</b> Resultados do teste de imunocromatografia .....	62

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Frequência entre positivos e negativos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.....	64
<b>Gráfico 2.</b> Frequência das faixas etárias no grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	66
<b>Gráfico 3.</b> Frequência entre fêmeas e machos dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	66
<b>Gráfico 4.</b> Frequência das raças dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	67
<b>Gráfico 5.</b> Frequência da cinomose canina em relação à estação do ano. ....	68
<b>Gráfico 6.</b> Distribuição do esquema de vacinação dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	69
<b>Gráfico 7.</b> Frequência de alterações sistêmicas presentes no grupo de animais positivos, pela técnica de imunocromatografia.....	70
<b>Gráfico 8.</b> Frequência de alterações neurológicas presentes no grupo de animais positivos, pela técnica de imunocromatografia.....	71
<b>Gráfico 9.</b> Alterações hematológicas, série vermelha, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	72
<b>Gráfico 10.</b> Alterações hematológicas, série branca, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia .....	73
<b>Gráfico 11.</b> Alterações hematológicas, plaquetas, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	74
<b>Gráfico 12.</b> Alterações bioquímicas presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. ....	75

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Taxonomia da família <i>Paramyxoviridae</i> , com as subfamílias, gêneros e espécies de vírus protótipos da família .....	25
<b>Quadro 2.</b> Complexo de sinais clínicos relacionados à cinomose canina .....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Resultados da imunocromatografia para a cinomose canina em secreção conjuntival e líquido de cães com diferentes sinais clínicos .....	65
---	----

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1. Objetivo geral:	21
2.2. Objetivos específicos:	21
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	<b>22</b>
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>23</b>
4.1. Histórico	23
4.2. Espécies animais susceptíveis à cinomose	24
4.3. Taxonomia viral	25
4.4. Estrutura e propriedades gerais do vírus	26
4.5. Replicação viral	28
4.6. Epidemiologia	29
4.7. Patogenia	31
4.8. Sinais Clínicos	32
4.8.1. Alterações clínicas no sistema nervoso central	33
4.8.1.1. Encefalite aguda ou “dos cães jovens”	34
4.8.1.2. Encefalite multifocal secundária ou “dos cães adultos”	34
4.8.1.3. Encefalite esclerosante subaguda ou “dos cães idosos”	35
4.8.2. Alterações clínicas em outros sistemas	35
4.9. Patologia	36
4.9.1. Afecções do sistema respiratório	36
4.9.2. Afecções do tecido epitelial	37
4.9.3. Afecções oftálmicas	38
4.9.4. Afecções do sistema dentário	38
4.9.5. Afecções do sistema nervoso central	39
4.10. Resposta imune	41
4.10.1. Resposta imune “rápida ou efetiva”	42
4.10.2. Resposta imune “lenta ou parcial”	42
4.10.3. Resposta imune “falha”	42
4.11. Diagnóstico	42



4.11.1.	Hematologia .....	43
4.11.2.	Pesquisa de inclusão viral .....	44
4.11.3.	Análise do líquido .....	44
4.11.4.	Isolamento viral .....	44
4.11.4.1.	Em ovos embrionados.....	44
4.11.4.2.	Em cultivo celular.....	45
4.11.4.3.	Em animais de laboratório.....	46
4.11.5.	Detecção do antígeno viral .....	46
4.11.5.1.	Imunofluorescência.....	46
4.11.5.2.	Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	46
4.11.5.3.	Soroneutralização viral .....	47
4.11.5.4.	Imunoistoquímica.....	47
4.11.5.5.	Imunocromatografia.....	47
4.11.6.	Diagnóstico histopatológico .....	48
4.11.7.	Diagnóstico molecular .....	49
4.11.7.1.	Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	49
4.11.7.2.	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	49
4.11.8.	Diagnóstico diferencial .....	51
4.12.	Prognóstico .....	52
4.13.	Tratamento.....	52
4.14.	Profilaxia .....	53
<b>5.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
5.1.	Amostragem e local de realização .....	55
5.2.	Avaliação do paciente.....	55
5.3.	Colheita e acondicionamento das amostras .....	55
5.3.1.	Sangue e soro .....	55
5.3.2.	Swab conjuntival.....	56
5.3.3.	Líquor .....	58
5.4.	Processamento das amostras.....	60
5.4.1.	Hemograma e pesquisa do corpúsculo de Lentz.....	60
5.4.2.	Análise bioquímica do sangue.....	60
5.4.3.	Ensaio imunocromatográfico .....	60
5.5.	Análise estatística .....	63

<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
6.1. Dados gerais.....	65
6.1.1. Idade .....	65
6.1.2. Sexo e raça .....	66
6.1.3. Sazonalidade da cinomose canina .....	67
6.1.4. Vacinação.....	68
6.2. Alterações clínicas .....	69
6.2.1. Alterações sistêmicas.....	69
6.2.2. Alterações neurológicas .....	70
6.3. Alterações hematológicas.....	71
6.3.1. Série vermelha .....	71
6.3.2. Série branca .....	72
6.3.3. Plaquetas.....	73
6.4. Alterações bioquímicas.....	74
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>76</b>
7.1. Dados gerais.....	76
7.2. Alterações clínicas .....	78
7.3. Alterações laboratoriais .....	79
7.4. Diagnóstico clínico x imunocromatográfico.....	81
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>9. RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>85</b>
<b>11. ANEXO A .....</b>	<b>101</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma enfermidade infectocontagiosa de distribuição cosmopolita. O vírus da cinomose canina está classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus* e espécie *Canine distemper virus* (ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007). Os paramixovírus são considerados, pela Organização Mundial de Saúde, (OMS; *World Health Organization – WHO*), agentes de grande impacto econômico na Saúde Pública. Entre esses, estão os responsáveis por grande parte das viroses que, severamente, acometem animais e humanos, tais como: a parainfluenza, o sarampo, a caxumba, a doença de Newcastle, além da cinomose canina. A família *Paramyxoviridae* inclui um dos agentes mais infecciosos conhecidos entre humanos, o vírus do sarampo (*Measles virus*), o qual é antígenicamente relacionado ao vírus da cinomose canina (*Canine distemper virus – CDV*). O CDV possui um genoma RNA de fita simples com polaridade negativa, em um nucleocapsídeo helicoidal, protegido por um envelope lipoproteico. A cinomose canina é uma das mais importantes enfermidades infectocontagiosas virais multissistêmicas dos caninos (EK-KOMONEN et al., 1997; HEADLEY e SAITO, 2003; ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007; SHERDING, 2003).

A cinomose canina é citada desde o século XVIII, mas foi em 1809 que ocorreu a primeira descrição clínica e, apenas 100 anos depois, foi confirmada a doença como resultante de um vírus, com a consagração de tal postulado em 1926. A cinomose canina já foi descrita em diferentes espécies animais, sendo considerada enzoótica e, em grande parte dessas, apresenta a doença na forma subclínica e elimina o vírus no ambiente, constituindo uma preocupante forma de disseminação da virose (BAUMANN, 2004; CIRONE et al., 2004; MAIA e GOUVEIA, 2001; SHERDING, 2003).

Durante muito tempo, a cinomose canina foi uma das maiores causas de doenças neurológicas em cães. Porém, a partir da vacinação sistemática, houve uma grande redução na sua incidência. A idade de maior incidência da cinomose

canina coincide, justamente, com a época em que a taxa de anticorpos maternos diminui, a cerca de dois a seis meses de idade. Contudo, animais adultos também podem contrair a virose, se não receberam a vacina contra cinomose canina ou se a receberam em esquema incompleto (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003).

Não há uma terapia antiviral específica para o tratamento da cinomose canina. Dessa forma, o tratamento concentra-se no uso de soros imunes e levando-se em conta os sintomas particularmente apresentados por cada animal. A melhor forma de combate à virose é por meio da prevenção pela vacinação (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997; TWARK e DODDS, 2000).

A cinomose canina não apresenta predileção por sexo ou raça. Os reservatórios e transmissores são os próprios animais doentes. O CDV é principalmente transmitido durante a fase aguda, por aerossóis e gotículas infectantes provenientes de secreções e excreções respiratórias, digestivas e urinárias do organismo de animais infectados, expandindo-se rapidamente entre animais jovens susceptíveis. A taxa de infecção é maior do que o número dos animais que desenvolvem a enfermidade. Estima-se em até 75% o número de cães susceptíveis que se tornam subclínicamente infectados e eliminam vírus sem sinais clínicos (BAUMANN, 2004; GOUVEIA et al., 1987; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

A sintomatologia e a taxa de letalidade da cinomose canina variam de acordo com a espécie animal, idade, imunocompetência do hospedeiro, e com a cepa viral. Quando comparada a outras viroses que acometem cães, a cinomose canina é a que apresenta maior morbidade, 25 a 75%. A letalidade também é bastante alta, 50 a 90%, menor apenas que a letalidade causada pelo vírus da raiva. Clinicamente, animais com cinomose canina podem apresentar febre bifásica, sinais gastrintestinais, respiratórios, neurológicos e lesões cutâneas. A mioclonia é altamente sugestiva da cinomose canina, porém, sua ausência é comum. As manifestações neurológicas podem evoluir de forma aguda, subaguda ou crônica. Três formas clínico-patológicas em cães têm sido descritas: a encefalomielite de cães jovens, a encefalomielite multifocal de cães adultos e a encefalomielite do cão idoso (APPEL e SUMMERS, 1995; BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1993;

GREENE e APPEL, 2006; KOUTINAS et al., 2002; SWANGO, 1997; TIPOLD et al., 1992).

O diagnóstico clínico da cinomose canina, ainda hoje, é realizado apenas mediante o histórico do animal e a sintomatologia clínica. Este tipo de diagnóstico é muito difícil, principalmente nos casos de manifestação neurológica focal, onde outros sintomas sistêmicos, prévios ou concomitantes, comuns a outras alterações neurológicas (além da mioclonia) estão ausentes. Hematologia, urinálise, eletroforese das proteínas séricas, pesquisa do corpúsculo de Lentz, imunofluorescência, sorologia, imunoistoquímica, PCR e ensaios imunocromatográficos ou imunoenzimáticos são importantes métodos laboratoriais para o apoio ao diagnóstico clínico da cinomose canina (BATISTA et al., 2000; BAUMANN, 2004; FEITOSA et al., 1997; FRISK et al., 1999; GEBARA et al., 2004a; GREENE e APPEL, 2006; KIM et al., 2001; KOUTINAS et al., 2002; SHERDING, 2003; TIPOLD et al., 1992).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral:

I – Detectar antígeno do vírus da cinomose canina, por meio de um *kit* diagnóstico fundamentado no ensaio imunocromatográfico, em cães com suspeita clínica.

### 2.2. Objetivos específicos:

I – Observar clínica, hematológica e bioquimicamente os cães positivos para a cinomose canina.

II – Valorizar a aplicabilidade do diagnóstico da cinomose canina, utilizando-se, como amostras biológicas, o líquido e/ou o epitélio conjuntival.

### 3. JUSTIFICATIVA

A cinomose canina é uma das enfermidades virais mais importantes dos cães domésticos no mundo, em face às altas taxas de morbidade e mortalidade. Geralmente, os cães jovens, entre três e seis meses de idade, são os mais acometidos, logo após a imunidade passiva materna ter desaparecido.

O diagnóstico da cinomose canina na cidade de Campos dos Goytacazes, RJ, como em muitas outras localidades do Brasil, ainda é realizado apenas mediante a sintomatologia clínica e histórico do animal. No máximo, são solicitados hemograma e testes bioquímicos séricos.

Esta realidade está atrelada a uma problemática maior, visto que a maioria da população brasileira possui recursos financeiros escassos, refletindo assim no trabalho do Médico Veterinário que se vê impossibilitado de realizar exames laboratoriais mais apurados. Com isso, sabe-se da frequência da doença, porém o real número de animais infectados é desconhecido, podendo ser muito maior ou até menor, obscurecendo assim o diagnóstico de outras enfermidades.

Manifestações clínicas causadas por diferentes patógenos podem ser confundidas com as da cinomose canina. Exames laboratoriais complementares são, portanto, de suma importância para confirmar a suspeita clínica da cinomose canina. Tais fatos justificam o valor do presente trabalho de pesquisa em realizar um diagnóstico específico, paralelamente, realizando uma abordagem clínica e laboratorial desses pacientes, para que sirvam como ferramentas aos Médicos Veterinários.

O trabalho corrobora a rotina de diagnóstico virológico laboratorial para os pequenos animais no Hospital Veterinário da UENF, até então pouco aplicada.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Histórico

Os primeiros relatos sobre a apresentação da cinomose canina precedem à segunda metade do século XVIII. Para Spinola, a doença seria proveniente da Europa, porém Hessinger afirmava a primeira ocorrência ter sido no Peru (BAUMANN, 2004).

Desde o século XIX, a natureza contagiosa da cinomose entre os cães domésticos já era conhecida. Porém, Carré, entre os anos de 1905 e 1906, foi quem demonstrou a etiologia viral, inoculando secreção nasal de cães doentes em cães saudáveis. Os estudos de Carré não foram aceitos por todos os pesquisadores e profissionais, pois atribuía grande valor ao papel patogênico da *Bordetella bronchiseptica*, era comumente encontrada em cães acometidos pela cinomose. O postulado de Carré só foi confirmado, posteriormente, por Laidlaw e Dunkin, em 1926, em numerosas experiências e, mais tarde, tal bactéria foi compreendida como causa de infecção secundária (APPEL e SUMMERS, 1999).

A partir de 1930, a cinomose canina passou a ser perfeitamente conhecida em suas formas clínicas e etiológicas. Em 1948, Cole, Engel e Goss demonstraram, em esfregaços de conjuntiva e de língua, corados pela rotina de hematoxilina e eosina (H&E), inclusões celulares, com aparência homogênea, cor vermelho-brilhante e tamanhos variáveis, formas redondas ou ovais e com contorno irregular. Estas inclusões estão presentes no citoplasma e, ocasionalmente, no núcleo das células epiteliais (BAUMANN, 2004).

Durante a primeira metade do século XX, a cinomose canina foi uma enfermidade fatal nos cães e comum em todo mundo. As vacinas de vírus inativados produzidas na década de 40 não controlaram a doença. Uma queda drástica foi observada nos anos subsequentes com o aparecimento das vacinas de vírus vivo modificado, mas, nos últimos anos, a incidência parece ter aumentado, devido a falhas na vacinação e/ou imunização insuficiente. Atualmente, a cinomose canina encontra-se difundida por todo o mundo e em variadas espécies animais (BAUMANN, 2004).



#### 4.2. Espécies animais susceptíveis à cinomose

Vários animais da ordem *Carnivora* são susceptíveis ao CDV, com a letalidade variando de acordo com a espécie. Além da família *Canidae* (cão doméstico, lobo, chacal, raposa, dingo, coiote e outros), a susceptibilidade ao CDV foi descrita nas famílias *Procyonidae* (guaxinim, quati), *Mustelidae* (furão, doninha, visão, lontra e similares), *Hyaenidae* (hiena), *Ursidae* (ursos polares, urso panda), *Didelphidae* (cuíca), *Ailuridae* (panda vermelho), *Felidae* (felinos domésticos, leão, leopardo, guepardo, tigre, entre outros) e *Herpestidae* (suricata). Porcos, hamsters e camundongos, também podem ser infectados quando inoculados experimentalmente com o vírus (CIRONE et al., 2004; MAIA et al., 1999; RIKULA et al., 2001; SHELL, 1990; SHERDING, 2003).

A susceptibilidade dos felinos ao CDV foi demonstrada em 1992, na Califórnia e, em 1994, na Tanzânia. Pouco se sabe ainda, sobre susceptibilidade do gato doméstico ao CDV, porém, entre 1970 e 1990, amostras de plasma de gatos, oriundas do Japão, foram consideradas positivas para a presença do CDV. Em 1998, novos estudos com colheitas de amostras clínicas foram realizados para a pesquisa do CDV em gatos, e a presença do vírus foi constatada em alguns (IKEDA et al., 2001).

O vírus da cinomose também causou doença nos ambientes aquáticos, tanto em habitat marinho quanto em água doce. O vírus levou à morte, focas na Rússia, entre 1987 e 1988, e foi isolado destes mamíferos aquáticos, no Canadá (BARRET, 1999).

### 4.3. Taxonomia viral

A família *Paramyxoviridae* é composta pelos vírus RNA, de sentido negativo, da grande ordem *Mononegavirales*. A organização genética dos vírus desta família é similar às das famílias *Rhabdoviridae*, *Filoviridae* e *Bornaviridae* classificadas na mesma ordem (ICTV, 2009; LYLES e RUPPRECH, 2007).

A família *Paramyxoviridae* é subdividida em duas subfamílias: *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. A *Pneumovirinae* contém os gêneros *Pneumovirus* e *Metapneumovirus*. A subfamília *Paramyxovirinae* contém os gêneros *Respirovirus*, *Rubulavirus*, *Henipavirus*, *Avulavirus* e o *Morbillivirus* (Quadro 1). O vírus da cinomose canina pertence a este último gênero e está classificado na espécie *Canine distemper virus* (CDV), que infecta os vertebrados (ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007).

Família	Subfamília	Gênero	Espécie (Vírus Protótipo)
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	<i>Respirovirus</i>	<i>Sendai vírus (SeV)</i>
		<i>Rubulavirus</i>	<i>Mumps vírus (MuV)</i>
		<i>Henipavirus</i>	<i>Hendra vírus (HeV)</i>
		<i>Avulavirus</i>	<i>Newcastle disease vírus (NDV)</i>
		<i>Morbillivirus</i>	<i>Canine distemper vírus (CDV)</i>
	<i>Pneumovirinae</i>	<i>Pneumovirus</i>	<i>Bovine respiratory syncytial vírus (BRSV)</i>
		<i>Metapneumovirus</i>	<i>Human metapneumovirus (HMPV)</i>

**Quadro 1.** Taxonomia da família *Paramyxoviridae*, com as subfamílias, gêneros e espécies de vírus protótipos da família (ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007).

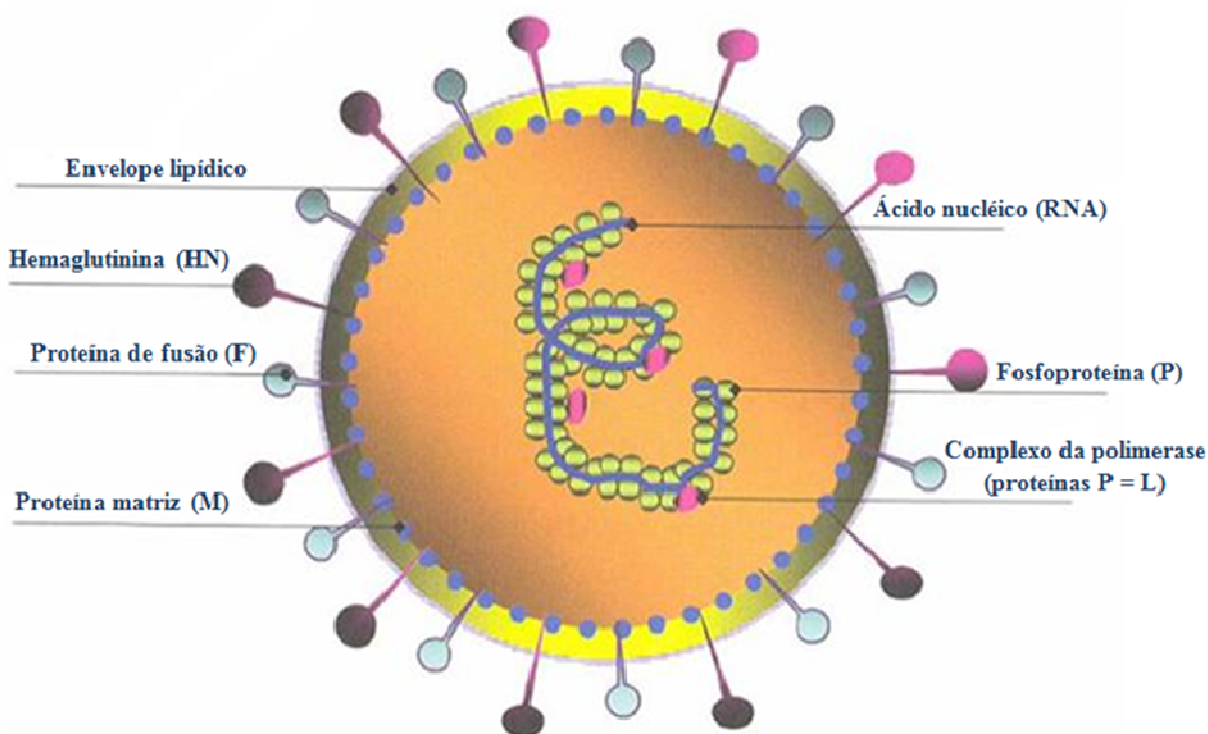
O vírus da cinomose canina (*Canine distemper vírus* – CDV) assim como os demais vírus da família *Paramyxoviridae* são especialmente relacionados a duas outras famílias de vírus: *Orthomyxoviridae*, pelas propriedades biológicas das glicoproteínas do envelope, e *Rhabdoviridae*, pela semelhança da organização do

genoma não segmentado e sua expressão. O CDV é intimamente relacionado aos vírus do sarampo (*Measles virus*) e ao da peste bovina (*Rinderpest virus*), havendo reação cruzada entre os mesmos, e estas reações ocorreriam devido a ribonucleoproteína e aos antígenos do envelope viral (LAMB e PARKS, 2007).

Na família *Paramyxoviridae*, estão incluídos vírus responsáveis por grande parte das viroses que acometem tanto animais quanto humanos. Tais vírus são considerados pela OMS como causas de grande impacto, econômico e na Saúde Pública. Dentre as viroses envolvidas estão: parainfluenza, sarampo, caxumba, doença de Newcastle e cinomose canina, entre outras (LAMB e PARKS, 2007).

#### **4.4. Estrutura e propriedades gerais do vírus**

O *Morbillivirus* da cinomose canina (CDV) é um vírus grande e pleomórfico, medindo 150 a 250 nm de diâmetro e possui um envelope constituído por dupla camada lipídica derivada da membrana plasmática. O CDV possui distintas projeções de superfície (peplômeros) no envelope viral, as espículas de glicoproteínas: hemaglutinina-neuraminidase (HN) e fusão (F) que medem 12 a 15 nm de comprimento por 2 a 4 nm de largura (figura1) (BROWN et al., 2005; ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007; MESSLING et al., 2001).



**Figura 1.** Representação esquemática de um *Morbillivírus* (adaptado de SANTOS et al., 2002).

Associada ao envelope e ao nucleocapsídeo, há a proteína da matriz (M), que promove a estabilização do virion. O nucleocapsídeo é composto pelo genoma e pelas proteínas: nucleoproteína (N) que se liga diretamente ao genoma e promove sua proteção; a fosfoproteína (P) e proteína *large* (L), que juntas formam a RNA polimerase do vírus (BROWN et al., 2005; ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007; MESSLING et al., 2001).

O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal simples e mede 600 a 800 nm de comprimento por 13 a 18 nm de diâmetro. O genoma consiste de uma única molécula linear de RNA de fita simples com polaridade negativa que contém 15 a 16 Kb (BROWN et al., 2005; ICTV, 2009; LAMB e PARKS, 2007; MESSLING et al., 2001).

A glicoproteína HN é responsável pela adsorção do vírus à célula hospedeira. Enquanto a glicoproteína F é mediadora da fusão entre a membrana da célula hospedeira e o envelope viral, formando, posteriormente, o sincício (como

uma “célula gigante multinucleada”). Na formação do vírion, a proteína F é produzida na forma de pré-proteína (forma inativa), ativada por um processo de clivagem proteolítica, por meio de uma protease celular. Esse processo é essencial para infecção da célula. A presença ou ausência de proteases específicas na célula hospedeira pode determinar maior ou menor virulência, ou mesmo a não infecção da célula pelo vírus (LAMB e PARKS, 2007; STERN, et al., 1995).

O CDV é sensível aos fatores ambientais, como temperaturas extremas, pH e desinfetantes (QUINN et al., 2005). O CDV é inativado pela luz natural ou ultravioleta e pode ser destruído quando exposto à temperaturas de 50°C a 60°C por 30 minutos, em tecidos mortos sobrevive por 1 h a 37°C e por 3 h a 20°C (ZEE, 2003). Porém, em baixas temperaturas, o vírus pode sobreviver por semanas entre 0-4°C e até por sete anos a -65°C (GREENE e APPEL, 2006). A infecciosidade do vírus é perdida em pH acima de 10,4 ou abaixo de 4,4. O vírus pode ser inativado por desinfetantes, como o clorofórmio, fenol (0,75%), amônio quaternário (0,3%) e solução formalina (0,5%) (ZEE, 2003).

#### **4.5. Replicação viral**

A replicação dos *Paramyxovirus* ocorre dentro do citoplasma, e muitos deles se replicam em células anucleadas. O processo de replicação se inicia com a adsorção do vírus à célula, que se dá pelo acoplamento da glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN) aos receptores da membrana celular. Em seguida, a proteína de fusão (F) promove a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula, o que permite a liberação do nucleocapsídeo intacto dentro do citoplasma (LAMB e PARKS, 2007).

A RNA polimerase viral (proteínas L e P) inicia a transcrição a partir da extremidade 3' do RNA genômico. Os genes são transcritos em mRNAs individuais, seguindo a sequência com que aparecem no genoma. A cada junção gênica, a polimerase reconhece um sinal de terminação do gene (sequência de nucleotídeos específica), que determina a inserção da cauda poli A no final do mRNA, que é liberado após esse processo. Há uma pequena região intergênica não codificante e,

no próximo gene, há uma sequência de início de transcrição, que determina a adição da estrutura “quepe” no início do mRNA, que será transcrito. Em alguns casos, entre o processo de parada e reinício de transcrição, a polimerase pode se desprender do genoma e então o gene seguinte não é transcrito, portanto os genes mais próximos da extremidade 3’ são transcritos em maior quantidade em relação aos da extremidade 5’. A tradução dos mRNAs ocorre nos ribossomos livres do citoplasma ou do retículo endoplasmático rugoso (LAMB e PARKS, 2007).

O mesmo complexo polimerase que faz a transcrição é responsável pela estratégia de replicação do genoma completo do vírus. Após a produção de certa quantidade de proteínas virais, a polimerase recebe um sinal (ainda não bem compreendido) que determina a parada do processo de transcrição e o início do processo de replicação do genoma. Assim, a polimerase não mais reconhece os sinais de início e de parada de transcrição, e o genoma completo é formado, primeiro, no sentido positivo (anti-senso) e depois, utilizando como molde essa fita, é formado o genoma da progênie viral em sentido negativo (LAMB e PARKS, 2007).

A maturação do vírion envolve quatro estágios: 1) incorporação das glicoproteínas virais na membrana plasmática da célula hospedeira; 2) associação da proteína matriz e outras proteínas não glicosiladas, que vão promover alterações na membrana plasmática da célula hospedeira; 3) alinhamento do nucleocapsídeo sob a proteína da matriz; 4) formação e liberação de vírions maduros por brotamento através da membrana citoplasmática (LAMB e PARKS, 2007).

#### **4.6. Epidemiologia**

A cinomose canina é uma doença infectocontagiosa cosmopolita, distribuindo-se pela maior parte do globo. Apesar de ocorrer em qualquer época do ano, a ocorrência sazonal da virose já foi descrita por Gorham (1966) e Patronek et al. (1995), com o maior número de casos ocorrido no inverno. Esta incidência maior durante os meses frios pode estar relacionada a um ambiente mais propício para a sobrevivência do CDV (APPEL e GILLESPIE, 1972; BORBA et al., 2002; EK-KOMMONEN et al., 1997; GREENE e APPEL, 2006).

Estudos epidemiológicos têm sido relatados em muitos países, como Índia, Dinamarca, Finlândia, Estados Unidos e Brasil, baseados na pesquisa de anticorpos neutralizantes, achados clínicos e avaliação de antígenos e anticorpos (HEADLEY e GRAÇA, 2000). No Brasil, mais especificamente, os estudos epidemiológicos ocorreram em Belo Horizonte (MG), Santa Maria (RS) e Maringá (PR) (BORBA et al., 2002).

A predileção por sexo ainda não foi bem demonstrada. Alguns autores indicam que há uma diferença entre os sexos e outros não a levam em consideração. A predileção por raça já foi descrita, sendo demonstrado que as raças braquicefálicas são menos susceptíveis ao desenvolvimento de encefalites quando comparadas às raças dolicocefálicas (HEADLEY e GRAÇA, 2000). Alguns autores indicam ainda que cães sem raça definida são mais infectados pelo CDV do que cães de raça definida (GORHAM, 1966; HEADLEY e GRAÇA, 2000; PATRONEK et al., 1995).

Há diferença epidemiológica entre cães urbanos e os que vivem isolados, com uma maior taxa de infecção nos cães urbanos (BAUMANN, 2004; GOUVEIA et al., 1987; HEADLEY e GRAÇA, 2000).

A idade de maior incidência da cinomose canina é a época em que a taxa de anticorpos maternos diminui, a cerca de dois a seis meses de idade ou em animais neonatos. Assim, demonstra-se uma relação entre susceptibilidade e idade (BAUMANN, 2004; HEADLEY e GRAÇA, 2000; SHERDING, 2003).

Os animais infectados e doentes eliminam o agente infeccioso pelas secreções nasais e lacrimais, assim como pela saliva e urina, donde o CDV pode ser isolado. Nas fezes, nem sempre se consegue evidenciar o vírus. As portas de entrada do agente causal da cinomose canina são as mucosas respiratórias e digestivas superiores. Além do contato direto, a transmissão pode ocorrer indiretamente por alimentos ou objetos contaminados (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

O CDV pode ser eliminado por 60 a 90 dias após a infecção. A taxa de infecção é maior que o número dos animais que apresentam quadro clínico. Estima-se que 75% dos cães susceptíveis tornam-se subclínicamente infectados (GREENE e APPEL, 2006; SHERDING, 2003).

Os reservatórios e as fontes de infecção do CDV são os cães doentes, com ou sem clínica aparente, os animais silvestres e os cães que já se recuperaram da doença, mas que ainda podem disseminar o vírus (BAUMANN, 2004; GREENE e APPEL, 2006).

#### **4.7. Patogenia**

Durante uma exposição natural, o CDV penetra no organismo pelas vias aérea ou oral, ou seja, pelo trato respiratório anterior. Após a penetração, nas primeiras 24 horas, a replicação do vírus ocorre nos macrófagos e se difunde para as tonsilas e linfonodos bronquiais através da circulação linfática local (APPEL, 1969; BAUMANN, 2004).

Durante o quarto e o sexto dias, a replicação viral ocorre nos granulócitos e monócitos do sangue, passa aos gânglios linfáticos mediastínicos e mesentéricos, ao baço e às células de Kupffer, à medula óssea e ao timo. A partir do sexto dia, todos os tecidos linfóides tornam-se infectados e ocorre a viremia, que corresponde ao primeiro pico febril, com leucopenia (APPEL, 1969; SHELL, 1990). Entre o sexto e o nono dias após a exposição, o vírus difunde-se para o tecido epitelial. É neste momento que o animal pode desenvolver anticorpos contra o vírus, alterando o curso da infecção. Em animais que não conseguem responder de forma eficiente à replicação viral, começam a surgir, entre o 14º e 16º dias, os sinais clínicos da doença, dentre eles: segundo pico febril, anorexia, diarreia, dispneia e déficits neurológicos (BAUMANN, 2004; GREENE e APPEL, 2006; SHELL, 1990; SHERDING, 2003).

Independentemente da via de inoculação do vírus, a cinomose canina adota uma evolução septicêmica, que acomete o sistema nervoso central (SNC) de forma irreversível. A difusão do vírus para o SNC ocorre entre oito a nove dias após a infecção. Há variação da localização e severidade das lesões. A infecção tanto pode ser fatal em poucos dias, como pode evoluir durante semanas com final fatal ou ainda estabilizar-se sem um comprometimento maior (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003).



#### 4.8. Sinais Clínicos

Na infecção pelo CDV, após o período de incubação, ocorre período bifásico de elevação da temperatura. O primeiro pico febril, entre 39,5° e 41°C, dura de oito a 48 horas e põe em evidência o estágio virêmico. Após este primeiro pico febril, segue um intervalo de um a dois dias sem febre, com posterior pico, cuja duração e intensidade dependem da gravidade das alterações orgânicas (Quadro 2) (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003).

<b>Sintomas oculares</b>	Conjuntivite de início serosa, depois mucosa e, após, purulenta;	
	Alopecia periorbital devido ao exsudato irritante;	
<b>Sintomas respiratórios</b>	Espirros com acúmulo de descarga nasal ao redor das narinas como crostas secas;	
	Laringite e bronquite que evolui a traqueíte, bronquiolite e broncopneumonia;	
<b>Sintomas gastrintestinais</b>	Vômito; Diarreia	
<b>Sintomas cutâneos</b>	Exantema vesiculopustuloso localizado predominantemente na parte posterior do abdômen e face interna da coxa assim como no conduto auditivo externo;	
	Hiperqueratose do coxim plantar e nariz;	
<b>Sintomas nervosos</b>	Cerebral	Perturbações psíquicas, sensitivas e motoras;
		Convulsões;
	Bulbar	Salivação abundante;
		Paralisia lábio-glosso-laríngea;
	Medular	Mioclonia dos membros anteriores e/ou posteriores;
		Paraparesia ou tetraparesia;
Cerebelar	Incoordenação motora;	

**Quadro 2.** Complexo de sinais clínicos relacionados à cinomose canina. Sinais oculares, respiratórios, digestivos, exantemáticos e nervosos (GREENE e APPEL, 2006; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

Uma leve conjuntivite serosa a mucopurulenta é um dos primeiros sinais percebidos pelo proprietário do animal cinomósico, seguida, em poucos dias, por uma tosse seca evoluindo para produtiva. Podem ser auscultadas crepitações nos pulmões e a pneumonia bacteriana concomitante é bastante comum (GREENE e APPEL, 2006; HAWKINS, 1997).

A evolução aguda é a forma mais frequente da cinomose canina, cujos sintomas iniciais são depressão e anorexia, seguidas por vômito e diarreia mucossanguinolenta. A enterite severa como única alteração clínica, ocorre em poucos animais, e com uma difícil diferenciação da parvovirose canina (BAUMANN, 2004; BURROWS, 1997; CASTELLANO, 1993; GREENE e APPEL, 2006; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

#### **4.8.1. Alterações clínicas no sistema nervoso central**

Vandevelde e Zurbriggen (2005) afirmaram que 50% dos pacientes cinomósicos apresentam sinais sistêmicos antes ou concomitante ao neurológico. Aproximadamente a metade dos cães que se cura dos sinais sistêmicos apresenta, mais tarde, sinais neurológicos da cinomose canina.

A duração da apresentação neurológica pode ser de dias a meses, e os sinais apresentados estão diretamente ligados à região do sistema nervoso central (SNC) afetada. Também de acordo com a região comprometida, a cinomose canina pode apresentar-se em três momentos: desde o princípio, no final da fase aguda ou quando o animal parece estar curado (FENNER, 1997; GREENE e APPEL, 2006; VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005).

A cinomose canina compreende sintomas diversos geralmente graves como: encefalites (“dos cães jovens”, “dos cães adultos” e “dos cães velhos”), ataxia, tremores da cabeça e do corpo, hipermetria, inclinação da cabeça, nistagmo, mioclonias (contrações involuntárias do músculo), convulsões, incoordenação motora, ambulação em círculos, hiperestesia, rigidez muscular, vocalização e cegueira. A magnitude do envolvimento neurológico tem grande influência no prognóstico da cinomose canina (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

O sinal mais comum na fase nervosa da cinomose canina é o aparecimento de mioclonias, constatadas mais comumente nos músculos faciais, mastigatórios e apendiculares e já foram consideradas patognomônicas da cinomose canina (JONES et al., 2000). No entanto, a mioclonia já é relatada em outras desordens inflamatórias do SNC, embora bem menos frequente (KOUTINAS et al., 2002).

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 (GREENE e APPEL, 2006; TIPOLD et al., 1992).

#### **4.8.1.1. Encefalite aguda ou “dos cães jovens”**

A encefalite aguda ou “encefalite dos cães jovens” é acompanhada de sinais sistêmicos. Os sinais neurológicos são variáveis, sugerindo-se uma distribuição multifocal das lesões. Espasmos, semelhantes aos da epilepsia, e mudanças de personalidade, tais como depressão e desorientação são comuns, assim como incoordenação motora, hipermetria, quedas, cabeça inclinada, nistagmo, monoplegia ou paraplegia. Entretanto, os sinais clínicos mais característicos são as mioclonias (persistentes durante o sono) e espasmos dos membros flexores (GREENE e APPEL, 2006; GRÖNE et al., 2004).

A forma subaguda da cinomose canina apresenta, aparentemente, os mesmos sintomas da forma aguda, porém, enquanto a encefalomielite aguda destrói, predominantemente, a substância cinzenta do SNC (neurônios), a encefalomielite subaguda destrói, predominantemente, a substância branca do SNC (desmielinização) (GEBARA et al., 2004a; JONES et al., 2000).

#### **4.8.1.2. Encefalite multifocal secundária ou “dos cães adultos”**

A encefalite multifocal secundária da cinomose canina em animais adultos ou “encefalite crônica dos cães adultos” aparece, geralmente, em animais entre quatro e oito anos de idade. É uma enfermidade de curso lento e progressivo que não precede e nem coincide com os sinais sistêmicos (HEADLEY et al., 2001).

Entre os sinais clínicos encontrados estão: incoordenação motora, debilidade dos membros pélvicos, respostas uni ou bilaterais deficientes às ações de ameaça, inclinação da cabeça, nistagmo, paralisia facial e tremores da cabeça não acompanhados de mioclonia. Ocasionalmente, os cães podem cair, e o distúrbio poderá progredir até eventual paralisia. Os cães assim afetados permanecem mentalmente em alerta (GEBARA et al., 2004a; GREENE e APPEL, 2006; STEIN et al., 2006).

#### **4.8.1.3. Encefalite esclerosante subaguda ou “dos cães idosos”**

A “encefalite dos cães idosos” da cinomose canina é uma panencefalite esclerosante subaguda, comumente, observada em cães com mais de seis anos de idade. É uma forma de encefalite cinomósica crônica, um distúrbio progressivo de rara ocorrência. Os sintomas sistêmicos não estão presentes. O sinal neurológico mais comum é a diminuição visual e respostas bilaterais deficientes às ações de ameaça. Com a progressão da moléstia, os cães afetados ficam mentalmente deprimidos, começam a andar compulsivamente em círculos ou a comprimir a cabeça contra objetos, manifestam mudanças de personalidade, não reconhecem mais seus próprios donos, e nem respondem aos estímulos normais em seu ambiente. Portanto, as alterações patológicas foram descritas como encefalite esclerosante subaguda (GREENE et al., 2006; JONES et al., 2000).

A morte na forma nervosa ocorre por coma, ou durante as convulsões, ou ainda por razões secundárias à neuropatia, como ataxia, anorexia prolongada, decúbito favorecendo grave pneumonia hipostática, paresia e paralisia entérica e/ou visceral, perturbação metabólica geral e outros numerosos estados decorrentes das lesões nervosas primárias (SEEHUSEN, et al., 2007).

#### **4.8.2. Alterações clínicas em outros sistemas**

A cinomose canina também pode apresentar sinais clínicos variados, como a miocardiopatia viral no caso de infecções neonatais (SHERDING, 2003). Cães infectados pelo vírus da cinomose canina antes da erupção dos dentes podem apresentar hipoplasia do esmalte dentário. Com isso, há a exposição da dentina que

na macroscopia é demonstrado por áreas de coloração amarelo a bege nos dentes permanentes (GELBERG, 2007).

O exantema cutâneo, que progride até a formação de pústulas, especialmente no abdômen e na face interna da coxa, assim como no conduto auditivo externo, também pode ocorrer (BAUMANN, 2004; SWANGO, 1997).

A hiperqueratose dos coxins plantares e do focinho é considerada uma forma tardia da evolução da cinomose canina. Esta manifestação epitelial ocorre em cães que não possuem histórico de manifestação aguda ou subaguda da doença. Gröne et al. (2003) demonstraram que antígenos virais do CDV podem estar presentes nos coxins hiperqueratosos de animais acometidos, sugerindo assim uma forma de diagnóstico *ante-mortem* (FRIESS et al., 2005; GRÖNE et al., 2003).

O vírus da cinomose canina pode atingir diretamente o pulmão causando uma pneumonia viral, devido ao seu efeito imunossupressor ou levando à associação com outros vírus, como o *Adenovirus 2* e os *Parainfluenzavirus* (DAMIÁN et al., 2005; TOVAR et al., 2007; CHVALA et al., 2007) ou com infecções bacterianas secundárias (LÓPEZ, 2007).

As pneumonias causadas por *Bordetella bronchiseptica* ou *Mycoplasma* sp. podem ser observadas como infecções primárias de pulmão e como infecções secundárias em animais infectados pelo vírus da cinomose canina (CHALKER et al., 2004; ERLES et al., 2004; LÓPEZ, 2007; CHVALA et al., 2007). A infecção pulmonar pelo *Pneumocystis carinii* foi encontrada em animais com cinomose canina, sugerindo uma imunossupressão pelo vírus, levando à infecção secundária pelo agente (DYER e SCHAMBER, 1999).

## **4.9. Patologia**

### **4.9.1. Afecções do sistema respiratório**

No sistema respiratório, pode haver presença de exsudato seroso, mucopurulento ou catarral sobre a mucosa nasal e da faringe. Nas secções microscópicas, com freqüência, são observados corpúsculos de inclusão intracitoplasmática e intranuclear (“corpúsculos de inclusão mista”) nas células

associadas ao exsudato. Essas inclusões têm reação eosinofílica quando são coradas pela rotina de hematoxilina e eosina (H&E). No citoplasma, as inclusões são redondas a ovoides, variando de 5 a 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Habitualmente, são estruturas homogêneas e nitidamente demarcadas, ocasionalmente, situam-se em vacúolos adjacentes ao núcleo (JONES et al., 2000; PANDHER et al., 2006).

No pulmão, as lesões podem manifestar-se como uma broncopneumonia purulenta, na qual os brônquios e alvéolos adjacentes estão ocupados com neutrófilos, mucina, e debris teciduais. Nos primeiros estágios, o exsudato pode conter algum sangue, neutrófilos e células mononucleares que revestem as paredes alveolares ou que ocupam parcialmente os alvéolos e que constituem a única evidência de infecção. Em alguns exemplos, formam-se “células gigantes multinucleadas”, chamadas sincícios, no revestimento brônquico, septos alveolares, e livremente nos alvéolos (LÓPEZ, 2007; PANDHER et al., 2006).

#### **4.9.2. Afecções do tecido epitelial**

O CDV é considerado um vírus preferencialmente neurotrópico. Nos cães, está associado à hiperqueratose nasodigital e à dermatite pustular. Na pele, particularmente do abdômen, pode ocorrer uma dermatite vesicular e pustular. Microscopicamente, são observados corpúsculos de inclusão nucleares e/ou citoplasmáticos que podem estar presentes no interior das células epiteliais, especialmente das glândulas sebáceas (GRÖNE et al., 2003; GRÖNE et al., 2004; KOUTINAS et al., 2004).

Nos coxins digitais, a histopatologia revela hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica, vacuolização de queratinócitos e a presença de corpúsculos de inclusão viral, sendo a hiperplasia epitelial raramente mencionada (FRIESS et al., 2005; GRÖNE et al., 2004; KOUTINAS et al., 2004).

O epitélio do trato urinário, particularmente da pelve renal e da bexiga, pode conter vasos congestos e corpúsculos de inclusão citoplasmáticos e/ou intranucleares que podem ser evidenciados ao microscópio (GRÖNE et al., 2003; JONES et al., 2000).

O estômago e intestinos podem conter grande número de inclusões citoplasmáticas e algumas inclusões intranucleares no epitélio de revestimento.

No intestino grosso, o exsudato mucoso é excessivo, podendo ser demonstrados congestão e infiltrado inflamatório (por linfócitos) na lâmina própria (JONES et al., 2000; OKITA et al., 1997).

No fígado, a cinomose canina não causa lesões significativas, embora inclusões possam estar presentes no epitélio biliar. No coração, as lesões cardíacas são representadas por degeneração das células do miocárdio com necrose e calcificação multifocal (JONES et al., 2000).

#### **4.9.3. Afecções oftálmicas**

A doença oftálmica na cinomose canina é representada por lesões que o CDV causa no nervo óptico, gerando cegueira com pupilas dilatadas e que não reagem aos estímulos luminosos (NELSON e COUTO, 1998; WILCOCK, 1993).

Na retina, tais lesões traduzem-se por degeneração e necrose com deslocamento focal ou total da mesma. Há também o aparecimento de lesões crônicas, circunscritas, hiper-reflexivas, atróficas da região fúndica retiniana, são chamadas “medalhões dourados”. Ainda na retina, ocorrem congestão, edema, formação de manguitos perivasculares com linfócitos, degeneração de células ganglionares e gliose. Habitualmente, também ocorrem tumefação e proliferação do epitélio pigmentar da retina (JONES et al., 2000; NELSON e COUTO, 1998).

Uma uveíte anterior, caracterizada por infiltrado de células mononucleares juntamente com sincícios, é um achado comum. Também ocorre, comumente, um ressecamento que promove a ceratoconjuntivite seca, sinal clínico de fácil observação e compatível com a presença do CDV (JONES et al., 2000; NELSON e COUTO, 1998; WILCOCK, 1993).

#### **4.9.4. Afecções do sistema dentário**

A hipoplasia segmentar do esmalte ocorre em cães adultos que foram infectados com o CDV quando filhotes, na fase da odontogênese. Durante a infecção, o epitélio do órgão do esmalte apresenta lesões típicas de infecção viral. Incluindo, necrose, desorganização e perda da função de ameloblastos. Após o

16º dia de infecção pelo CDV, há encurtamento dos ameloblastos e presença das células gigantes sinciciais (KRUININGEN, 1998).

Após a recuperação da infecção viral, há o retorno da função e da organização do esmalte, seguido pelo restabelecimento da formação normal de esmalte, apesar da presença de áreas de coloração amarela a bege (GELBERG, 2007).

#### **4.9.5. Afecções do sistema nervoso central**

O grau de comprometimento do sistema nervoso central (SNC) é dependente da cepa viral, da idade e da imunocompetência do animal. Cães jovens e com imunodeficiência, frequentemente, desenvolvem necrose neuronal. Cães adultos e imunocompetentes, geralmente, apresentam desmielinização (GEBARA et al., 2004a).

No SNC, o CDV tem afinidade pelas partes mielinizadas do cérebro e medula espinhal, e as lesões produzidas podem ser detectadas somente por meio de microscópio. Essas lesões variam em intensidade e abrangência, habitualmente, em relação direta com a gravidade e duração da moléstia clínica. As estruturas mais constantemente afetadas são: pedúnculos cerebelares, véu medular anterior, os tratos mielinizados do cerebelo e colunas brancas da medula espinhal. Tais lesões são caracterizadas por áreas de necrose bem delimitadas, desmielinizações e inclusões, principalmente em astrócitos e célula da glia (BAUMANN, 2004; D'INTINO et al., 2006; GEBARA et al., 2004a).

Propõe-se que a infecção inicial do SNC ocorre por via hematogênica, seguida de processo inflamatório ou não. A lesão não-inflamatória caracteriza-se, primariamente, por infecção neuronal, enquanto a lesão inflamatória tipifica-se pela presença de vírus nos linfócitos perivascularres, nos neurônios, na epêndima e nas meninges. Além dessas, neste estágio, ocorre uma destruição das células microgliais, essenciais para a efetividade do sistema imune do cérebro (BRUNNER, et al., 2007; STEIN et al., 2004).

A inflamação inicial diminui e não é mais detectável, aproximadamente aos vinte dias após a infecção. O estágio seguinte de desenvolvimento da lesão



caracteriza-se por quase ausência de células inflamatórias, números reduzidos de oligodendrócitos, hipertrofia e hiperplasia de astrócitos, com graus variáveis de apoptose das células do sincício. Tais ocorrências levam a uma degeneração neuronal e a uma desmielinização multifocal, que ocorre durante o estágio inflamatório crônico da cinomose canina, esta associada à replicação viral no interior dos astrócitos. Os corpúsculos de inclusão (intracitoplasmáticos, intranucleares ou mistos) são observados, particularmente em astrócitos, células-alvo importantes para o CDV (JONES et al., 2000; NISHI et al., 2004; STEIN et al., 2004).

A primeira evidência de agressão da bainha de mielina é uma alteração balonosa, resultante da partição das bainhas de mielina ou de alterações mais degenerativas, incluindo tumefação axonal. Essa lesão é invariavelmente associada à proliferação astrocitária e microglial. Essa agressão inicial à bainha de mielina é seguida por remoção progressiva de bainhas compactas de mielinas por células microgliais fagocitárias (que infiltram as lamelas de mielina) e graus variáveis de necrose axonal. Num estágio posterior, a desmielinização é mais pronunciada e há inflamação não-supurativa que pode ser acompanhada por acúmulo de células de macrófagos. Durante esse estágio, células portadoras de imunoglobulinas e IgG ligada ao tecido degenerado aparecem nas lesões da substância branca (MORO et al., 2004; NISHI et al., 2004; SEEHUSEN, et al., 2007).

A substância branca subcortical do cérebro é habitualmente poupada. As lesões caracterizam-se por áreas de destruição com uma delimitação bastante nítida, particularmente nos tratos mielinizados. Ao microscópio de baixa ampliação, especialmente corado pelo método de Weil-Felix, são observados “buracos” bem delimitados com dimensões irregulares, que dão aos tratos acometidos um aspecto esponjoso (*status spongiosus*) (ALLDINGER, et al., 2000; BAUMANN, 2004).

Embora ofuscadas pelas alterações ocorrentes nos tratos mielinizados, também ocorrem alterações degenerativas nos neurônios, aparentemente resultantes da invasão primária viral e de lesões retrógradas secundárias à lesão axonal. Ocorre picnose, cromatólise, gliose e neurofagia. Raramente, podem ser detectados, nos neurônios, corpúsculos de inclusão citoplasmáticos e/ou nucleares. Pode ser encontrada uma necrose neuronal no córtex cerebral e cerebelar, nos núcleos pontinos e bulbares e na medula espinhal. Na maioria dos casos, está

presente uma leptomeningite, principalmente caracterizada por infiltrado linfocitário (JONES et al., 2000; SEEHUSEN, et al., 2007).

#### **4.10. Resposta imune**

Apenas 3% dos anticorpos maternos contra o vírus da cinomose canina são transferidos através da placenta e 97% através do colostro, resultando em um título inicial no recém nascido normalmente igual a 77% do título da mãe (STEIN et al., 2006).

Como uma pequena quantidade de anticorpos atravessa a placenta, os filhotes dependem da ingestão de colostro para adquirirem os anticorpos maternos, cuja absorção, através do intestino dos filhotes, reduz-se rapidamente após 72 horas de vida (SIXT et al., 1998).

O título de anticorpos passivos é variável em uma mesma ninhada, dependendo do título de anticorpos no soro da mãe, da quantidade de colostro ingerida por cada um dos filhotes e do tempo decorrido após o nascimento. Tais anticorpos têm vida média de apenas sete a oito dias e, na maioria dos casos, declinam a níveis não-protetores em aproximadamente oito semanas, fazendo-se necessária a imunização por meio de vacinações estratégicas. Porém, alguns filhotes adquirem uma quantidade de anticorpos que duram até quatro meses após o nascimento (SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

Os sinais típicos da enfermidade geralmente ocorrem em cães imunossuprimidos pelo vírus. Quando o sistema imune do hospedeiro responde satisfatoriamente, a infecção viral é superada e a clínica é inaparente, exceto pela ocorrência de encefalite numa percentagem relativamente pequena de cães (KUMAGAI et al., 2004).

O CDV causa danos linfoides disseminados, prejuízos à imunidade mediada por linfócitos B e T, linfopenia e atrofia tímica. As infecções bacterianas secundárias decorrentes são, frequentemente, responsáveis por muitos dos sinais clínicos associados à cinomose canina, contribuindo para o aumento da mortalidade (SCHOBESBERGER et al., 2005).

O animal poderá ter uma resposta imune “rápida ou efetiva”, “lerda ou parcial”, ou ainda uma resposta imune “falha”. O tipo de resposta imune do animal depende de seu estado físico (SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

#### **4.10.1. Resposta imune “rápida ou efetiva”**

Neste tipo de resposta imunitária, a infecção será subclínica com recuperação completa e eliminação do vírus (por volta do 14º dia após a infecção). Estima-se que mais de 50% das infecções pelo CDV são subclínicas (SHERDING, 2003).

#### **4.10.2. Resposta imune “lerda ou parcial”**

Este tipo de resposta ocorre quando não há uma resposta imune eficaz, ou seja, não há a completa resposta imune. Os sinais multissistêmicos são evitados, porém a localização do CDV no SNC poderá resultar em encefalomielite crônica com retardo do início dos sintomas neurológicos (SHERDING, 2003).

#### **4.10.3. Resposta imune “falha”**

Se o animal não desenvolver uma resposta imune entre o 9º e o 14º dia após a infecção pelo CDV, o resultado será uma disseminação rápida e abrangente do vírus para os tecidos epiteliais (tais como, o trato respiratório e gastrintestinal) e o SNC (encefalomielite aguda), resultando em sinais multissistêmicos, segundo pico febril e uma alta taxa de mortalidade (SHERDING, 2003).

### **4.11. Diagnóstico**

Em alguns países, o principal diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas dos cães (LATHA et al., 2007). No entanto, a apresentação variável da

clínica da cinomose canina pode dificultar o diagnóstico da doença (SHIN et al., 2004).

Segundo Kim et al. (2006), em vários casos, a combinação de alguns principais sintomas, como inflamação conjuntival, secreção respiratória, diarreia, doença com três semanas ou mais e sinais nervosos, sugerem um diagnóstico presuntivo da cinomose canina.

#### **4.11.1. Hematologia**

A anemia é um achado comum, atribuída ao aumento da destruição dos eritrócitos ou à diminuição de sua produção. Mendonça et al. (2000) afirmaram que a destruição dos eritrócitos deve-se à presença do vírus no interior do eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana da célula. Meyer et al. (1999) referem-se ao fato de ocorrer uma queda na produção, atribuída à falência medular devido ao estresse desencadeado pela doença. Na maioria dos casos, os eritrócitos apresentaram-se normocíticos e normocrômicos e sem sinais de regeneração medular.

O leucograma é uma característica variável. As contagens variaram de leucopenia a leucocitose. Infecções bacterianas oportunistas no trato alimentar e respiratório podem ser observadas em cães com cinomose canina. Isso justificaria a leucocitose, por neutrofilia, e o desvio à esquerda, observados nos animais (SILVA et al., 2005).

A trombocitopenia também é um achado frequente nos animais. O mecanismo responsável pela trombocitopenia associada a infecções virais na veterinária ainda é pouco conhecido. Sabe-se, apenas, que, para o gênero Morbillivirus, já se observou aumento de anticorpos antiplaquetas (FELDMAN et al., 2000). A trombocitopenia provavelmente é do tipo imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema retículo endotelial (LOPES JÚNIOR, 2006).

#### **4.11.2. Pesquisa de inclusão viral**

As inclusões descritas por Lentz, em 1907, em núcleos e citoplasmas de neurônios de cães que morreram com cinomose canina, e por Sinegaglia, em 1912, em células de outros órgãos, são denominadas Inclusões de Lentz ou de Sinegaglia-Lentz. Essas inclusões são compostas por agregados de nucleocapsídeos e debris celulares resultantes da ação. São coradas por corantes de base Romanowsky e não apresentam a mesma frequência nos diversos tecidos, como bexiga, brônquios, parênquima pulmonar, terceira pálpebra, hipocampo, fígado, cerebelo, córtex cerebral e medula oblonga. Seu número é pequeno em linfócitos e menor ainda em neutrófilos e hemácias (SILVA et al., 2005).

#### **4.11.3. Análise do líquido**

No líquido cefalorraquidiano (LCR) há um aumento de proteína (maior que 25 mg/dl), principalmente representada por IgG antivírus da cinomose canina e aumento de células (maior que 10 mg/dl) com predominância de linfócitos. Este aumento evidencia encefalite crônica. São achados inespecíficos, mas que sugerem etiologia viral como a do CDV. Esses achados não são verificados em cães vacinados contra a cinomose canina e nem nos que tenham tido cinomose canina sistêmica sem encefalite (AMUDE et al., 2007; SARMENTO, 2000).

A presença de anticorpos específicos para CDV no líquido é diagnóstico conclusivo da presença do vírus, porém a ausência desses anticorpos não descarta a possibilidade da infecção viral (GEBARA et al., 2004a; SHERDING, 2003).

#### **4.11.4. Isolamento viral**

##### **4.11.4.1. Em ovos embrionados**

Vários vírus podem ser propagados na membrana corioalantoide de ovos embrionados de galinha (FONSECA, 1994).

Em 1948, foi a primeira vez que o vírus da cinomose canina foi mantido em passagens em séries de ovos. A cepa desenvolvida foi chamada *Onderstepoort* e

teve, após 25 passagens, a virulência baixa para furões. Em 1945, outra cepa foi desenvolvida e adaptada em ovos, a *Lerderle*, tendo baixa virulência entre 24 a 28 passagens. Estas cepas têm sido amplamente utilizadas para vacinação da cinomose canina em animais susceptíveis (APPEL e SUMMERS, 1999).

#### **4.11.4.2. Em cultivo celular**

O vírus da cinomose canina pode ser cultivado em tecido, porém o isolamento leva muitos dias ou semanas e, frequentemente, não se obtém sucesso, se o cão afetado não estiver no estágio agudo da infecção. Uma vez adaptada à cultura de tecido, o vírus pode ser propagado em diferentes espécies como: cão, furão, bovino e humano. Cultura de células primárias tem sido empregada para adaptação. Células de rim de cão (MDCK), fibroblasto de embrião de galinha e rim de macaco verde africano (VERO) são utilizadas para experimentos e produção de vacinas (LEDNICKY et al., 2004).

O CDV pode ser cultivado em culturas primárias e contínuas. O isolamento de CDV virulento tem-se mostrado difícil em cultura de células de rotinas. O sucesso maior se dá em cultivo direto de tecido-alvo como linfócitos e macrófagos do hospedeiro infectado. Cultura de macrófagos alveolares detectam o vírus entre 24 a 48 horas (GREENE e APPEL, 2006).

Recentemente, linfócitos B de sagui (B95a) mostram ser altamente susceptíveis para o isolamento do CDV (KAI et al., 1993).

O CDV quando replicado em cultura de células VERO e outras linhagens permissivas, geralmente resulta em mudanças citopáticas, como a formação de células estreladas, de sincícios e apoptose (GUO e LU, 2000; KUMAGAI et al., 2004; MORO et al., 2004).

O tempo e a intensidade do efeito citopático varia de acordo com a cepa, diferentes tipos celulares, diferentes meios e condições de incubação. Células jovens produzem efeito citopático mais evidente que células envelhecidas (MORO et al., 2004).

#### **4.11.4.3. Em animais de laboratório**

O vírus foi adaptado a furões, camundongos suíços jovens e hamsters desmamados. A via de inoculação pode ser intranasal, parenteral e intracerebral (HIRSH e CHUNGZEE, 1999).

Furões quando inoculados pela via intranasal desenvolvem febre, conjuntivite, apatia e morte. A identificação do agente produtor utilizando o furão é muito segura, porém requer bastante tempo por transcorrer um período de 8 a 12 dias, além de ser bastante onerosa. Camundongos e *hamsters* quando infectados experimentalmente pela via intracerebral, desenvolvem sintomas neurológicos que podem levar a morte (BAUMANN, 1999).

#### **4.11.5. Detecção do antígeno viral**

##### **4.11.5.1. Imunofluorescência**

A imunofluorescência é, geralmente, realizada em impressões de epitélio respiratório, conjuntiva palpebral, prepúcio, vagina, tonsila, bexiga, sedimento de urina, medula óssea, estômago, duodeno, pulmão e encéfalo (ELIA et al., 2007; SANTOS, 2002).

A técnica de imunofluorescência direta aplicada ao diagnóstico do CDV é utilizada desde 1956 e é um dos métodos mais sensíveis e específicos na detecção dos antígenos virais. Quando utilizado os esfregaços de epitélio conjuntival, apresenta alto grau de sensibilidade, mas é, em geral, somente detectada no início da infecção, antes do desenvolvimento dos sinais neurológicos (ELIA et al., 2007; FERNANDES et al., 2004).

##### **4.11.5.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

O diagnóstico sorológico pode ser realizado mediante a mensuração de IgG e IgM anti-CDV, utilizando-se o ELISA, mas constitui um problema em cães vacinados (SOMA et al., 2003).

Os anticorpos IgM podem ser detectados no sangue, na fase aguda da doença, indicando infecção recente pelo vírus da cinomose canina. Os anticorpos

IgG começam a aparecer logo depois da fase aguda, mas podem continuar a serem detectados por anos (VON MESSLING et al., 1999).

#### **4.11.5.3. Soroneutralização viral**

A soroneutralização viral mensura somente os anticorpos direcionados contra epítopos específicos do vírus, envolvidos na infecção celular. Diferentemente, a imunofluorescência e o ensaio imunoenzimático (ELISA), métodos que detectam títulos de anticorpos mais elevados, mensuram todos os anticorpos contra o vírus. Assim, a soroneutralização viral é considerada o “padrão-ouro” em cães vacinados, para a detecção e a quantificação de anticorpos CDV-específicos (NOON et al., 1980; RIKULA et al., 2000).

Porém, há variáveis importantes que podem influenciar o resultado que devem ser consideradas, quando realizado o teste de soroneutralização, como a quantidade de vírus, o isolado viral utilizado para o teste e o volume de soro testado (TWARK e DODDS, 2000).

#### **4.11.5.4. Imunoistoquímica**

A técnica de imunoistoquímica tem sido empregada para a detecção de antígenos da cinomose canina. O antígeno pode ser encontrado em epitélio da mucosa nasal, dos coxins digitais e da pele, podendo, assim, a técnica ser empregada como diagnóstico *ante-mortem* da cinomose canina (MASUDA et al., 2006).

Para diagnóstico *post-mortem*, podem ser utilizadas outras amostras do estômago, pulmão, bexiga, encéfalo, baço, linfonodos, tonsila, rim, intestino e coxins digitais (LIANG et al., 2007; WENZLOW et al., 2007).

#### **4.11.5.5. Imunocromatografia**

O ensaio imunocromatográfico é fundamentado na detecção qualitativa do antígeno do CDV em diversas amostras biológicas, como secreção ocular (conjuntiva), secreção nasal (mucosa), saliva, urina, soro, plasma ou líquido.

O *kit* diagnóstico é rápido, seguro, altamente específico (97,7%) e sensível (98,8%), com leitura visual de fácil interpretação, não necessitando de



instrumentação. O *kit*-teste não apresenta reação cruzada com antígenos de agentes etiológicos que produzem quadros clínicos confundíveis com os da cinomose canina. Cães vacinados para a cinomose canina podem ser testados pelo o *kit*, desde que seja respeitado o intervalo de 15 dias entre a vacinação e a realização do teste. Após esse período, os antígenos virais da vacina não são mais detectados, o que evita a produção de falso-positivo. Cães tratados com soros hiperimunes podem gerar falso-negativo no teste, pois os anticorpos do soro podem neutralizar o antígeno viral.

#### **4.11.6. Diagnóstico histopatológico**

As lesões induzidas no SNC pelo CDV são bastante características, por isso a histopatologia é uma técnica que pode ser utilizada como diagnóstico definitivo dessa virose. Contudo, este é um procedimento de diagnóstico *post-mortem*, não contribuindo para o diagnóstico precoce da infecção (GEBARA et al., 2004a).

No exame histológico do SNC, a presença de vacúolos multifocais – desmielinização, infiltrados mononucleares perivasculares e em meninges e reação glial – são sugestivos de encefalomielite por cinomose canina (VANDEVELVE e ZURBRIGGEN, 2005; GEBARA et al., 2004a).

Nos órgãos do encéfalo, principalmente no cerebelo, ponte e véu bulbar que recobre o 4º ventrículo, podem-se observar manguitos linfóides perivasculares e, no cérebro, edema perivascular e congestão. Estas lesões, vistas em pequeno aumento, oferecem o aspecto de esponja. As inclusões intranucleares são principalmente encontradas nos astrócitos (JONES et al., 2000; GEBARA et al., 2004a; GREENE et al., 2006; SUMMERS et al., 1995).

Podem-se encontrar lesões também em: timo – com atrofia desde parcial até completa, principalmente em cães novos; pulmões – broncopneumonia catarropurulenta ou simplesmente congestão; baço – aumentado de volume e congesto; fígado – aumentado de volume e congesto; intestinos – com enterite catarro-purulenta ou catarro-hemorrágica; meninges – podem estar congestionadas nos casos de meningite e encefalite (GEBARA et al., 2004a).

#### 4.11.7. Diagnóstico molecular

##### 4.11.7.1. Hibridização *in situ* (ISH)

O genoma viral pode ser detectado em amostras biológicas fresca ou até mesmo em amostras conservadas por anos por meio de sondas radioativas (radioisótopos) ou não-radioativas (enzimas) (SANTOS et al., 2002).

Zurbriggen et al. (1998) desenvolveram sondas complementares para o CDV capazes de detectar o RNA viral em culturas primárias de cérebro e também no tecido cerebral.

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

O diagnóstico pela transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), se dá pela detecção do material genético viral. Para isso, são utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que amplificam uma região específica do genoma. As principais vantagens desta técnica incluem a rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infecciosidade da partícula viral e os altos níveis de sensibilidade e especificidade. A RT-PCR tem sido empregada com sucesso na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas, como sangue, soro, urina e fragmentos de órgãos (FRISK et al., 1999; GEBARA et al., 2004b; KIM et al., 2001).

Atualmente, a técnica da reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR), vem sendo empregada com sucesso na detecção do vírus da cinomose canina em diferentes tipos de amostras biológicas, provenientes de cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos (BARRETT, 1999; GEBARA et al., 2004).

As várias amostras utilizadas são sangue periférico, soro, *swab* conjuntival, secreção nasal, urina, líquido. *Swab* vaginal, tecidos pulmonares, estomacais, intestinal e urinário também podem ser utilizados para o diagnóstico da cinomose canina pela técnica RT-PCR. Entretanto, o *swab* conjuntival é o mais apropriado para o diagnóstico precoce da cinomose canina (KIM et al., 2006).

Segundo Gebara et al. (2004b), é possível detectar o ácido nucleico do vírus em urina de cães tanto com encefalite aguda quanto crônica, evidenciando a virúria.

Estes resultados demonstram que a técnica de RT-PCR é um método eficiente para realização do diagnóstico rápido, precoce e *in vivo* (ELIA et al., 2007; SAITO et al., 2005; SAITO et al., 2006a).

No entanto, Saito et al. (2006a) afirmam que o soro e o sangue periférico não são amostras boas para a detecção do vírus da cinomose canina pelo RT-PCR, caso o cão apresente apenas distúrbios neurológicos sem envolvimento sistêmico da doença. A baixa celularidade do líquido pode ser insuficiente para a preparação da amostra, que pode causar um inadequado isolamento do RNA viral.

A maior vantagem do PCR em tempo real é a habilidade de quantificar partículas virais em amostras clínicas, ao contrário do RT-PCR convencional que é uma análise qualitativa. Alta carga viral foi demonstrada em tecidos linfoides, como tonsilas, baço, linfonodos mesentéricos; em vísceras e na urina. No SNC, no lobo frontal foi encontrada uma alta concentração viral, sugerindo ser a área mais sensível para diagnóstico (ELIA et al., 2007).

Shin et al. (2004) levantaram a hipótese de utilização do *nested* PCR para diagnóstico da referida enfermidade. A efetividade da técnica foi demonstrada em amostras clínicas incluindo sangue, urina, *swab* nasal e saliva. Sendo um método ideal para detecção do vírus da cinomose canina em amostras clínicas, apresentou alta sensibilidade e consistência no desempenho laboratorial. Comparativamente ao RT-PCR, mostrou positividade relevante em todas as amostras testadas.

Segundo Józwik e Frymus (2005), o resultado do RT-PCR foi positivo em animais, poucos dias após a vacinação, e confirmou que o método pode levar a um diagnóstico falso-positivo da cinomose canina em cães vacinados com vacina de vírus vivo modificado. Portanto, o tempo mínimo entre a vacinação e o exame em cães doentes deve ser de seis semanas para excluir o resultado falso-positivo.

A técnica molecular de PCR ou RT-PCR ainda não é usada rotineiramente pelos clínicos, devido ao seu alto custo. Porém, tal diagnóstico seria muito mais eficaz e conclusivo do que o diagnóstico feito por imunofluorescência (JÓZWIK e FRYMUS, 2005).

#### **4.11.8. Diagnóstico diferencial**

A cinomose canina deve ser diferenciada, principalmente, da hepatite infecciosa canina, da leptospirose, da pasteurelose, da raiva e da doença de Aujeszky (pseudo-raiva). Tanto a leptospirose quanto a pasteurelose são infecções secundárias comuns à cinomose canina (BAUMANN, 2004).

A forma respiratória da cinomose canina deve ser diferenciada da doença das vias respiratória anteriores em caninos, a traqueobronquite infecciosa canina, mais conhecida como “tosse dos canis”, que possui como agentes virais paramyxovírus, adenovírus, reovírus e herpesvírus (BAUMANN, 2004; SWANGO, 1997).

A erliquiose canina pode levar a um quadro respiratório e nervoso. Portanto, deve também ser considerada para o diagnóstico diferencial da cinomose canina (BREITSCHWERDT, 1997).

A toxoplasmose também é um diagnóstico diferencial, pois é caracterizada por sinais neuromusculares, respiratórios e gastrentéricos, ou por infecções generalizadas associadas à com sintomatologia neurológica (MORETTI et al., 2006).

Segundo Brito et al. (2002), não é possível ter certeza que todos os casos de doenças neurológica sejam toxoplasmose clínica. Quando há sintomatologia neurológica, a suspeita é direcionada para outras infecções, como a cinomose canina.

A hipocalcemia pode levar o animal a apresentar distúrbios de movimento que mimetizam a mioclonia. Logo, também deve ser considerada no diagnóstico diferencial da cinomose canina (FENNER, 1997).

As intoxicações por clorados e clorofosforados e, em menor grau, as causadas por fosforados e carbamatos confundem-se com a cinomose canina. Podem causar diarreia, edema, congestão pulmonar e sinais nervosos, ora com apatia, ora com tremores, mioclonias, convulsões e, às vezes, agressividade (MORETTI et al., 2006).

#### **4.12. Prognóstico**

Este é reservado nas formas ou fases iniciais, digestiva e respiratória, pois as mesmas podem progredir para a fase nervosa. O prognóstico é ruim na doença avançada com lesões graves, entéricas e pneumônicas, que podem causar a morte. O mesmo ocorre na fase nervosa, pois a mesma comumente é progressiva, raras vezes estaciona e, leva à morte em curso agudo ou crônico, ou, quando o animal não vem a óbito, deixa sequelas que podem ser inabilitantes (GREENE, 2006).

#### **4.13. Tratamento**

A falta de um tratamento antiviral para a infecção do vírus da cinomose canina requer um tratamento suporte e sintomático. Na encefalite multifocal progressiva causadora de tetraplegia, semicoma e incapacitação, a eutanásia é recomendada (TIPOLD et al., 1992).

Nos casos de animais com convulsão, os anticonvulsivantes podem ser utilizados, como o fenobarbital. Corticosteroides, como a dexametasona, por via intravenosa, podem ser utilizados por causa da imunopatologia das lesões neuronais e para reduzir o edema cerebral, mantendo a terapia com doses anti-inflamatórias e, posteriormente, reduzindo a dose até o final do tratamento. A imunossupressão causada pelos esteroides é a principal desvantagem, porque a resposta inflamatória é responsável pela retirada do vírus do organismo (BAUMANN, 2004).

A terapia com glicocorticoides com dosagens anti-inflamatórias pode ter algum sucesso no controle da dilatação pupilar causada pela neurite óptica ou de alguns sinais associados à inflamação crônica da encefalite (TIPOLD, 1992; GREENE, 2006).

Como os macrófagos e seus produtos são importantes na indução da destruição do tecido nervoso, antioxidantes como vitamina E e vitamina C podem ser utilizados terapeuticamente (VANDEVELDE e ZURBRIGGEN, 2005).

Aplicar soro hiperimune específico na dose de 2 a 4 mL/Kg de uma só vez, distribuindo-o em vários locais por via intramuscular, ou ainda em um ou ambos os

lados do tórax, por via subcutânea, conforme o volume necessário. Em imunoterapia passiva de doenças a vírus (como no uso de antitoxinas), como norma, deve-se aplicar o soro hiperimune necessário de uma só vez, pois sua ação é fundamentalmente de soroneutralização (SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

O soro permanece ativo no animal por 15 a 30 dias, baixando seu título ou concentração paulatinamente, seja por soroneutralização, formando complexos antígeno x anticorpos, seja por metabolização e eliminação progressiva (GREENE, 2006).

Quando já há tiques ou paresias, o clínico pode sugerir o uso de soro hiperimune, conscientizando o proprietário de que, possivelmente, não haverá cura do animal. Se o cão já foi vacinado pelo menos uma vez, não se deve usar o soro, mas sim aplicar uma dose de vacina, para estimular células de memória e rapidamente produzir imunidade ativa (GREENE, 2006; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

A hidratação pode ser necessária e é preciso que seja realizada com líquidos hidroeletrólíticos complexos, como ringer, tentando hidratar e, ao mesmo tempo, manter o líquido no organismo, e não desequilibrá-lo ionicamente. A dose costuma ser equivalente a 5% do peso do animal, a cada 12 horas, caso haja visível perda de elasticidade da pele. É sempre conveniente adicionar 2,5 a 5% de glicose ao soro (GREENE, 2006; TIPOLD, 1992).

#### **4.14. Profilaxia**

Vacinas com vírus vivo atenuado eficazes tornaram-se disponíveis em 1950 e têm sido amplamente usadas desde 1960. A atenuação dos antígenos foi alcançada por passagens seriadas em cultura de tecidos, como nas células renais caninas (isolado *Rockborn*), em ovos embrionados de galinha (isolados *Onderstepoort*) ou em culturas de fibroblastos de frango (isolado *Lederle*). Apenas as vacinas com vírus vivo atenuado têm sido efetivas para proteger os cães da cinomose canina. Atualmente, as vacinas comercializadas, tanto em clínicas

veterinárias quanto em lojas de produtos agropecuários, são desse tipo (BIAZZONO et al., 2001; HARDER e OSTERHAUS, 1997).

Os anticorpos maternos adquiridos pelos filhotes os protegem da cinomose canina, mas, por outro lado, bloqueiam a resposta à vacina. Cerca de 50% dos filhotes respondem bem à imunização por volta de seis semanas de idade, 75% por volta dos nove meses e 95% por volta de 13 semanas de idade (SHERDING, 2003; SWANGO, 1997; TWARK e DODDS, 2000).

Com base nesses dados, recomendam-se três doses da vacina nos filhotes, a cada três ou quatro semanas, entre 45 dias a quatro meses de idade. Nos filhotes que não receberam colostro ou naqueles que iniciam a imunização mais tarde que o recomendado, pelo menos duas doses da vacina devem ser administradas, apesar da falta de interferência dos anticorpos maternos, pois uma única dose não permite que os cães desenvolvam imunidade que perdure por, pelo menos, um ano (SHERDING, 2003; TWARK e DODDS, 2000).

Cães adultos podem desenvolver a doença, assim, a periódica revacinação é recomendada, apesar da relativa imunidade prolongada conferida pela vacina (SWANGO, 1997).

Vacinas manuseadas e estocadas indevidamente também podem levar à falha vacinal, uma vez que a vacina contendo vírus vivo atenuado deve ser mantida sob refrigeração todo o tempo (TIZARD e NI, 1998). Não se pode descartar que falhas vacinais ocorrem, já que fatores endógenos e exógenos a influenciam. Entre os fatores inerentes ao imunógeno, os principais são: o isolado viral utilizado, a manutenção da imunogenicidade suficiente durante todo o processo de atenuação e o número de partículas virais atenuadas em uma dose (título viral) (RIKULA et al., 2000).

As diferenças individuais em animais vacinados influenciam o sucesso de uma imunização tanto quanto o antígeno utilizado. A idade, a genética, o estado de saúde, a nutrição, o meio ambiente e as situações de estresse são importantes para o resultado da imunização. Qualquer um desses fatores ou uma combinação deles pode influenciar a resposta do sistema imune e, por consequência, o sucesso da imunização (EK-KOMMONEN et al., 1997; TIZARD e NI, 1998).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Amostragem e local de realização**

Entre março a novembro de 2008, foram avaliados 64 caninos com idades variadas, de diferentes raças e sexos, que apresentaram sinais clínicos sugestivos de cinomose canina. Esses animais foram provenientes do serviço de atendimento clínico do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (HV-UENF), no município de Campos dos Goytacazes, estado do Rio de Janeiro.

### **5.2. Avaliação do paciente**

Os cães atendidos no setor da clínica médica do Hospital e apresentaram histórico compatível e sinais sugestivos de cinomose canina passaram por uma anamnese direcionada para tal enfermidade, cujos dados foram registrados em prontuário (Anexo A).

Durante a anamnese, foram averiguados o ambiente de vivência do animal, o histórico de vacinação e as alterações clínicas respiratórias, digestivas, oculares, neurológicas ou em outro sistema.

### **5.3. Colheita e acondicionamento das amostras**

#### **5.3.1. Sangue e soro**

Após a devida contenção do animal, realizaram-se a tricotomia e a antissepsia com álcool a 70% em um dos apêndices torácicos, na região da veia cefálica ou na região cervical, com vistas à punção da veia cefálica ou jugular, de acordo com o porte do cão.

Foram colhidos 5 mL de sangue por punção da veia cefálica ou da veia jugular, utilizando-se seringas agulhadas de 5 mL, estéreis e descartáveis.



Da amostra colhida, 1 mL foi acondicionado em frasco pediátrico a vácuo (Vacuette<sup>®</sup>), contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10%, homogeneizado e identificado. Um esfregaço sanguíneo foi realizado com uma gota de sangue nativo em lâmina de vidro. Os outros 4 mL foram acondicionados em frasco siliconizado com gel separador de coágulo (Vacuette<sup>®</sup>) e identificado, para a realização de provas bioquímicas.

As amostras foram transportadas ao Setor de Patologia Clínica do Laboratório de Sanidade Animal (LSA) do Hospital Veterinário (HV) da UENF em recipiente térmico contendo gelo reciclável.

### **5.3.2. Swab conjuntival**

Para a colheita da amostra de secreção ocular, um *swab* estéril (fornecido no *kit* diagnóstico) era umedecido em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%), para evitar lesões no epitélio e, delicadamente, era esfregado na mucosa conjuntival, no sentido vai-e-vem, com o intuito de colher algumas células epiteliais (Figura 2).



**Figura 2.** Realização do *swab* conjuntival em cão. *Swab* estéril previamente umedecido em solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) (ARQUIVO PESSOAL).

O *swab*, com a amostra, era inserido em um tubo (também fornecido no *kit*) que continha 300  $\mu\text{L}$  de tampão diluente (Tris-HCl, azida sódica e Triton X-100). O *swab* era agitado por 10 segundos na parede do tubo e a solução obtida (amostra + diluente) era utilizada no teste (Figura 3).



**Figura 3.** Procedimento de uso do *Anigen Rapid CDV Ag Test kit*<sup>®</sup>. Umidificar o *swab* estéril com solução salina (cloreto de sódio a 0,9%), esfregar na conjuntiva no sentido vai-e-vem, inserir o *swab* com a amostra no tubo com tampão diluente, agitando por 10 segundos. Para testar, pipetar e instilar, vagarosamente, quatro gotas no orifício do cassete-teste (BIOEASY, 2008).

### 5.3.3. Líquor

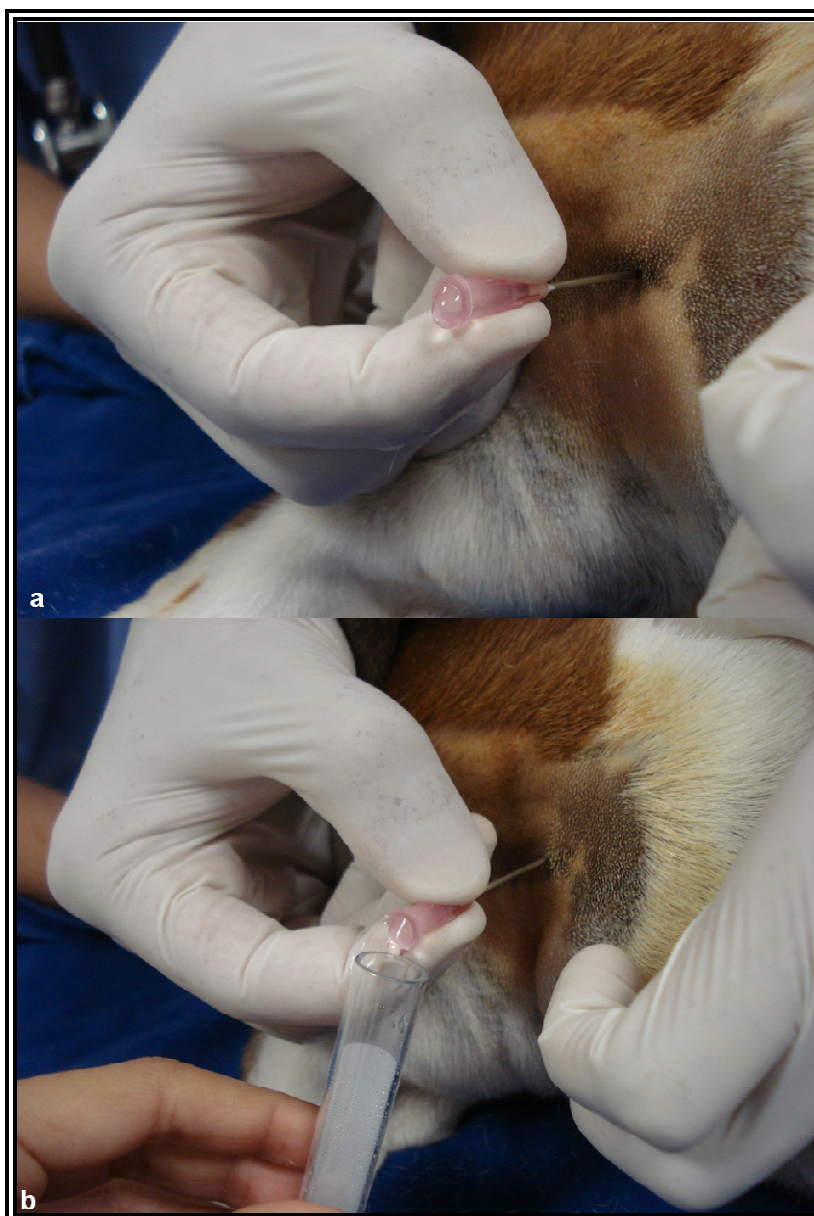
Após a devida tranquilização e anestesia, era colocada uma sonda traqueal no animal para devido suporte ventilatório. Realizaram-se a tricotomia e a antisepsia com álcool 70% e iodopovidine na região atlantoccipital, local da punção.

O paciente era posicionado em decúbito lateral, a cabeça flexionada em um ângulo de 90°, e a narina paralela à mesa. Com os dedos polegar e médio da mão esquerda, o clínico palpava as bordas craniais das asas do atlas, traçando uma linha imaginária na parte mais cranial. Com o indicador esquerdo, identificava a protuberância occipital externa, traçando a segunda linha imaginária caudalmente, deste local ao longo da linha média dorsal. O clínico sendo destro, o animal era colocado em decúbito lateral direito, com o pescoço flexionado, de forma que o eixo médio da cabeça estivesse perpendicular à raque, realizando o mesmo procedimento (NORSWORTHY et al., 2004).

O procedimento de aplicação da agulha requeria maiores cuidados, já que poderia lesionar a medula espinhal. Era utilizada uma agulha especial com mandril de 1,5 a 3" em ângulo reto na pele, perpendicularmente à raque e atravessando os tecidos subjacentes, evitando-se o movimento lateral da agulha para evitar danos (Figura 4a). A agulha avançava apenas 1 a 2 mm e o mandril era retirado, para os

destros segurado com a mão direita, para a observação do líquido (PELLEGRINO et al., 2003).

Quando aparecia o líquido na extremidade da agulha, 0,5 mL era colhido em um tubo estéril sem aplicação de sucção. O líquido colhido era utilizado para realização do ensaio imunocromatográfico (Figura 4b).



**Figura 4.** Colheita de líquido em cão. Inserção da agulha perpendicularmente à pele, penetrando até a camada muscular, passando pelo ligamento interespinhoso até chegar à dura-máter (a). Colheita do líquido em tubo estéril sem aplicação de sucção (b) (ARQUIVO PESSOAL).

## 5.4. Processamento das amostras

### 5.4.1. Hemograma e pesquisa do corpúsculo de Lentz

No laboratório, a análise hematológica foi realizada no contador hematológico de células (modelo MS4 – *Melet Schloesing Laboratories*<sup>®</sup>, França). Esfregaços sanguíneos foram confeccionados e corados pelo método panótico (*Newprov*<sup>®</sup>), para a realização da leucometria específica e avaliação qualitativa das células. Ainda no esfregaço sanguíneo, foi realizada a pesquisa do corpúsculo de Sinegaglia-Lentz, e de hemoparasitas.

### 5.4.2. Análise bioquímica do sangue

O sangue foi centrifugado a  $1,26 \times 10^4$  g, durante cinco minutos, para a separação do soro. Este foi armazenado em microtubos de 1,5 mL do tipo *Eppendorf*<sup>®</sup> e congelado em freezer a -20°C, para posterior realização dos testes bioquímicos: Alanina Aminotransferase (ALT), Aspartato Aminotransferase (AST), Fosfatase Alcalina (FA), Ureia, Creatinina, Proteínas Totais e Albumina.

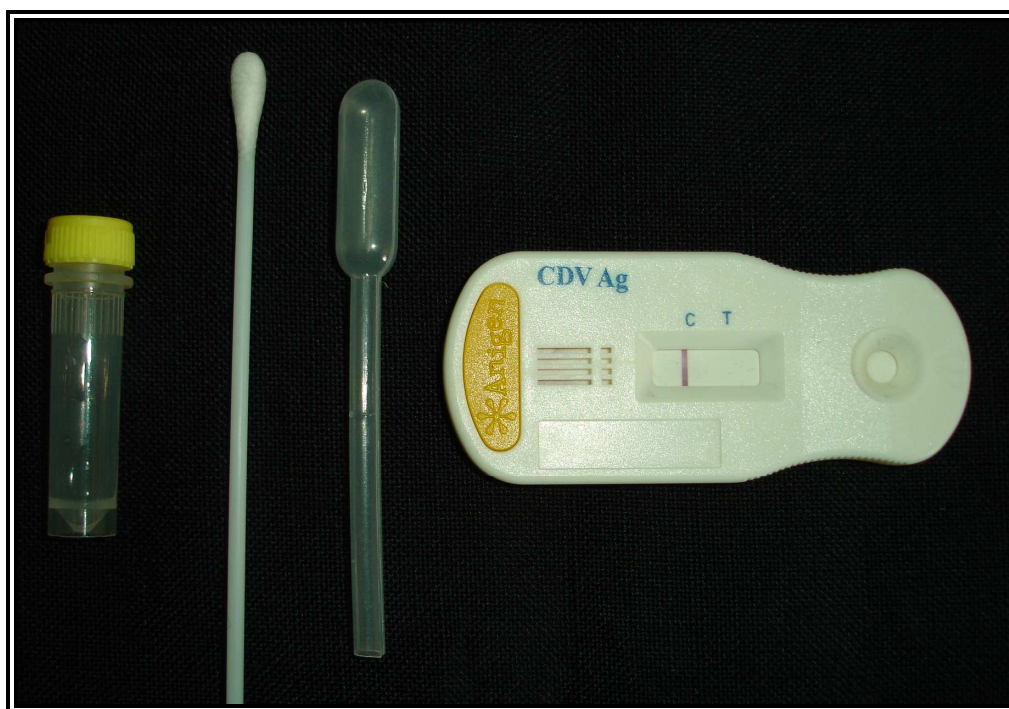
Os testes foram realizados, utilizando-se espectrofotômetro semiautomático (*Microlab*<sup>®</sup> 200 – Merck) e *kits* reagentes específicos (*Labtest*<sup>®</sup>).

### 5.4.3. Ensaio imunocromatográfico

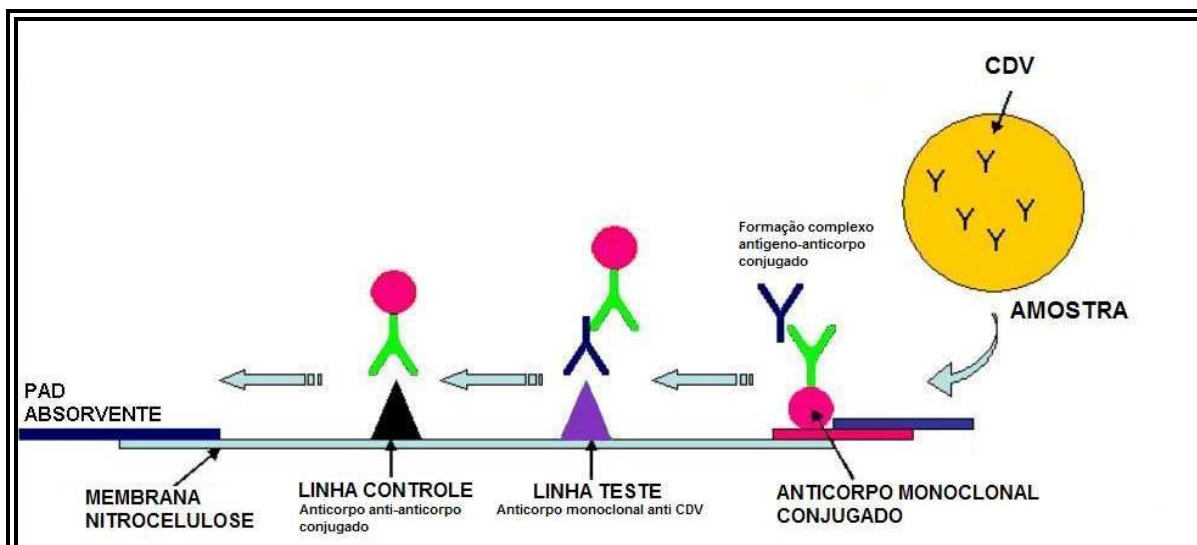
O teste imunocromatográfico foi realizado por meio do *kit* diagnóstico *Anigen Rapid CDV Ag Test kit*<sup>®</sup> (produzido por: *Animal Genetics Inc.* 476-1 – distribuído por: Bioeasy Diagnóstica Ltda.). Esse *kit*-diagnóstico é para detecção qualitativa do antígeno da cinomose canina em diferentes amostras biológicas como: secreção nasal (mucosa), saliva, secreção ocular (conjuntiva), urina, soro, plasma e líquido.

O *kit* é composto por *swab* estéril, tubo com tampão diluente (Tris-HCl, azida sódica e Triton X-100) e cassete-teste (Figura 5). O cassete é composto por anticorpo específico para cinomose canina, anticorpo conjugado com ouro, anticorpo conjugado e membrana de nitrocelulose. Quatro gotas de solução (amostra e tampão) são instiladas no orifício do cassete. Quando há o antígeno, este se liga ao anticorpo conjugado com ouro e migra pela membrana de nitrocelulose por capilaridade. Um *sandwich* é formado quando o anticorpo conjugado com ouro e

antígeno passam pela região onde se encontra o anticorpo específico (Figura 6), formando assim a linha teste (Figura 7a). A linha-controle sempre é formada (anticorpo conjugado com ouro + anti-anticorpo conjugado), independentemente de amostra positiva, para garantir o funcionamento do teste (Figura 7b).



**Figura 5.** Componentes do *kit* de imunocromatografia: tubo com tampão diluente, *swab* estéril, pipeta e cassete-teste (ARQUIVO PESSOAL).



**Figura 6.** Princípio de funcionamento do teste de imunocromatografia. O antígeno se liga ao anticorpo conjugado com ouro e migra pela membrana de nitrocelulose por capilaridade. Um *sandwich* é formado quando o conjugado anticorpo conjugado com ouro e antígeno passam pela região onde se encontra o anticorpo específico (linha-teste). A linha-controle é formada, independentemente de amostra positiva, com um anticorpo antianticorpo conjugado e o anticorpo conjugado com ouro (BIOEASY, 2008).



**Figura 7.** Resultados do teste de imunocromatografia. Cassete-teste com linha-teste formada, confirmando positividade para cinomose canina (a). Cassete-teste apenas com linha-controle formada, mostrando que o teste está funcionando, mas a amostra é negativa (b) (ARQUIVO PESSOAL).

Para testar a amostra, o cassete era removido da embalagem de alumínio, no momento do uso, e colocado sobre uma superfície plana, seca e limpa de uma bancada do laboratório à temperatura ambiente.

Quando a amostra analisada era o *swab* conjuntival, a solução (tampão diluente + amostra) do tubo era pipetada e quatro gotas instiladas, vagarosamente, ao orifício do cassete. Porém, quando a amostra a ser testada era o líquido, quatro gotas dessa amostra eram instiladas, vagarosamente, no orifício do cassete sem a utilização do tampão diluente. Para ambas as amostras, o resultado do teste era interpretado entre cinco a dez minutos.

## **5.5. Análise estatística**

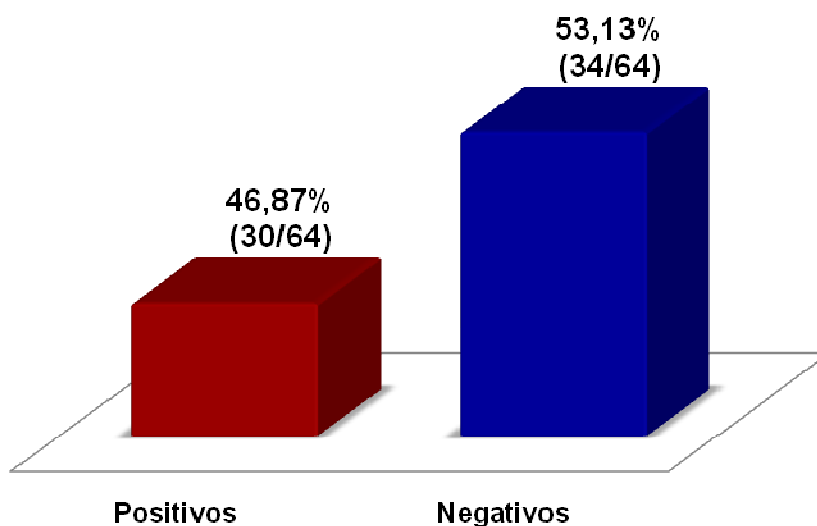
Para avaliar as diferenças entre as proporções de amostras positivas e negativas para o CDV, foi utilizado o estudo de dispersão das frequências – teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) – com nível de significância de 5% pelo do programa SPSS *for Windows* versão 11.0. Na comparação das características clínicas, hematológicas e sorológicas, utilizou-se o teste t de *Student* com nível de significância de 5%.



## 6. RESULTADOS

No período de 26 de março a 13 de novembro de 2008, foram analisados 64 cães que apresentaram sintomatologia clínica compatível com a cinomose canina.

Do total de animais testados no experimento, 46,87% (30/64) foram positivos para a enfermidade pela técnica de imunocromatografia (Gráfico 1).



**Gráfico 1.** Frequência entre positivos e negativos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

Os animais participantes do experimento foram divididos em três grupos, de acordo com os sinais clínicos apresentados: Grupo I – animais apenas com sinais sistêmicos; Grupo II – animais com sinais sistêmicos e neurológicos; Grupo III – animais com sinais apenas neurológicos (Tabela 1).

O diagnóstico imunocromatográfico para a cinomose canina foi realizado mediante o *swab* conjuntival em todos os grupos. No Grupo III e em três animais do Grupo II, realizou-se também o diagnóstico pela amostra de líquido.

**Tabela 1.** Resultados da imunocromatografia para a cinomose canina em secreção conjuntival e líquido de cães com diferentes sinais clínicos

Grupo	Sinais Clínicos	Amostras		Imunocromatografia	
		Swab Conjuntival	Líquor	Positivo	
				Swab	Líquor
I	Sistêmico	21	-	9/21	-
II	Sistêmico e Neurológico	36	3	11/36	3*/3
III	Neurológico	7	7	2/7	7/7

\* Os três animais positivos para líquido no grupo II foram negativos para swab conjuntival.

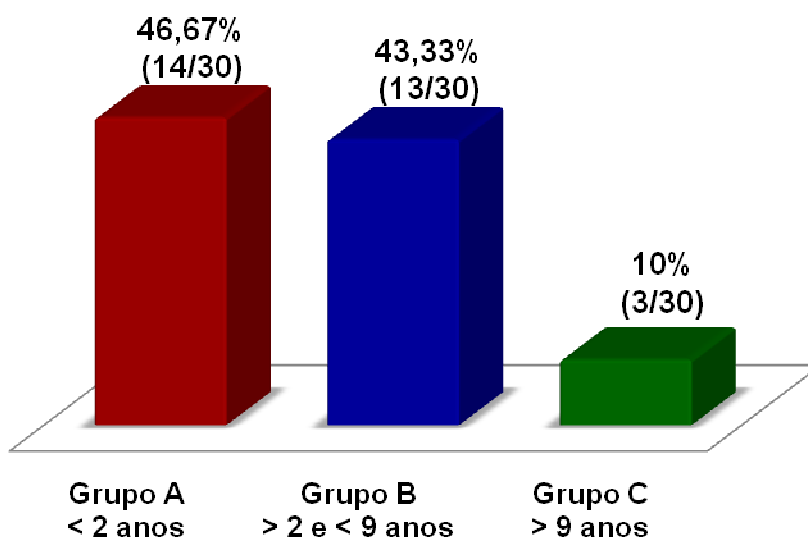
O teste em amostras de líquido foi realizado também em um grupo-controle de sete animais saudáveis. Todos os animais apresentaram-se negativos para a cinomose canina pelo ensaio imunocromatográfico.

## 6.1. Dados gerais

### 6.1.1. Idade

Os cães foram divididos em três grupos de idade: Grupo A, foram alocados cães com menos de dois anos de idade; Grupo B, cães de dois a menos de nove anos e Grupo C, cães acima de nove anos. Não houve efeito significativo da idade em relação ao resultado positivo para a cinomose canina ( $\chi^2 = 2,14$ ; 5%). As frequências dos grupos A (46,67%) e B (43,33%) foram muito próximas.

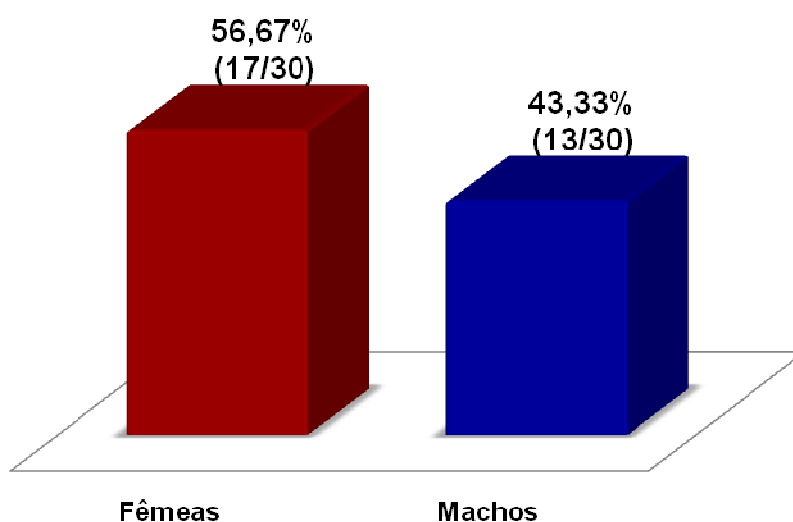
O grupo C (10%) apresentou-se em menor quantidade, entendendo-se que poucos animais idosos apresentaram características compatíveis com a doença (Gráfico 2).



**Gráfico 2.** Frequência das faixas etárias no grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

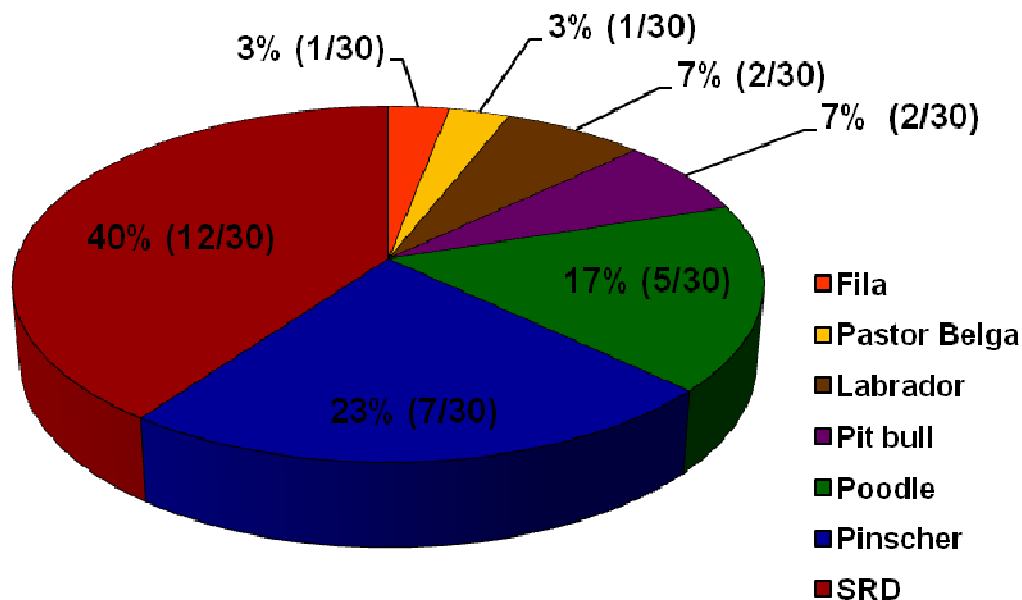
### 6.1.2. Sexo e raça

O fator sexo não apresentou efeito significativo em relação ao resultado positivo da cinomose canina ( $\chi^2 = 1,05$ ; 5%). No grupo dos positivos, a distribuição foi de 56,67% (17/30) para fêmeas e 43,33% (13/30) para machos (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Frequência entre fêmeas e machos dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

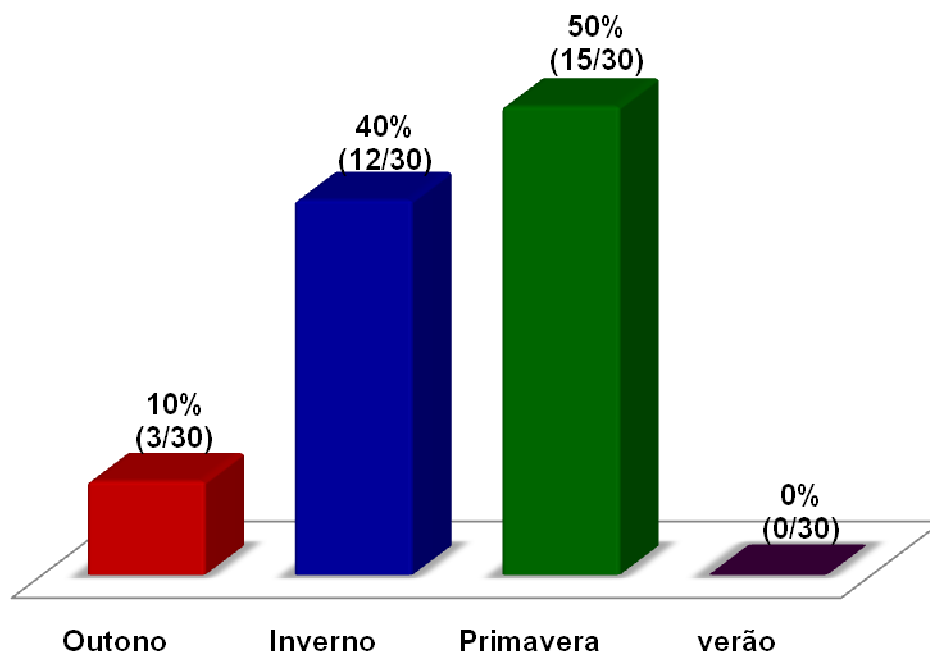
Também o fator raça não apresentou efeito significativo em relação ao resultado positivo da cinomose canina ( $\chi^2 = 1,36$ ; 5%) (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Frequência das raças dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

### 6.1.3. Sazonalidade da cinomose canina

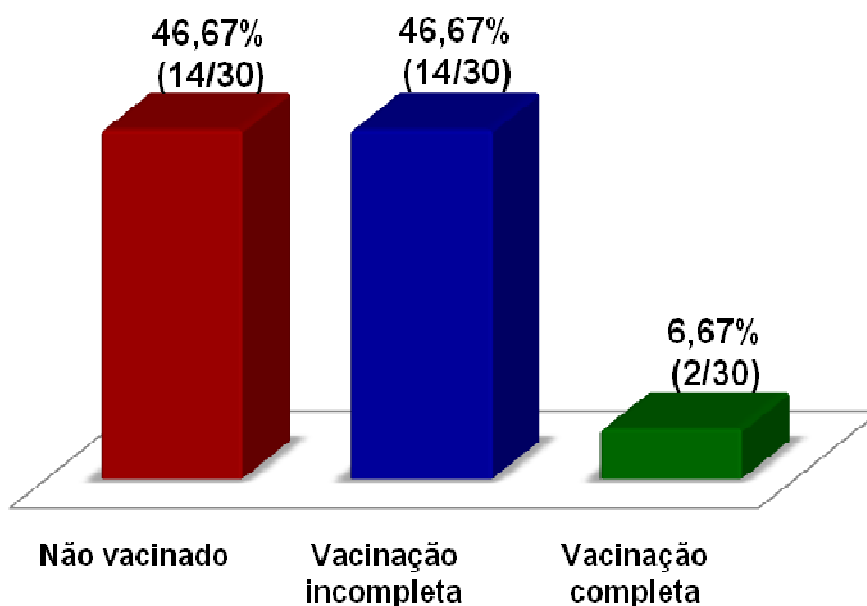
A estação do ano teve efeito significativo em relação à frequência de cinomose canina ( $\chi^2 = 9,79$ ; 5%). A maior frequência da doença foi associada à primavera ( $\chi^2 = 9,24$ ; 5%). As frequências de casos positivos pela imunocromatografia apresentadas foram: 10% no outono, 40% no inverno, 50% na primavera e nenhum animal no verão (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Frequência da cinomose canina em relação à estação do ano.

#### 6.1.4. Vacinação

A falha no esquema vacinal é um importante fator a ser observado na triagem clínica, tendo em vista que 96,67% dos animais positivos para a cinomose canina, no experimento, apresentaram falha no esquema vacinal (Gráfico 6). No entanto, o número de animais com esquema vacinal falho não foi estatisticamente diferente entre cães positivos e negativos ( $\chi^2 = 2,59$ ; 5%), o que demonstra que esta característica não é determinante para se diagnosticar a cinomose canina.



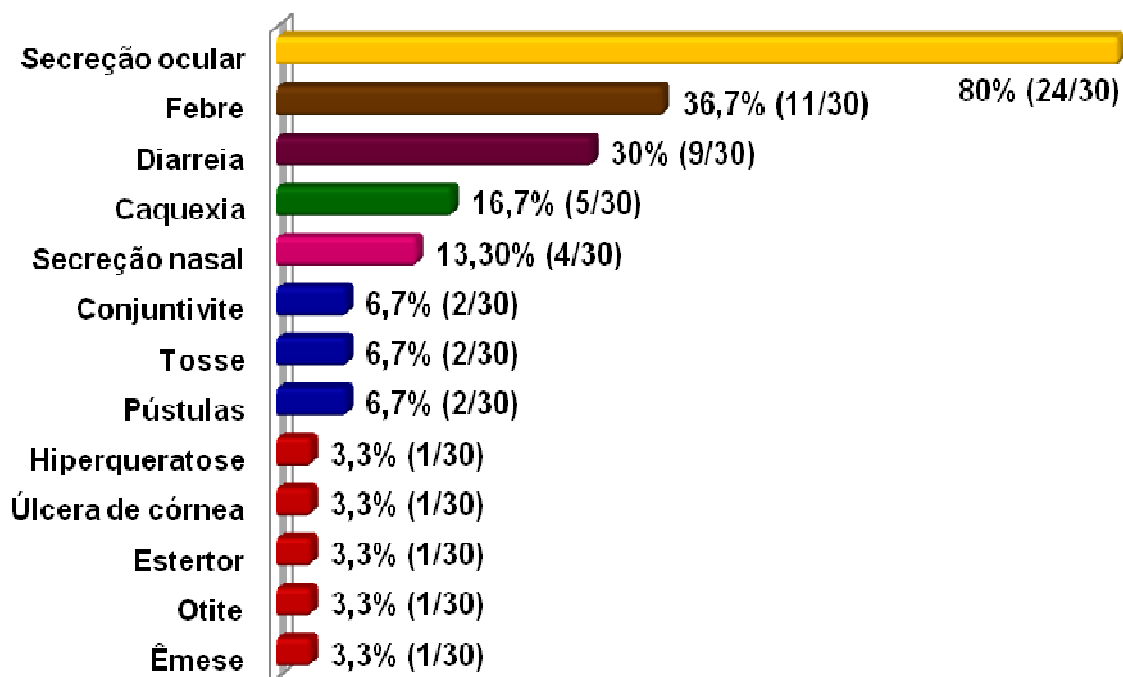
**Gráfico 6.** Distribuição do esquema de vacinação dentro do grupo dos positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

## 6.2. Alterações clínicas

Nenhum sinal clínico (sistêmico ou neurológico) apresentou diferença significativa entre os grupos dos animais positivos e negativos ( $\chi^2 = 2,02$ ; 5%).

### 6.2.1. Alterações sistêmicas

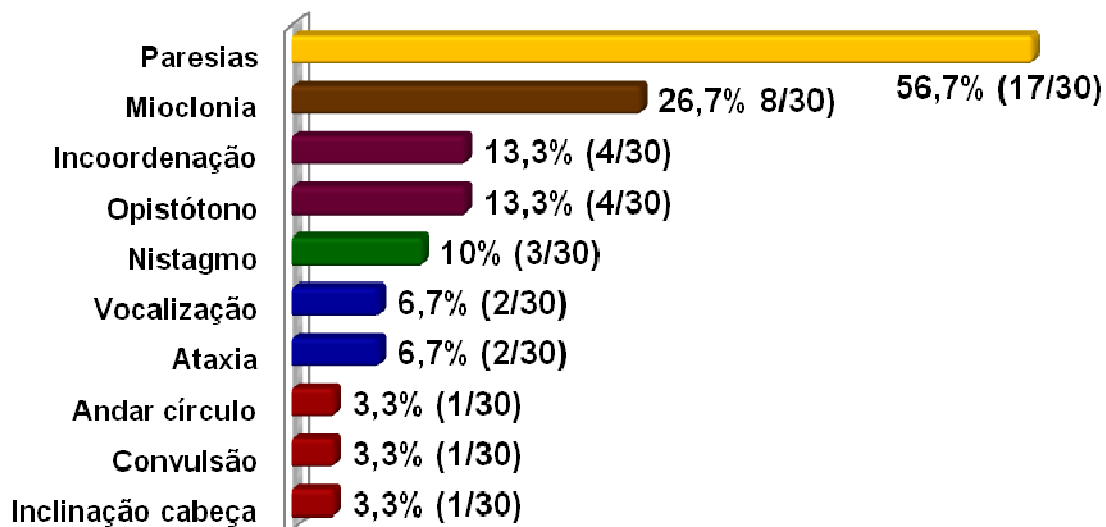
No grupo dos animais positivos pela imunocromatografia, os sinais sistêmicos com maior frequência foram: secreção ocular (80%), diarreia (30%), febre (36,7%), pústulas (6,7%), caquexia (16,7%), tosse (6,7%), conjuntivite (6,7%), êmese (3,3%), secreção nasal (13,3%), hiperqueratose de coxim e nasal (3,3%), úlcera de córnea (3,3%), estertor (3,3%) e otite (3,3%) (Gráfico 7).



**Gráfico 7.** Frequência de alterações sistêmicas presentes no grupo de animais positivos, pela técnica de imunocromatografia.

### 6.2.2. Alterações neurológicas

No grupo dos animais positivos pela imunocromatografia, as alterações neurológicas encontradas com maior frequência foram: paresias (56,7%), vocalização (6,7%), nistagmo (10%), incoordenação (13,3%), andar em círculo (3,3%), opistótono (13,3%), mioclonia (26,7%), ataxia (6,7%), convulsão (3,3%) e inclinação de cabeça (3,3%) (Gráfico 8).



**Gráfico 8.** Frequência de alterações neurológicas presentes no grupo de animais positivos, pela técnica de imunocromatografia.

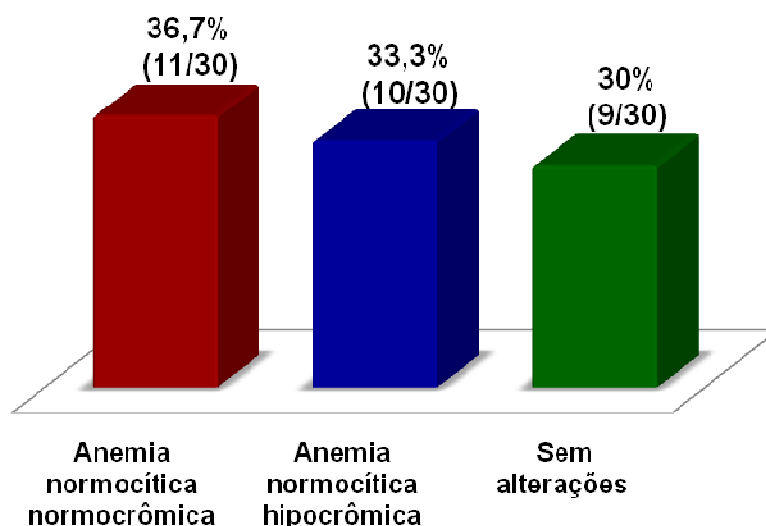
### 6.3. Alterações hematológicas

O hemograma apresentou características associadas à positividade para cinomose canina.

#### 6.3.1. Série vermelha

As alterações na série vermelha não foram significativas, comparando animais positivos e negativos ( $\chi^2 = 2,82$ ; 5%). Apresentaram anemia 70% dos animais positivos, quando os resultados foram confrontados com Lopes et al. (1996) e Meyer et al. (1999), sendo 36,7% normocítica normocrômica e 33,3% normocítica hipocrômica (Gráfico 9).



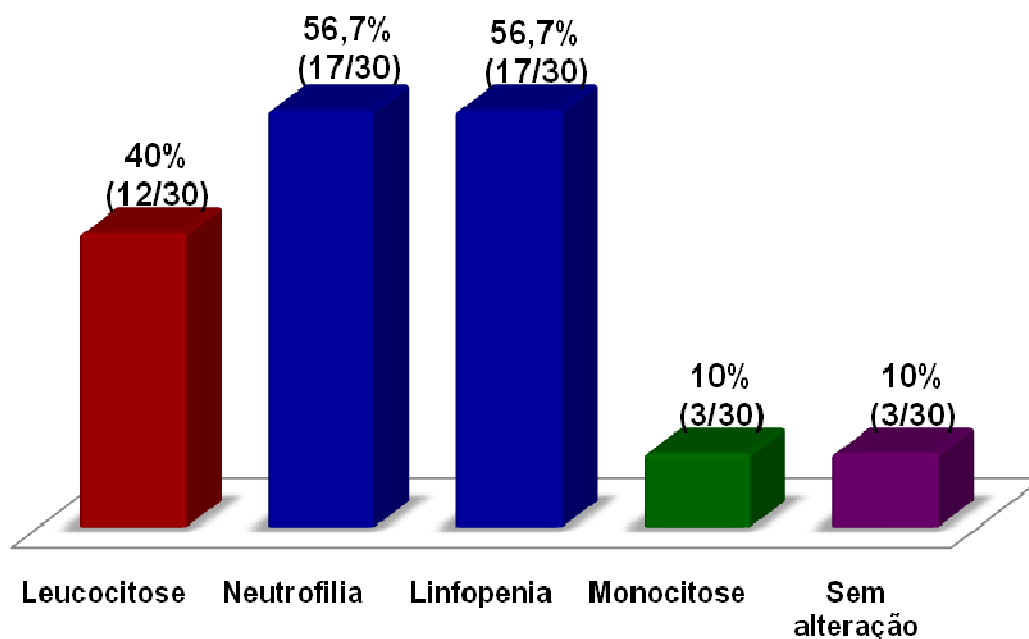


**Gráfico 9.** Alterações hematológicas, série vermelha, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

### 6.3.2. Série branca

As alterações na série branca podem ser associadas à positividade de cinomose canina ( $\chi^2 = 4,66$ ; 5%), mais especificamente o quadro de neutrofilia associado à linfocitopenia ( $\chi^2 = 4,17$ ; 5%), quando os resultados foram confrontados com Lopes et al. (1996) e Meyer et al. (1999).

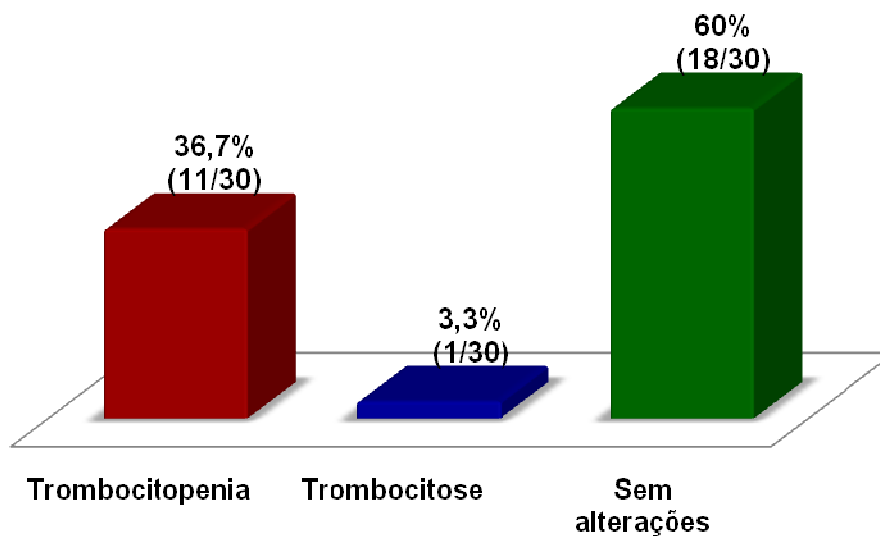
As principais frequências de alterações na série branca, entre os animais positivos, foram: leucocitose (40%), neutrofilia (56,7%), linfopenia (56,7%) e monocitose (10%) (Gráfico 10).



**Gráfico 10.** Alterações hematológicas, série branca, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia. Barras de mesma cor demonstram as características que se apresentaram estatisticamente associadas à positividade da cinomose canina ( $\chi^2 = 4,17$ ; 5%).

### 6.3.3. Plaquetas

As alterações das plaquetas não foram significativas, entre os animais positivos e negativos ( $\chi^2 = 2,01$ ; 5%). Elas se apresentaram nas seguintes frequências: trombocitopenia (36,7%), trombocitose (3,3%), quando os resultados foram confrontados com Lopes et al. (1996) e Meyer et al. (1999). Não apresentaram alterações dessa ordem 60% dos animais positivos para a cinomose canina (Gráfico 11).



**Gráfico 11.** Alterações hematológicas, plaquetas, presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

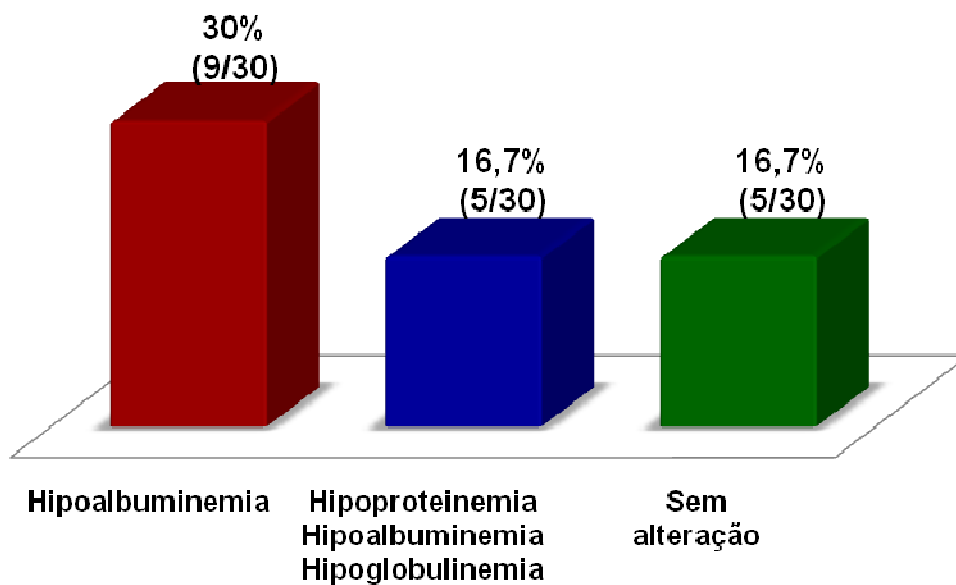
#### 6.3.4. Hemoparasitoses

A presença de hemocitozoários foi associada à positividade da cinomose canina ( $\chi^2 = 5,24$ ; 5%). Apresentaram infecção concomitante com hemoparasitoses 40% dos cães positivos para a cinomose canina. Destes, 75% de *Ehrlichia canis* e 25% para a ordem *Rickettsiales*, pela técnica de pesquisa de hemocitozoários em lâmina.

#### 6.4. Alterações bioquímicas

Comparando os animais positivos e negativos para a cinomose canina pela imunocromatografia, as alterações bioquímicas não puderam ser associadas à presença do vírus da cinomose canina ( $\chi^2 = 2,85$ ; 5%).

As frequências das principais alterações encontradas no grupo dos animais positivos foram: hipoalbuminemia (30%), sendo que em 16,7% associadas à baixa de proteína total com baixa de albumina e baixa de globulinas. Animais sem alterações na análise bioquímica se apresentaram em 16,7% (Gráfico 12), quando os resultados foram confrontados com Lopes et al. (1996) e Meyer et al. (1999).



**Gráfico 12.** Alterações bioquímicas presentes no grupo de animais positivos, para a cinomose canina, pela imunocromatografia.

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1.

### 7.2. Dados gerais

Headley e Graça (2000) obtiveram, 62,8% de cães positivos com até 1,5 anos de idade. Sonne et al. (2009), pela técnica da imunohistoquímica, obtiveram 78,5% dos cães positivos entre 2 a 6 meses de idade e 11,8% entre 7 meses a 1 ano, ou seja, 89,6% dos animais positivos tinham até 1 ano de idade.

O resultado encontrado por eles é semelhante às afirmações de outros autores, nas quais recém-nascidos, recém-desmamados, ou cães jovens são mais infectados por CDV, o que estabelece uma relação entre idade e susceptibilidade (EK-KOMMONEN et al., 1997; GOUVEIA et al., 1987; KRAKOWKA e KOESTNER, 1976; SWANGO, 1997).

A susceptibilidade dos neonatos ou cães jovens para o CDV está diretamente relacionada ao início da redução gradual dos anticorpos maternos, logo após o nascimento, que é proporcional à idade desses animais (BAUMANN, 2004; SHERDING, 2003; SWANGO, 1997).

Silva et al. (2007), num levantamento de aspectos clínico-patológicos em 620 casos de cinomose canina, não acharam predominância quanto à faixa etária. Obtiveram 51,4% de filhotes, 46,2% de adultos e 2,4% de idosos. Tais achados são mais próximos dos encontrados no presente experimento.

Um levantamento epidemiológico da cinomose canina realizado em Maringá, PR, a partir de dados de clínicas veterinárias, não demonstrou predominância sexual e racial (BORBA et al., 2002). Sonne et al. (2009) também obtiveram valores muito próximos entre machos e fêmeas, 59,26% e 40,74%, respectivamente.

Headley e Graça (2000) realizaram um levantamento epidemiológico de 250 casos de cinomose canina em Santa Maria, RS e região. Neste estudo, os autores afirmam que o sexo do animal não influencia a predisposição à infecção por CDV. Porém, Headley e Graça (2000), no mesmo estudo, obtiveram valores significativos para raça, afirmando que cães SRD são mais susceptíveis à infecção por CDV que os cães de raça definida.

Os indícios de que cães SRD são mais afetados pela cinomose canina baseiam-se em: apresentarem títulos mais baixos de anticorpos neutralizantes para o CDV; não serem cães bem cuidados; apresentarem maior chance de entrar em contato com partículas virais provenientes de outros cães doentes (BORBA et al., 2002; HEADLEY e GRAÇA, 2000; PATRONEK et al., 1995).

Embora uma prevalência sazonal de infecção por CDV ainda não esteja muito bem definida, estudos epidemiológicos têm demonstrado que as infecções são mais frequentes durante o período mais frio (HEADLEY e GRAÇA, 2000). Borba et al. (2002) obtiveram maior número de casos no mês de agosto e setembro, ou seja, entre inverno e primavera. Headley e Graça (2000) também obtiveram maior número de casos durante estas duas estações.

As estações mais frias do ano favorecem a manutenção da estabilidade das partículas virais e têm sido relacionadas à imunossupressões, principalmente em caninos recém-nascidos, recém-desmamados e não adequadamente vacinados (ALEX e DHANAPALAN, 1994; SWANGO, 1997).

Amaral (2007), em seu estudo de detecção do CDV pela técnica de RT-PCR em cães com sintomatologia neurológica, obteve 80% dos animais com falha no esquema vacinal.

Gouveia et al. (1987) observaram que 67,4% dos cães necropsiados com diagnóstico de cinomose canina não haviam sido vacinados. Tudury et al. (1997) consideram a falta de vacinação um fator predisponente para a frequência da doença, pois afirmam que apenas 18,5% dos cães no Brasil haviam sido submetidos a um programa correto de vacinação.

Monti et al. (2007), ao avaliar os anticorpos para o CDV em cães vacinados, em diferentes estabelecimentos, concluíram que a vacinação é importante, pois houve diferença nos títulos de anticorpos entre animais vacinados e não vacinados, mas afirmam que a vacinação deve ser realizada seguindo o protocolo indicado na literatura.

Um único cão positivo, no presente experimento, havia recebido vacinação completa. Contudo, deve-se sempre levar em consideração: o protocolo vacinal e a qualidade das vacinas comercializadas (MONTI et al., 2007).

A vacinação dos animais foi um dos pontos mais alarmantes do experimento. Quase 86% de todos os animais do experimento apresentavam falha

no esquema vacinal. Durante a anamnese, observou-se que os proprietários são desinformados quanto ao programa de vacinação recomendado para os cães, inclusive muitos acreditavam que apenas a vacina anti-rábica fosse o suficiente.

Desde 1987, Gouveia et al. já afirmavam que o percentual de animais vacinados contra a cinomose canina no Brasil era baixo. Vinte e dois anos se passaram e esta estatística continua tão alta quanto naquela época, quando se tinha muito menos informação e conhecimento.

### **7.3. Alterações clínicas**

Sonne et al. (2009), em seu trabalho, relataram como principais achados sistêmicos: secreção ocular (50%), secreção nasal (35,2%), hiperqueratose dos coxins digitais (35,2%) e pústulas abdominais (22,25%). Amaral (2007) encontrou como principais achados sistêmicos: secreção ocular (66%), secreção nasal (38%), êmese (22%), diarreia (22%), estertor (18%), tosse (14%), melena (10%) e dispneia (4%).

Vandavelde e Cachin (1993) observaram sintomatologias gastrintestinais, respiratórios e oculares em 50% dos casos, e Tipold et al. (1992), em 66,7% dos animais.

Greene e Appel (2006) afirmaram que mais de 50% das infecções por CDV são subclínicas ou com sinais clínicos moderados, como apatia, diminuição do apetite, febre, desidratação, secreção oculonasal serosa a mucopurulenta, tosse, estertores pulmonares, vômito e diarreia que podem ser as primeiras alterações observadas nos cães infectados. Desta forma, as alterações sistêmicas encontradas no presente experimento estão de acordo com os sinais relatados pelos autores supracitados.

Amaral (2007) obteve como principais alterações neurológicas: paresias (74%), mioclonia (54%), vocalização (32%). Silva et al. (2006) observaram: paresias (13,4%), mioclonia (38,4%), incoordenação motora (25%) e convulsão (18,5%). Tudury et al. (1997) relataram em seu experimento: paresias (69,12%), mioclonias (75,30%), nistagmo (13,58%) e convulsão (16,04%).

A variação na frequência dos diferentes sintomas neurológicos pode estar relacionada tanto à forma de seleção de animais no estudo quanto ao tempo de evolução da doença, à cepa viral envolvida, à idade e à imunocompetência do hospedeiro (AMARAL, 2007).

#### **7.4. Alterações laboratoriais**

Lopes Júnior (2006), em seu experimento que avaliou o perfil hematológico de cães com cinomose canina, não observou alterações significativas, tendo frequências próximas de leucocitose (27%) e leucopenia (13%). Silva et al. (2005), num estudo parecido, observou resultados próximos ao do autor acima. Porém, Gebara et al. (2004a) encontraram leucocitose como a principal alteração hematológica (66,67%).

Infecções bacterianas oportunistas no sistema gastrintestinal e respiratório podem ser observadas frequentemente em cães com cinomose canina, o que justificaria a leucocitose por neutrofilia (Silva et al., 2005).

Silva et al. (2005) obtiveram linfopenia em 85% dos animais positivos para a cinomose canina. Lopes Júnior (2006) afirmou que a linfopenia foi o achado mais frequente e relevante (65%).

A linfopenia é uma característica consistente com a cinomose canina, pelo fato de os linfócitos serem as células envolvidas no mecanismo de defesa viral. Cães filhotes, infectados experimentalmente com vírus da cinomose canina, desenvolveram marcada linfopenia (FELDMAN, et al., 2000).

Lopes Júnior (2006) obteve a anemia normocítica normocrômica como principal alteração de série vermelha e Silva et al. (2005) encontraram 61% com anemia entre os animais positivos para a cinomose canina, sendo em sua maioria normocítica normocrômica

Relaciona-se a anemia ao aumento da destruição dos eritrócitos ou à diminuição de sua produção (JAIN, 1993). A destruição é determinada pela presença do vírus no eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana do eritrócito (MENDONÇA et al., 2000). Meyer et al. (1995) afirmaram que a queda na



produção pode ser atribuída à falência da medula, devido ao estresse desencadeado pela enfermidade.

Silva et al. (2005) afirmaram que a resposta hematológica varia de um indivíduo para outro, bem como a fase da infecção viral.

Silva et al. (2005) encontraram trombocitopenia em 69% dos cães positivos para a cinomose canina. Lopes Júnior (2006) obteve a mesma alteração, porém em 100% dos animais no início da enfermidade. Observações semelhantes foram observadas por Mendonça et al. (2000).

O mecanismo responsável pela trombocitopenia associada a infecções virais na veterinária ainda é pouco conhecido. Sabe-se, apenas, que para o gênero *Morbillivirus* já se observou aumento de anticorpos antiplaquetas (FELDMAN et al., 2000). A trombocitopenia é provavelmente do tipo imunomediada com remoção das plaquetas pelo sistema retículo endotelial (SILVA et al., 2005).

Até então, poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da associação da hemoparasitose com a cinomose canina. Faierstein et al. (2008) num levantamento de casos de erliquiose canina no município de Aracaju, SE, obtiveram 119 casos de positividade. Destes, 5% (16/119) tiveram infecções concomitantes, entre elas a cinomose canina.

A erliquiose é uma doença com alta incidência em cães da cidade de Campos dos Goytacazes (13,89%) (ALBERNAZ et al., 2007). É possível que essa enfermidade cause uma baixa de imunidade no cão, que o deixa mais propenso à infecção pelo vírus da cinomose canina, ou o contrário, a cinomose canina contribua para uma imunodepressão que facilite a infecção pela *Ehrlichia canis*.

Silva et al. (2005) afirmaram que 100% dos cães de seus experimento apresentaram hipoalbuminemia. Diferentemente de Lopes Júnior (2006) que obteve apenas em 38% dos animais.

A hipoalbuminemia é esperada, já que as lesões no epitélio intestinal, causadas pelas viroses, com conseqüente diarreia, além da própria apatia determinada pela doença, levam o animal a recusar o alimento. Dessa forma, a diminuição da ingestão protéica, bem como o comprometimento intestinal, são fatores determinantes na redução dos níveis séricos da albumina na cinomose canina (KANEKO et al., 1997).

Pelo caráter imunossupressor da cinomose canina, é esperado que as globulinas se encontrem abaixo do valor normal, sendo a fração gama responsável por tal fenômeno (SILVA et al., 2005).

Como as proteínas totais são compostas por dois grandes grupos, a fração albumina e a fração globulina, no presente experimento, as albuminas e globulinas apresentaram valores baixos. Dessa forma, as proteínas totais, conseqüentemente encontraram-se abaixo do valor considerado como normal.

### 7.5. Diagnóstico clínico x imunocromatográfico

Os diferentes resultados de positividade entre o diagnóstico clínico e o imunocromatográfico corroboram as afirmações de Shin et al. (2004), que a apresentação clínica da cinomose canina é variável, o que pode dificultar o diagnóstico clínico da doença.

Kim et al. (2006) afirmaram que, em vários casos, a combinação dos principais sinais clínicos, inflamação conjuntival, secreção respiratória, diarreia, doença com três semanas ou mais e sinais nervosos, apenas sugerem um diagnóstico presuntivo da cinomose canina. Assim, Bellinni (1995) considerou que a confirmação da cinomose canina só deve ser definida após o diagnóstico laboratorial, seja ele virológico, sorológico, histopatológico ou molecular.

O ensaio imunocromatográfico apresentou-se eficiente no experimento realizado por An et al. (2008), quando compararam a técnica de *nested* PCR com a imunocromatografia, para amostras de *swab* conjuntival, fluido nasal e linfócito sanguíneo. Seus resultados demonstraram que a técnica de imunocromatografia é tão, ou mais, sensível e específica que o *nested* PCR. E ainda que, entre as diferentes amostras biológicas testadas, o *swab* conjuntival foi a melhor amostra para o diagnóstico em ambas as técnicas. Porém, An et al. (2008) não relatam em que fase clínica da doença os animais do experimento se encontravam.

Em todos os cães do presente experimento, foi realizado o diagnóstico imunocromatográfico por meio do *swab* conjuntival. Porém, em sete animais que apresentavam apenas sinais neurológicos, além do *swab* conjuntival, também foi testado o líquido.

Particularmente nas formas de evolução subaguda ou crônica, e na ausência de sinais clínicos sistêmicos, o CDV pode não estar presente em órgãos, tecidos, secreções e excreções de maneira uniforme. Nessas situações, a utilização de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico pode ser responsável pela frequência de resultados falso-negativos (AMUDE et al., 2006; FRISK et al., 1999; SAITO et al., 2006b).

Pelos resultados apresentados neste experimento, provavelmente, quando o animal apresenta apenas sinais neurológicos, o líquido é a melhor amostra a ser analisada quando comparada com a do *swab* conjuntival no ensaio imunocromatográfico.

Assim, prováveis resultados falso-negativos não podem ser excluídos, pois não foram utilizadas outras técnicas para avaliar a presença ou a ausência de CDV, uma vez que o objetivo principal deste trabalho era realizar o diagnóstico *ante-mortem* da cinomose canina pelo ensaio imunocromatográfico por meio do *swab* conjuntival. Outras doenças infectoparasitárias, que determinam sinais clínicos semelhantes aos utilizados para a inclusão e distribuição dos cães no experimento também não foram investigadas.

## 8. CONCLUSÃO

Entre março a novembro de 2008, 64 cães foram diagnosticados clinicamente como positivos para a cinomose canina, porém, pela imunocromatografia foram confirmados apenas 30 cães (46,87%).

A idade, o sexo e a raça não apresentaram efeito significativo em relação à positividade da cinomose canina, pela imunocromatografia.

A primavera foi a estação do ano associada à positividade da cinomose canina.

Entre os cães positivos para a cinomose canina, 96,67% apresentaram falha no esquema vacinal, porém essa característica não foi significativa entre cães positivos e negativos.

O diagnóstico clínico baseado nos sinais sistêmico ou neurológico apresenta grande possibilidade de ocorrer falso-positivo.

O hemograma apresentou características associadas à positividade da cinomose canina, especificamente o quadro de neutrofilia (56,7%) associado a linfopenia (56,7%).

Apresentaram infecção associada a hemoparasitose, especialmente a *Ehrlichia canis*, 40% dos animais positivos.

As alterações bioquímicas não foram correlacionadas com a cinomose canina.

A possibilidade da realização do diagnóstico laboratorial *ante-mortem* da cinomose canina é de fundamental importância para os clínicos, porém as diferentes formas de apresentação clínica e de evolução da cinomose canina podem dificultar a eleição de apenas um tipo de material biológico.

Pelos resultados apresentados neste experimento, provavelmente quando o animal apresenta apenas sinais neurológicos, o líquido é a melhor amostra a ser analisada quando comparada com a do *swab* conjuntival no ensaio imunocromatográfico.

## 9. RECOMENDAÇÕES

A otimização de métodos de diagnóstico que possibilitem a realização do diagnóstico laboratorial, conclusivo, *ante-mortem* da cinomose canina, como o ensaio imunocromatográfico é de grande importância e valia clínica.

Além disso, este trabalho demonstrou que o tipo de amostra clínica submetida à análise pode ter grande impacto no resultado do diagnóstico e aumentar significativamente a sensibilidade da técnica utilizada.

Logo, a investigação da melhor amostra biológica para o diagnóstico laboratorial da cinomose canina, de acordo com a fase clínica apresentada pelo cão, faz-se necessária de fato.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNAZ, A.P.; MIRANDA, F.J.B; MELO JR., O.A. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALEX, P.C.; DHANAPALAN, P. Distemper encephalitis in dog: incidence, symptomatology and electroencephalographic findings. **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 25, p. 127-131, 1994.

ALLDINGER, S.; FONFARA, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. **Acta Neuropathologica**, v. 99, p. 138-146, 2000.

AMARAL, H.A. **Detecção do Vírus da Cinomose pela Técnica de RT-PCR em Cães com Sintomatologia Neurológica**. 2007. 72f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

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

AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v.82, p. 416-422, 2007.

AN, D.J.; KIM, T.Y.; SONG, D.S.; et al. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 244-249, 2008.

APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal Veterinary Research**, v. 30, p. 1167-1182, 1969.

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

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-191, 1995.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine Distemper: Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases, 1999. **International Veterinary Information Service (IVIS)**. Disponível em: <[www.ivis.org](http://www.ivis.org)> Acesso em: 10/10/2008.

BARRET, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbilliviruses in carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 3-13, 1999.

BATISTA, V.S.; MOURA, M.A.; REIS, R.R.R.; et al. Ocorrência de corpúsculo de Sinegaglia-Lentz em esfregaços sangüíneos de 70 cães com suspeita clínica de cinomose. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 115, 2000.

BAUMANN, G. Ortomixovírus e Paramixovírus. In: BEER, J. **Doenças Infeciosas em Animais Domésticos**. São Paulo: Roca, 2004. cap. 9, p.120-166.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M.K.; CORRÊA, A.R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.

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

BORBA, T.R.; MANNIGEL, R.C.; FRAPORTI, C.K.; et al. Cinomose: dados epidemiológicos Maringá-PR (1998-2001). **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 4, p. 53-56, 2002.

BLIXENKRONE-MOLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; et al. Studies of manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v. 37, p. 163-173, 1993.

BREITSCHWERDT, E.B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 67, p. 543-553.

BRITO, A.F.; DE SOUZA, L.C.; DA SILVA, A. V.; LANGONI, H. Epidemiological and serological aspects in canine toxoplasmosis in animals with nervous symptoms. **Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 31-35, 2002.

BROWN, D.D.; COLLINS, F.M.; DUPREX, W.P.; et al. “Rescue” of mini-genomic constructs and viruses combinations of morbilliviruses N, P and L proteins. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1077-1081, 2005.

BRUNNER, J.; PLATTET, P.; MAJCHERCZYK, P.; et al. Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induces increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 1184-1195, 2007.

BURROWS, M.J. Afecções do Intestino Delgado. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 104, p. 1618-1705.

CASTELLANO, M.C. Moquillo canino: Algo nuevo, algo viejo. **Veterinaria Argentina**, v. 10, p. 39-41, 1993.

CHALKER, V.J.; OWEN, W.M.A.; PATERSON, C.; et al. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. **Microbiology**, v. 150, p. 3491-3497, 2004.



CHVALA, S.; BENETKA, V.; MÖSTL K.; et al. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2 and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 508-512, 2007.

CIRONE, F.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; et al. Immunogenicity of an inactivated oil-emulsion canine distemper vaccine in African wild dogs. **Journal of Wildlife Disease**, v. 40, p. 343- 346, 2004.

DAMIÁN, M.; MORALES E.; SALAS, G.; TRIGOF, J. Immunohistochemical detection of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 289- 293, 2005.

D'INTINO, G.; VACCARI, F.; SIVILIA, S.; et al. A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. **Brain Research**, v. 1098, p. 186- 195, 2006.

DYER, N.W.; SCHAMBER, G.J. Pneumocystosis associated with canine distemper virus infection in a mink. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 40, p. 577-578, 1999.

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

ELIA, G.; BELLOLI, C.; CIRONE, F.; et al. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. **Antiviral Research**, 2007. Disponível em: <[www.sciencedirect.com.html](http://www.sciencedirect.com.html)>. Acesso em: 15/01/2008.

ERLES, K.; DUBOVI, E.J.; BROOKS, H.W.; BROWNLIE, J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4524-4529, 2004.

FAIERSTEIN, C.C.; SILVA, E.P.; FEBRÔNIO, A.M.B. Notas sobre a erliquiose canina no município de Aracajú, Sergipe (2006-2007). **Biologia Geral e Experimental**, v. 8, n. 2, p. 5-7, 2008.

FEITOSA, M.M.; FEITOSA, F.L.F.; KOHAYAGAWA, A.; et al. Avaliação física, citológica, de proteínas e determinação qualitativa de globulinas do líquido de cães normais e com encefalites por cinomose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, p. 147-151, 1997.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000. p. 787.

FENNER, W.R. Moléstia do cérebro In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 82, p. 819-889.

FERNANDES, T.R.P.; CAMARGO, J.B.; RIBEIRO, M.C.M.; 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.

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.

FRIESS, M.; ENGELHARD, P.; DOBBELAERE, D.; et al. Reduced nuclear translocation of nuclear factor (NF) – kappa B p65 in footpad epidermis of dogs infected with distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, p 82-89, 2005.

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

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; ALFIERE, A.A. 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, p. 168-174, 2004a.

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; et al. Detecção do gene da nucleoproteína da cinomose canina por RT – PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 480-487, 2004b.

GELBERG, H.B. Alimentary System. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Diseases**. 4 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 301-391

GORHAM, J.R. The epizootiology of distemper. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.149, p.410-22, 1966.

GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L. Cinomose Canina: Ocorrência em Animais Vacinados e Distribuição por Faixa Etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, 539-545, 1987.

GREENE, C.E; APPEL, M.J. Canine Distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and the Cat**. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 2006. cap. 16, p. 226-239.

GRÖNE, A.; ENGELHARDT, P.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 574-578, 2003.

GRÖNE, A.; DOHERR, M.G.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. **Veterinary Dermatology**, v. 15, p. 59-167, 2004.

GUO, A.; LU, C. canine distemper virus causes apoptosis of VERO cells. **Journal Veterinary Medicine B**, v. 47, p. 183-190, 2000.

HARDER, T.C.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 120-124, 1997.

HAWKINS, E.C. Afecções do Sistema Respiratório Inferior. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do Cão e do Gato**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 89, p. 1080-1142.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 136-140, 2000.

HEADLEY, S.A.; SAITO, T.B. Simultaneous canine distemper encephalitis and canine parvovirus infection with distemper-associated cardiac necrosis in a pup. **Ciência Rural**, v. 33, p. 1149-1151, 2003.

HEADLEY, S.A.; SOARES, I.C.; GRAÇA, D.L. Glial fibrillary acidic protein (GFPA) – immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v.125, p. 90-97, 2001.

HIRSH, D.C.; CHUNGZEE, Y. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 464.

ICTV: International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy 2009**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>>. Acesso em: 01 mar. 2009.

IKEDA, Y.; NAKAMURA, K.; MIYAZAWA, T.; et al. Seroprevalence of canine distemper virus in cats. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 641-644, 2001.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. Moléstias causadas por agentes virais In: \_\_\_\_ **Patologia Veterinária**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2000. cap. 8, p. 320-323.

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

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. California: Academic, 1997.

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

KIM, D.; JEOUNG, S.Y. ; AHN, S.J.; et al. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n. 8, p. 877-879, 2006.

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

KOUTINAS, A.F.; BAUMGÄRTNER, W.; TONTIS, D.; et al. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus - induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 2-9, 2004.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. A age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 134, n. 6, p. 629-632, 1976)

KRUININGEN, H.J. Sistema Gastrointestinal In: CARLTON, W.W.; McGAVIN, M.D. **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. cap. 1, p. 26-28.

KUMAGAI, K.; YAMAGUCHI, R.; USHIDA, K. TATEYAMA, S. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, p. 175-181, 2004.

LAMB R.A.; PARKS G.D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. cap. 41, p. 1449-1485.

LATHA, D.; GEETHA, M.; RAMADASS, P.; NARAYANAN, R.B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 119, p. 278-286, 2007.

LEDNICKY, J.A.; MEEHAN, T.P.; KINSEL, M.J.; 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 section of the fusion and phospho protein genes. **Journal of Virology Methods**, v. 118, p. 147-157, 2004.

LIANG, C.T.; CHUEH, L.L.; PANG, V.F.; et al. A non-biotin polymerized horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 57-64, 2007.

LOPES JÚNIOR, C.G. **Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e eletroforese das proteínas séricas de cães com cinomose atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco**. 2006. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

LOPES, S.; BIONDO, A.; CUNHA, C. FAN, L. **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria, 1996. P. 166.

LÓPEZ, A. Respiratory System. In: MCGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4 ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 463-542.

LYLES, D.S.; RUPPRECH, C.E. *Rhabdoviridae*: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. cap. 39, p. 1364-1395.

MAIA, O.B.; GOUVEIA, A.M.G.; SOUZA, A.M.; BARBOSA, E.F. Avaliação pós-vacinal de lobos guarás *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) contra os vírus da cinomose e da parvovirose caninas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p. 415-420, 1999.

MAIA, O.B., GOUVEIA, A.M.G. Serologic response of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* to canine distemper virus and canine parvovirus vaccination. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.32, p.78-80, 2001.

MASUDA, M.; SATO, H.; KAMATA, H.; et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, p. 157-165, 2006.

MENDONÇA, R.B.; PAGANI, F.F.; MOREIRA DE SOUZA, A.; et al. Respostas hematológicas em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose: estudo retrospectivo de casos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, p. 114, 2000.

MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; et al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, p. 6418-6427, 2001.

MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinário: interpretação e diagnóstico**. 2 ed. São Paulo: Roca, 1999. p. 78.

MONTI, F.S.; VIANA, J.A.; BEVILACQUA, P.D.; et al. Anticorpos contra o vírus da cinomose de cães vacinados em diferentes estabelecimentos. **Revista Ceres**, v. 54, p. 14-19, 2007.

MORETTI, L.D.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; et al. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and Ehrlichiosis Rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 359-363, 2006.

MORO, L.; ALVES, C.M.; SANTOS, F.G.A.; et al. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). **Bioscience Journal**, v. 20, n. 2, p. 171-178, 2004.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Doenças Virais Polissistêmicas. In: \_\_\_\_ **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap. 102, p. 1012-1021.

NISHI, T.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; TOGASHI, K.; et al. Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus. **Comparative Immunology, Microbiology e Infectious Diseases**, v. 27, p. 445-455, 2004.



NOON, K.F.; ROGUL, M.; BINN, L.N.; et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 605-609, 1980.

OKITA, M.; YANAI, T.; OCHIKUBO, F.; et al. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. **Journal of Comparative Pathology**, v.116, p.403-408, 1997.

PANDHER, K.; PODELL, B.; GOULD, D.H.; et al. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.201-204, 2006.

PATRONEK, G.J.; GLICKMAN, L.T.; JOHNSON, R.; EMERICK, T.J. Canine distemper infection in pet dogs: II. A case-control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. **Journal of American Animal Hospital Association**, v.31, p.230-235, 1995.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; et al. *Paramyxoviridae*. In: \_\_\_\_\_ **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 65, p. 372-379.

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Canine distemper virus neutralising antibodies in vaccinated dogs. **Veterinary Record**, v. 147, p. 598-603, 2000.

RIKULA, U.; PÄNKÄLÄ, L.; SIHVONEN, L. Distemper vaccination of farmed fur animals in Finlandia. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 49, p. 125-133, 2001.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R.; et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com.html>>. Acesso em: 29/05/2008.

SAITO, T.B.; MASUDA, M.; MIURA, R.; et al. *Morbillivirus* nucleoprotein possesses a novel nuclear localization signal and a CRM1-independent nuclear export signal. **Virology**, v. 352, p. 121-130, 2006a.

SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; NEGRÃO, F.J.; et al. Optimization and evaluation of the RT-PCR assay for *ante* and *post mortem* detection of canine distemper virus infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, p. 63-72, 2006b.

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

SARMENTO, L.V.C.; TUDURY, E.A.; ALBUQUERQUE, E.R.; MAGALHÃES, P.K.L. Coleta, análise e interpretação do líquido cefalorraquidiano de cães e gatos – revisão. **Clínica Veterinária**, ano IV, n. 25, p. 19-26, 2000.

SCHOBESBERGER, M.; SUMMERFIELD, A.; DOHERR, M.G.; et al. Canine distemper virus - induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 33-44, 2005.

SEEHUSEN, F.; ORLANDO, E.A.; WEWETZER, K.; BAUMGÄRTNER, W. Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelination lesion? **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 597-608, 2007.

SHELL, G. Canine distemper. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 02, p. 173-179, 1990.

SHERDING, R.G. Cinomose. In: SHERDING, R.G.; BIRCHARD, S.J. **Manual Saunders Clínica de Pequenos Animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. cap. 6, p. 117-120.

SHIN, Y.J.; CHO, K.O.; CHO, H.S.; et al. Comparison of one-step RT-PCR and nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 1-2, p. 83-86, 2004.

SILVA, I.N.G.; GUEDES, M.I.F.; ROCHA, M.F.G.; et al. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.

SILVA, M.C.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; et al. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 215-220, 2007.

SIXT, N.; CARDOSO, C.; VALLIER, A.; et al. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8472-8476, 1998.

SOMA, T.; ISHII, H.; HARA, N.; et al. Detection of canine distemper virus antigen in canine serum and its application to diagnosis. **Veterinary Record**, v. 153, p. 499-50, 2003.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; et al. Achados patológicos e Imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 143-149, 2009.

STEIN, V.M.; CZUB, M.; SCHREINER, N.; et al. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. **Journal of Neuroimmunology**, v.153, p. 122-131, 2004.

STEIN, V.M.; BAUMGÄRTNER, W.; KREIENBROCK, L.; et al. Canine microglial cells: stereotypy in immunophenotype and specificity in function? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 113, p. 277-287, 2006.

STERN, L.B.; GREENBERG, M.; GERSHONI, J.M.; RONZENBLATT, S. The hemagglutinin envelope protein of Canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. **Journal of Virology**, v. 69, p. 1661-1668, 1995.

SUMMERS, B.A.; CUMMING, J.F.; LAHUNTA, A. Inflammatory disease of the central nervous system. In: \_\_\_\_ **Veterinary Neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995. cap. 3, p. 95-188.

SWANGO, L.J. Moléstias virais caninas In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed. São Paulo: Manole, 1997. cap. 69, p. 573-588.

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

TIZARD, I.; NI, Y. Use of serologic testing to asses immune status of companion animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 1; p. 54-60, 1998.

TOVAR, L.E.R.; ROMERO, R.R.; NAVA, Y.V.; et al. Combined distemper adenoviral pneumonia in dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 632-634, 2007.

TUDURY, E.A.; ARIAS, M.V.B.; BRACARENSE, A.P.F.L.; et al. Observações clínicas e laboratoriais em cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 229-235, 1997.

TWARK, L.M.; DODDS, W.J. Thoughts on vaccination protocols. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 27, p. 1458-1459, 2000.

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

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelinatione in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathology**, v. 109, p. 56-58, 2005.

VON MESSLING, V.; HARDER, T.C.; RAUTENBERG, V.M.P.; et al. 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.

WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R.; et al. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 943-948, 2007.

WILCOCK, B.P. The eye and ear In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C. **Pathology of Domestic Animals**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 4, p. 468- 469.

ZEE, Y.C. *Paramyxoviridae*. In: \_\_\_\_ **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 374-378.

ZURBRIGGEN, A.; SCHMID, I.; GRABER, H.U.; VANDEVELDE, M. Oligodendroglial pathology in canine distemper. **Acta Neuropathologica**, v. 95, p. 71-77, 1998.

## 11. ANEXO A

## PRONTUÁRIO

Proprietário: \_\_\_\_\_ Tel.: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Paciente: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Peso: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

**ANAMNESE:****1) Ambiente de vivência:**

Outros animais? Não ( ) Sim ( )

Quantos? \_\_\_\_\_ Vacinados? \_\_\_\_\_

**2) Histórico de vacinação:**

Não ( ) Sim ( )

Quantas doses? \_\_\_\_\_ Com que idade? \_\_\_\_\_

**3) Alterações respiratórias, digestivas ou oculares na colheita:**

Secreção ocular [serosa ou purulenta] ( ) Secreção nasal [serosa ou purulenta] ( )

Tosse ( ) Êmese ( ) Diarreia ( ) Melena ( )

Hematoquesia ( ) Estertor ( ) Dispneia ( )

Outros: \_\_\_\_\_

## Prontuário (Continuação)

### 4) Outras alterações:

Hiperqueratose ( )                      Febre: \_\_\_\_\_                      Caquexia ( )

Pústulas abdominais ( )                      Otite ( )                      Miíase ( )

Outros: \_\_\_\_\_

### 5) Alterações neurológicas:

Mioclonia ( )                      Vocalização ( )                      Tetraparesia ( )

Paraparesia ( )                      Alteração no latido ( )                      Convulsão ( )

Nistagmo ( )                      Estrabismo ( )                      Hipermetria ( )

Cegueira ( )                      Andar compulsivo ( )                      Ataxia ( )

Midríase ( )                      Paralisia Facial ( )                      Claudicação ( )

Opistótono ( )                      Atrofia dos músculos mastigatórios ( )

Inclinação lateral da cabeça ( )

Outros: \_\_\_\_\_

### 6) Evolução do caso:

Óbito ( )    Eutanásia ( )

Recuperação total ( )    Recuperação parcial ( )

## RESULTADOS:

### 1) Ensaio imunocromatográfico (Kit rápido Ag CDV teste):

Positivo ( )    Negativo ( )

2) Alterações no hemograma: \_\_\_\_\_

3) Alterações na bioquímica: \_\_\_\_\_