

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença

As doenças infecciosas caninas desempenham papel importante na medicina veterinária. A CIC é reconhecida há pelo menos dois séculos, embora a etiologia viral tenha sido demonstrada primeiramente em 1905 por Carré et al. (Ott, 1966; Krakowka et al., 1985; Appel, 1987).

A CIC é uma doença contagiosa viral que afeta uma ampla variedade de carnívoros, incluindo membros da família Canidae (cão, coiote, lobo, chacal, raposa, dingo), Procionidae (quati, guaxinim, panda) e Mustelidae (furão, marta). Membros da família Felidae podem desenvolver uma infecção inaparente. Tem ampla distribuição mundial e se manifesta com sinais clínicos respiratórios, gastrointestinais e manifestações nervosas resultantes da replicação viral nos tecidos epiteliais, linfóides e nervosos (Krakowka et al., 1975; Shell, 1990).

O vírus é eliminado nas secreções e excreções de animais infectados podendo ser excretado até 60 a 90 dias após a infecção, embora períodos mais curtos de eliminação viral sejam mais típicos. A exposição de animais susceptíveis pode ser através do contato direto ou aerossol, e o período de incubação é geralmente de quatro a 10 dias. A doença afeta animais de todas as idades, sendo geralmente mais frequente em animais não vacinados, sorologicamente negativos ou que tem níveis de anticorpos maternos extremamente baixos. O contato com animais doentes ou subclínicos mantém o vírus na população, e o frequente nascimento de filhotes ajuda a manter uma população susceptível. A taxa de infecção é mais alta do que a taxa de doença clínica, refletindo um certo grau de imunidade natural, ou induzida por vacina na população de cães (Baker et al., 1959, Rude, 1987; Greene, 1990). Olson et al. (1988) registraram taxas de soroprevalência para a CIC na Suécia de aproximadamente 30% em cães não vacinados e 70% em cães adultos vacinados. A prevalência da CIC é maior entre três e seis meses de idade, correlacionando com o decréscimo de anticorpos passivos nos filhotes. A virulência da amostra é outro parâmetro que pode afetar a severidade, extensão, ou forma de doença clínica; certas amostras são mais neurotrópicas que outras, variando na habilidade de causar lesões

no SNC. A imunização ativa contra CIC constitui o meio mais efetivo de controle (Baker et al., 1959, Rude, 1987; Greene, 1990).

Em estudo realizado no Hospital Veterinário da UFMG no período de janeiro de 1981 a agosto de 1983, Gouveia et al. (1987) analisaram 3.193 fichas clínicas, das quais 193 apresentaram resultados clínico e/ou laboratorial positivos para CIC, indicando uma frequência de ocorrência de 6,1%. Foi encontrada baixa frequência da doença em cães com idade inferior a dois meses (2,6%) sugerindo participação da imunidade passiva natural já que existia uma vacinação sistemática dos cães contra CIC. Na faixa etária de 2,1 a 12 meses a frequência de casos foi de 61,1% coincidindo com a queda dos anticorpos maternos e consequentemente maior susceptibilidade dos filhotes à CIC. Após 12 meses de idade, foi observado um decréscimo na frequência da doença (31,5%), sendo que uma estratificação deste último grupo, provavelmente demonstraria diminuição progressiva do aparecimento da doença em função do aumento da idade. A frequência da CIC foi maior em cães não vacinados (67,4%) do que aqueles previamente vacinados com uma ou mais doses de vacinas (22,3%). Este alto percentual de animais previamente imunizados sugerem falhas de imunização decorrentes de baixos títulos virais, conservação inadequada das vacinas, uso de amostras pouco imunogênicas, doenças concorrentes, parasitoses, hipertermia, estado nutricional e interferência dos anticorpos maternos. Observações semelhantes foram feitas por Alves (1996) que encontrou uma prevalência da CIC de 5,25% e com Ribeiro (1988) que observou uma maior ocorrência da CIC em região que havia baixos níveis de vacinação.

2.2 Etiologia

O vírus da CIC pertence ao gênero Morbilivírus, família Paramixoviridae. É um vírus relativamente grande (100 a 300 nm de diâmetro), com genoma RNA de fita simples, envelope lipídico pleomórfico de origem da célula do hospedeiro, circundando o cerne. Por ser um vírus envelopado é sensível aos solventes lipídicos; agentes como calor e luz ultra violeta inativam o vírus. É estável à liofilização (Krakowka et al., 1985; Appel, 1987; Greene & Appel, 1990; Shell, 1990).

Em simpósio sobre imunização para CIC, Ott (1966) em retrospectiva com relação às origens das amostras vacinais, referenciou que Greene (1939) descobriu que inoculando sucessivamente o vírus da CIC em furões aumentava a virulência para estes e aparentemente reduzia a virulência para cães. Este trabalho deixou sua contribuição sobre o que

viria a ser a vacina viva ou atenuada para a proteção contra a CIC. Haig (1948) adicionalmente adaptou o vírus da CIC previamente adaptado em furão, em membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha produzindo a linhagem "Onderstepoort" utilizada como amostra vacinal. Cabasso & Cox (1949) confirmaram os resultados de Haig (1948), adaptando com sucesso o vírus de campo da CIC em ovo e introduzindo a linhagem Lederle. Belcher (1951) produziu outra adaptação conhecida como a linhagem Wisconsin FXNO. Dedie & Kloptke (1951) foram os primeiros a cultivar o vírus em cultura de tecido. Rockborn (1958) adaptou o vírus em cultura de células de rim de cão. Outros pesquisadores, usando técnicas de culturas de células obtiveram igual sucesso na propagação do vírus. O vírus adaptado em ovo foi adaptado em cultura de célula de embrião de galinha por Cabasso et al. (1960), e adaptado em células de rim de cão.

O vírus da CIC adaptado em cultura de célula ou avirulento tem sido propagado em diferentes sistemas de cultura de tecidos, incluindo células de aves, mustelídeos, cão, humanos, felinos e primatas. O vírus adsorve-se à célula alvo em aproximadamente uma hora, produzindo efeito citopático (ECP) característico, com a formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) e lise celular (Krakowka et al., 1985).

2.3 Imunidade

O desenvolvimento do sistema imune fetal segue um padrão comum. O timo é o primeiro órgão linfóide a se desenvolver, seguido pelos órgãos linfóides secundários. O período de gestação da cadela dura em média 60 dias, e o timo se diferencia entre o 24^o e 33^o dia de gestação. A liberação de células T para os órgãos linfóides secundários e o desenvolvimento de resposta imune humoral são fenômenos relativamente tardios no cão e ocorrem a partir do terço final de gestação, quando os fetos tornam-se imunocompetentes. Assim, o feto não é totalmente indefeso entretanto, possui menor capacidade do que um adulto para combater a infecção (Jacoby et al, 1969; Tizard, 1996).

Após o desenvolvimento em ambiente estéril no útero, os filhotes neonatos encontram-se em um ambiente antígenicamente hostil, entretanto, são capazes de responder imunologicamente. Qualquer resposta imune produzida por um neonato é primária, de aparecimento mais lento, caracterizada por uma baixos títulos de anticorpos, estando susceptíveis a microrganismos que representam pouca ameaça a um animal adulto. O neonato recebe de sua mãe uma "assistência imunológica" que é traduzida como imunidade passiva maternamente

transferida. Estes anticorpos são produzidos ativamente pela cadela e transferidos para o neonato, promovendo uma imunidade imediata àqueles antígenos experimentados pela mãe. Estes anticorpos persistem na circulação do filhote até um período variável em que possa responder ativamente aos estímulos antigênicos de forma adequada. A transferência da imunidade passiva da mãe para o filhote desempenha papel importante na sobrevivência do neonato, podendo ocorrer antes do nascimento por via transplacentária e depois do nascimento por via colostrar. Embora uma quantidade significativa de anticorpos maternos seja passada através da placenta, a maior parte da transferência ocorre através do colostro até aproximadamente um a dois dias após o nascimento (Brambell, 1970; Greene, 1990; McDonald, 1992; Tizard, 1996). Em estudo com uma cadela previamente imunizada com vacina viva (amostra "Onderstepoort") aos setenta dias de idade e hiperimunizada com a mesma vacina antes do acasalamento, observou-se que os filhotes adquiriram passivamente anticorpos neutralizantes contra a CIC pela transmissão transplacentária, entretanto, uma maior quantidade foi adquirida através do colostro (Ott et al., 1957).

Em neonatos o nível de atividade proteolítica no trato digestivo é menor, sendo adicionalmente reduzido pelos inibidores de tripsina presentes no colostro. As imunoglobulinas do colostro são absorvidas intactas por pinocitose através das células do intestino alcançando a circulação sanguínea. O período em que o intestino está permeável às imunoglobulinas é variável de espécie para espécie, sendo maior logo após o nascimento e declinando em função do tempo. A presença da mãe pode estar associada com uma melhor absorção de imunoglobulinas. Foi observado que bezerros alimentados na presença da mãe absorveram mais imunoglobulinas do que aqueles alimentados sem a presença dela (Tizard, 1996). Animais que não mamam o colostro normalmente possuem baixos níveis de imunoglobulinas no soro. O sucesso da absorção de imunoglobulinas colostrais imediatamente supre os filhotes com quantidades de anticorpos equiparadas aos níveis séricos encontrados em adultos. Por causa da natureza absorptiva, o nível sérico máximo das imunoglobulinas normalmente é alcançado entre 12 e 24 horas após o nascimento. Após cessar a absorção, estes anticorpos passivamente adquiridos, imediatamente começam a declinar através do processo catabólico normal. O tempo necessário para que as imunoglobulinas decresçam a níveis não protetores é dependente de sua concentração inicial (McDonald, 1992; Tizard, 1996).

A imunidade contra a CIC em cães tem sido alvo de interesse desde que a doença foi reconhecida. Gillespie et al. (1958) em estudo inicial com 10

cadelas demonstraram que a transferência de anticorpos maternos *in utero* ocorreu para 31 filhotes e que havia relação entre o título de anticorpos da mãe e a quantidade de anticorpos transferidos. A quantidade de anticorpos transferidos foi relativamente baixa.

Estudando a duração da imunidade passiva via útero para CIC, estes mesmos pesquisadores testaram dois grupos de filhotes que não receberam colostro oriundo de mães imunes. O grupo 1 era composto de seis filhotes, os quais foram desafiados com o vírus virulento com sete dias de idade. Dois desenvolveram títulos e quatro não, e nenhum filhote morreu. Quando reinoculados com 84 dias de idade, um morreu e os outros cinco desenvolveram títulos sorológicos quando testados 28 dias após. O grupo 2 era composto de cinco filhotes que foram desafiados com 14 dias de idade. Destes, quatro morreram e somente um desenvolveu título quando reinoculado com 84 dias, sugerindo que a proteção transplacentária protegeu os filhotes por um período de sete dias de idade mas, não mais do que 14 dias.

Em outro momento do estudo demonstraram que a proteção colostrina tinha um relação de proporcionalidade entre o título da mãe e aquele alcançado pela sua progênie, como ocorrera na transferência *in utero*. O nível sérico de anticorpos da mãe persistiu por toda lactação, a concentração de imunoglobulinas colostrais rapidamente desapareceu, enquanto que o título do filhote gradualmente diminuiu em função do tempo. Filhotes que receberam títulos altos mostraram uma persistência deste título muito mais prolongada do que os filhotes com títulos baixos.

Quando cinco filhotes de sete dias de idade foram aleitados em mães cujo colostro não continha anticorpos contra CIC, estes filhotes também não apresentaram anticorpos e todos morreram quando desafiados.

Filhotes com 21, 28 e 35 dias de idade com títulos sorológicos contra CIC relativamente altos, mostraram-se imunes ao desafio e não demonstraram aumento no nível de anticorpos. Quando desafiados, filhotes com títulos muito baixos morreram ou desenvolveram anticorpos neutralizantes. Filhotes com 42 dias de idade ou mais com baixos níveis de anticorpos oriundos de mães não imunes, quando inoculados, mostraram sinais da doença e morreram, ou, desenvolveram anticorpos neutralizantes, ou ambos. Com isto tornou-se óbvio que o colostro de mães imunes protege os filhotes contra o vírus virulento se níveis suficientes de anticorpos são transferidos, e que estes interferem com o desenvolvimento da imunidade ativa (Gillespie et al., 1958).



Winters (1981) coletou soro de 14 fetos e após o nascimento até 45 dias e comparou-os com o título de anticorpos de suas mães no leite e soro. Níveis de anticorpos neutralizantes para as três viroses estudadas (Raiva/RV, Hepatite infecciosa canina/HIC e CIC) foram detectados no soro de 10 fetos. Após o nascimento, o nível de anticorpos para as três viroses no leite da mãe diminuiu rapidamente, enquanto que nos neonatos este nível diminuiu gradativamente. Os resultados mostraram que anticorpos maternos contra RV, CIC e HIC são transferidos da mãe para seus filhotes *in utero* e através do colostro. O soro dos neonatos e leite das mães 48 horas após o nascimento apresentou altos títulos de anticorpos para RV, HIC e CIC, sugerindo desta forma que uma maior transferência de anticorpos maternos ocorreu através da ingestão de colostro pelo neonato. Com o passar do tempo após o nascimento, ocorre decréscimo no título de anticorpos no soro dos filhotes e no leite das mães. O título de anticorpos no soro das mães, com pequenas variações, manteve-se constante desde o dia do parto até 45 dias após. Em cada ninhada de fetos haviam alguns com níveis séricos de anticorpos variando entre si de 10 a 300 vezes, sugerindo que mesmo *in utero* existem diferenças marcantes na quantidade de anticorpos transferidos por via transplacentária. Diferenças nos níveis de anticorpos maternos entre as ninhadas, possivelmente refletem diferenças de cuidado com os filhotes e, talvez, diferenças nos níveis de anticorpos maternos transferidos *in utero*.

Sob circunstâncias normais, a proteção contra infecção durante as primeiras semanas de vida é fornecida pela transferência passiva de imunoglobulinas e de material celular oriundo da mãe. Pequena quantidade (2 a 18 %) de anticorpos pode ser passada por via transplacentária. Subsequentemente, as imunoglobulinas absorvidas do colostro dão ao neonato título semelhante ao da mãe, e a quantidade varia de acordo com a doença considerada. O título do neonato é proporcional ao título de sua mãe e da quantidade absorvida antes da diminuição de permeabilidade intestinal, bem como da pequena quantidade adquirida através da placenta. Na CIC é observado que o título do filhote corresponde a 3 e 77% do título da mãe antes e após mamar o colostro respectivamente. A porcentagem do título do filhote em relação ao título de anticorpos transferidos via útero e colostro é de 4 e 96% respectivamente (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Krakowka et al., 1975; Krakowka et al., 1978; Greene, 1990; McDonald, 1992).

O declínio dos anticorpos maternos no neonato é similar àquele das imunoglobulinas recebidas passivamente, sendo que em cada doença o declínio baseia-se na meia-vida dos anticorpos. A meia-vida dos

anticorpos para a CIC é de 8,4 dias, ou seja, a cada 8,4 dias o nível sérico de anticorpos no filhote decresce em torno de 50%. Esta queda reflete um catabolismo protéico normal. Desta maneira, ocorrerá uma variação intra e inter-ninhadas (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986; Greene, 1990; McDonald, 1992).

De uma maneira geral, títulos de anticorpos neutralizantes (AN) maiores ou iguais a 100 (2,0 log) são correlacionados com proteção completa contra o vírus virulento. Abaixo deste nível uma queda na resistência ou uma alta dose de vírus virulento poderá levar à doença (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986).

Títulos de anticorpos maternos neutralizantes maiores ou iguais a 20 (1,3 log) são considerados geralmente protetores contra CIC. Estes níveis de anticorpos provavelmente neutralizam o vírus vacinal e bloqueiam a resposta à vacinação. Tem sido demonstrado que 50% dos filhotes até 42 dias de idade já perderam a proteção materna. Com 84 dias de idade 90% dos filhotes são capazes de responder à vacinação contra CIC. Os filhotes que não receberam colostro ou que são filhos de cadelas com baixos títulos séricos ou soronegativas para CIC, claramente serão susceptíveis antes de 42 dias de idade. Entretanto, a vacinação antes de 21 dias não resultará em uma boa resposta humoral e celular nos cães, uma vez que o sistema imune não estará completamente desenvolvido até esta idade.

Gillespie et al. (1958) observaram que filhotes de sete dias de vida ou mais velhos quando desafiados com vírus virulento, morreram ou desenvolveram imunidade se seus níveis séricos de anticorpos estavam menores que 20 (1,3 log). Enquanto que estavam imunes se seus títulos eram maiores ou iguais a 30 (1,5 log). Os autores não definiram, entretanto, qual era o estado imune daqueles animais que se encontravam entre os títulos de 21 e 30.

A quantidade de anticorpos maternos transferidos para o filhote é diretamente proporcional ao título da mãe. Estes anticorpos transferidos maternalmente proporcionam um período de imunidade temporária que varia de poucos dias à meses. Existe um período de tempo em que o título declinante do filhote é inadequado para impedir uma infecção natural mas ainda interfere com uma imunização ativa, sendo esta fase denominada período crítico.

Um programa de vacinação projetado para proteger filhotes contra a CIC deve começar quando os anticorpos transferidos passivamente declinem

a um nível que torna os filhotes capazes de responder imunologicamente frente a exposição ao vírus vacinal. Na maioria dos filhotes, a concentração dos anticorpos maternos é suficientemente reduzida com 42 a 56 dias de idade, tornando os animais susceptíveis à infecção e permitindo que eles respondam à vacinação. Em alguns filhotes, os níveis de anticorpos maternos ainda são protetores aos 98 dias de idade interferindo com a imunização contra a CIC. Infelizmente a proteção colostrar pode desaparecer antes dos filhotes serem vacinados e conseqüentemente, alguns filhotes estarão susceptíveis ao nascimento enquanto outros estarão protegidos e não poderão ser vacinados até que alcancem 84 dias de idade. Várias pesquisas indicam que um grande número de filhotes a cada ano estão expostos durante a fase crítica (Baker et al., 1959; Shell, 1990; McDonald, 1992).

Scott et al. (1970) em estudo com gatas imunes contra panleucopenia e suas crias, observaram que os títulos soroneutralizantes na maioria das mães diminuíram ligeiramente no parto retornando aos valores do pré-parto e permanecendo razoavelmente constantes pelo período restante de observação. Amostras obtidas dos filhotes 30 minutos após mamar continham lípidos colostrais, 24 horas após a mamada foi observado aumento nos títulos neutralizantes aproximando-se aos títulos de suas mães. Os títulos de anticorpos neutralizantes dos filhotes decresceram sete dias após o parto e continuaram diminuindo a uma taxa uniforme, desaparecendo totalmente entre 70 a 112 dias de idade.

Anticorpos maternos recebidos via útero e colostro pelos filhotes, interferem com uma imunização adequada por um período de tempo após o nascimento e desmama, como já comentado anteriormente. Filhotes com anticorpos séricos detectáveis contra CIC, com poucas exceções, resistem à imunização ativa e não soroconvertem após a vacinação. Para determinar o momento certo de vacinação, um normograma foi desenvolvido por Baker et al. (1959) para determinar a idade mais precoce com que os filhotes estariam susceptíveis ao vírus da CIC respondendo a uma vacinação, baseado no título da mãe. Os autores observaram ser imprescindível o conhecimento da variabilidade dentro da ninhada. Nem todos os filhotes de uma mesma ninhada perdem seus anticorpos maternos exatamente no mesmo momento. A variabilidade dentro da ninhada é decorrente da quantidade de colostro ingerida. Assim, o nível de anticorpos maternos é variável entre os filhotes dentro da mesma ninhada e o normograma, embora útil para prever a idade aproximada de vacinação, não inclui vacinações repetidas das ninhadas por segurança.

A quantidade de anticorpos transferidos é inversamente proporcional ao tamanho da ninhada. Estes valores são tão variados entre animais individualmente que predições quantitativas não podem ser feitas simplesmente através da medida direta das imunoglobulinas da mãe ou dos filhotes. Os veterinários podem adotar algumas estratégias na tentativa de evitar a neutralização dos antígenos de origem vacinal pelos anticorpos maternos antes da exposição ao vírus virulento: o uso de doses múltiplas de vacinas aplicadas com 14 a 28 dias de intervalo, vacinas com determinantes antigênicos similares como a do sarampo, ou o uso de vacinas com alta dose antigênica. Frequentemente as vacinas podem acelerar a depleção dos anticorpos maternos presentes na circulação do neonato (Baker et al., 1959; Krakowka et al., 1985; Lewis et al., 1988b; Greene & Appel, 1990; McDonald, 1992).

Baker et al. (1959) concluíram ser indispensável conhecer exatamente o título de anticorpos maternos com o qual o filhote deveria estar antes que a proteção materna fosse totalmente perdida e este respondesse eficientemente a uma vacinação. A variabilidade dentro de uma ninhada baseada no título sorológico foi constante ao longo do tempo, e o desvio padrão foi estimado em 0,2245 log. Um nível crítico de anticorpos que separa animais protegidos de não protegidos não foi encontrado pelos testes de imunidade, ao contrário, uma faixa crítica de títulos foi encontrada, provavelmente devido a erros experimentais. Filhotes com o mesmo título de anticorpos variaram na resposta à inoculação com o vírus da CIC, alguns demonstrando imunidade e outros susceptibilidade. Títulos menores ou iguais a 20 (1,3 log) produziram resposta imune, enquanto que um título de 80 (1,9 log) era susceptível. Os dados acumulados indicaram que com um título de 20 (1,3 log), aproximadamente 96% dos filhotes mostraram-se susceptíveis. Com base neste ensaio, ficou determinado que o momento para se vacinar uma ninhada deveria ser a idade mais precoce na qual todos os filhotes da ninhada estivessem com títulos abaixo de 20 (1,3 log).

Tem sido estimado que 50% dos filhotes são susceptíveis ao vírus e respondem a vacinação com 42 dias de idade; 75% respondem com 63 dias de idade; 95% respondem com 84 dias de idade e 99% respondem com 105 dias de idade. Tem sido registrada como proposta prática que em média os anticorpos maternos estão em níveis mínimos com 63 dias de idade. A alta porcentagem de respostas em cães com mais de 84 dias de idade pode ser devida em parte à maturação do sistema imune (Rude, 1987).

Fatores endógenos e exógenos podem influenciar nas falhas vacinais e incluem: influências maternas e hereditárias, estresse, idade, deficiências nutricionais, exposição a infecções concorrentes, administração de drogas, imunodeficiências primárias. A completa maturidade do filhote não é alcançada até a terceira semana de vida (aproximadamente 21 dias de idade). A hipotermia relativa dos neonatos pode afetar a resposta imune à vacinação (Povey, 1986; Gouveia et al., 1987; Lewis et al., 1988b; Olson et al., 1988; McDonald, 1992).

Uma das causas mais comuns de falhas vacinais em filhotes jovens é a presença de anticorpos maternos. Estudos tem demonstrado que os títulos não podem ser aumentados nem pelo vírus virulento nem pelo atenuado a menos que o animal esteja sorologicamente susceptível. Não se deve esperar um sucesso absoluto oriundo de qualquer medida preventiva. Cães diferem grandemente em sua susceptibilidade à infecção e na prontidão com que respondem com produção de anticorpos. O *status* imune da mãe afeta na imunohabilidade do filhote. Altos níveis de imunidade materna passivamente transferida podem interferir com imunização usando uma única dose de vacina com vírus adaptado em ovo. A determinação da eficácia da vacinação através da titulação de anticorpos humorais é discutida pois não revela a imunidade real do animal. Animais sem anticorpos humorais detectáveis podem estar protegidos contra uma doença pela imunidade celular, pois a memória celular a um antígeno pode persistir após os níveis séricos de anticorpos declinarem. Por outro lado, se anticorpos humorais são detectados, uma imunidade ativa ou passiva é evidente (Ott et al., 1957; Baker et al., 1959; Scott et al., 1970; Lewis et al., 1988b; Olson et al., 1988; Greene, 1990).

Tizard (1996) observou que em uma população de cães, a proporção de animais susceptíveis aumenta gradualmente de muito pouco a nenhum ao nascimento até quase todos às 70 a 84 dias de vida. Imediatamente ao nascimento poucos filhotes podem ser vacinados com sucesso, mas com 70 a 84 dias quase todos podem. Em regiões onde a CIC não é endêmica, a vacinação poderia ser atrasada até que todos os filhotes alcancem 84 dias de idade, aumentando a probabilidade do sucesso da vacinação. Infelizmente tal atraso implicaria em um maior número de filhotes susceptíveis à doença e sem proteção imune. Existem vários procedimentos alternativos similares, todos com o objetivo de conferir precocemente proteção, deixando poucos filhotes desprotegidos. Filhotes órfãos privados do colostro podem ser vacinados com 14 dias de idade.

Um animal imunocompetente responde a um agente infeccioso com resposta imunológica contra ele. Vacinação envolve administração de agente infeccioso modificado com indução de resposta imune no animal ao qual conferirá uma proteção completa ou parcial. Animais são expostos a agentes infecciosos ao longo de toda vida mas são mais susceptíveis durante os primeiros seis meses de vida. A vacinação da cadela antes da cobrição e vacinação da ninhada em idade apropriada são essenciais para um bom programa de vacinação. Revacinações são necessárias para estabelecer e manter uma máxima proteção contra agentes infecciosos. Um esquema de vacinação efetivo é parte integral de um programa de medicina veterinária preventiva para os animais domésticos. Vacinas vivas atenuadas estimulam imunidade superior em relação às vacinas inativadas. A vacinação contra CIC é realizada em combinação com outros antígenos e deveria começar com 42 a 56 dias de idade naqueles animais que receberam colostro (14 a 28 dias de idade naqueles animais que não receberam colostro) e ser repetidas com 21 a 28 dias de intervalo até 84 a 98 dias de idade. Vacinação utilizando vacina de sarampo foi utilizada para produzir uma resposta imune heterotípica na presença de alta concentração de anticorpos maternos contra CIC, produzindo resposta celular imuno-mediada. O vírus do sarampo não é neutralizado pelos anticorpos contra CIC, entretanto a vacina induz imunidade limitada que protege contra doença mas não contra a infecção (Krakowka et al., 1985; Appel, 1987; Lewis et al., 1988a; Lewis et al. 1988b; Greene, 1990). O uso desta vacina é controverso, indicando que uma vacina viva de sarampo falhou na proteção de filhotes contra a CIC quando desafiados intranasalmente com o vírus virulento da CIC 35 a 49 dias após vacinação. Foi observado que a vacina do sarampo protegeu 93% de filhotes vacinados aos 42 dias de idade (Rude, 1987).

Em filhotes entre 42 a 84 dias de idade, a vacinação com vírus do sarampo tem sido utilizada para induzir imunidade transitória contra CIC a qual, por ser temporária, deve ser sucedida após 14 a 21 dias, por imunização com vacina contra CIC para produzir uma imunidade sólida (Shell, 1990). O uso da vacina de sarampo foi originalmente recomendado para filhotes de 14 a 28 dias de idade, entretanto, não foi um sucesso em condições de campo, embora sua segurança e eficácia já tivessem sido testadas em filhotes desta idade. Uma explicação para esta discrepância só foi encontrada mais tarde: enquanto títulos baixos de anticorpos maternos para CIC foram bem tolerados em filhotes de 42 a 70 dias, títulos de 300 (2,5 log) ou mais em filhotes de 14 a 28 dias de idade interferiam com a vacina de sarampo (Appel, 1987).



2.4 Testes sorológicos

Várias técnicas podem ser utilizadas para a titulação de anticorpos contra CIC. O teste de difusão em gel tem sido usado no estudo do antígeno e anticorpo contra CIC, mas não tem sido usado extensivamente em laboratório de investigação. O vírus da CIC causa hemaglutinação em hemácias de sapo. Outros observaram resultados irregulares com o teste de hemaglutinação, no qual células vermelhas oriundas de vários animais foram empregadas (Gillespie, 1966; Krakowka et al., 1985).

O teste de ELISA tem sido usado para detectar IgG e IgM para a CIC. Títulos aumentados de IgM podem ser detectados no soro de cães que se recuperam da fase aguda da doença. Altos títulos de IgG são ambíguos e podem indicar infecção recente, passada ou infecção presente com ou sem vacinação. A análise específica de IgG é mais confiável na detecção de infecções crônicas progressivas de CIC no sistema nervoso central (Greene, 1990).

Noon et al. (1980) desenvolveram um ELISA e seus resultados foram comparados com o teste de soroneutralização. Soros de 273 cães colhidos aleatoriamente foram examinados, poucas discrepâncias entre os testes ocorreram, normalmente em limites de títulos muito baixos. O ELISA detectou anticorpos (IgM) contra a CIC uma semana antes da soroneutralização tornar-se positiva.

Vários pesquisadores registram o uso do teste de fixação de complemento contra CIC, entretanto os anticorpos fixadores de complemento persistem no soro de animais convalescente por poucas semanas após infecção inicial. Anticorpos neutralizantes persistem por muito mais tempo; testes de soroneutralização para CIC foram feitos em ovos embrionados por duas décadas. Embora confiável, este teste era caro e demandava tempo para se obter o resultado. Gillespie (1966) registrou que Cabasso em 1951, utilizou o vírus da CIC adaptado em ovo embrionado como um método qualitativo para detectar anticorpos soroneutralizantes em ovo embrionado. Mais tarde, outros pesquisadores utilizaram este vírus para um teste quantitativo frente a concentração de vírus pré-determinada. Sua especificidade foi demonstrada e a relação entre vírus e quantidade de anticorpos foi observada como uma curva linear de aproximadamente um. A titulação de anticorpos medidos pela soroneutralização tem ajudado a indicar o nível de proteção que pode ser esperado em cães de todas as idades depois de infecções natural e experimental (Winters, 1981).

A soroneutralização consiste na reação entre o soro a ser testado e o vírus sob determinadas condições e a inoculação destes, em um sistema revelador susceptível (animal, ovo, cultura de células). Se anticorpos específicos para o vírus em questão estiverem ausentes no soro, doença, lesão ou morte podem ocorrer. Quando anticorpos estiverem presentes, nenhuma reação ocorrerá (Rovozzo & Burke, 1973).

Várias linhagens virais tem sido usadas para determinar o *status* imune de cães através da soroneutralização, e vários ensaios de soro e vírus neutralização, usando placas de microcultura, tem sido registrados. Um teste de SN em cultura de célula em microplacas mostrou-se tão sensível quanto o teste convencional em ovo embrionado de galinha (Gillespie, 1966; Appel & Robson, 1973). Resultados de 148 soros indicaram que o microteste tem maior sensibilidade e um erro médio muito menor. A reprodutibilidade do título dos soros usando a microtécnica foi analisada. O efeito combinado de todas as origens de variabilidade dentro do laboratório resultou em um erro padrão de mais ou menos 0,3 log para uma amostra de soro titulada em diluições triplas, em quadruplicata por diluição (Appel & Robson, 1973).

Teste de SN em células de rim de cão com a linhagem "Rockborn" de CIC foi estudado mas seu efeito citopático ocorre muito tardiamente (aproximadamente 10 dias), no qual torna-se necessário a troca de meio de cultura. A determinação do título através de anticorpos fluorescentes torna este teste tedioso. A formação de sincício em célula Vero em dois a três dias por uma amostra de vírus altamente atenuada em ovo ("Onderstepoort") permitiu a utilização da SN em placas de microtitulação. Uma vez adaptado, o vírus do CIC replica em um grande número de linhagens celulares de várias espécies diferentes. Linhagens de células de rim de cão e de células de rim de macaco verde (Vero) tem sido mais comumente utilizadas. A formação de células gigantes multinucleadas (sincício) é mais comumente encontrada nas infecções líticas do vírus da CIC (Appel & Robson, 1973; Greene, 1990).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Participaram deste experimento 16 cadelas de diferentes raças (duas Rottweiller, uma Pointer, uma Weimaraner, duas Cocker-Spaniel, uma Dashound, uma Poodle, oito Beagle) com suas respectivas crias (87 filhotes) pertencentes a canis de Belo Horizonte (MG). Os filhotes de cada ninhada foram identificados individualmente, com auxílio de colar numerado, com tamanho ajustável ao diâmetro do pescoço. As cadelas foram vacinadas quando filhotes contra CIC e parvovirose utilizando o esquema de três doses intervaladas de 30 dias; revacinações anuais e pré-cobrição não foram realizadas nas cadelas. O experimento foi realizado respeitando a rotina adotada pelo proprietário e desta forma, a escolha do produto foi feita pelo mesmo. Durante o experimento os filhotes das cadelas 3, 8, 15, 16 foram vacinados com vacinas vivas atenuadas oriundas de quatro laboratórios distintos. Foi analisada a situação real dos animais de acordo com o ambiente de origem e destino. Alguns filhotes foram acompanhados por mais tempo que outros de acordo com cada situação em particular. As cadelas foram numeradas de 1 a 16 e as ninhadas correspondem ao número da cadela (Tabela 1).

3.2 Amostras

Foram coletadas amostras das cadelas no pré-parto, 48 horas após o parto e quinzenalmente. As cadelas 3, 4, 5, 8, 14, 15, 16 não foram submetidas a coleta pré-parto, por razões operacionais (registro incorreto da data de cobrição, parto inesperado). Nos filhotes, as coletas foram realizadas 48 horas após o nascimento e quinzenalmente totalizando oito coletas. Como foi um experimento de campo, alguns animais não obedeceram à estratégia inicialmente planejada; foram observados imprevistos tais como: morte ou venda de animais, a não autorização por parte do proprietário da sangria dos animais; desta forma, o número de amostras de soros variou de ninhada para ninhada não obtendo-se amostras homogêneas. As coletas foram iniciadas em junho de 1994 e finalizadas em julho de 1995.

3.3 Processamento das amostras

As amostras foram coletadas sem anti-coagulante por punção na veia jugular (3,0 ml para as cadelas utilizando agulhas de calibre 25X8 e 1,0 ml para os filhotes utilizando agulhas 25X7). No local, as amostras foram acondicionadas em tubo de ensaio e mantidas à temperatura ambiente até a coagulação. Em seguida, foram encaminhadas ao laboratório de virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. No laboratório as amostras foram colocadas em estufa a 37° C por 20 a 30 minutos e em seguida à temperatura de geladeira (4 a 8° C) por 20 a 30 minutos para completa retração do coágulo. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos em centrífuga clínica. Os soros foram aliqüotados, identificados e armazenados em freezer a -20° C até a realização dos testes.

3.4 Soroneutralização

-- 3.4.1 Vírus

Alíquotas liofilizadas do vírus da CIC amostra "Onderstepoort" foram gentilmente cedidas pelo laboratório Lema Biologic do Brasil (Belo Horizonte, MG). O vírus foi reconstituído com 1,0 ml de MEM sem soro e diluído 1:6. Foram inoculados 2,0 ml de suspensão viral por garrafa contendo $6,0 \times 10^4$ células/cm² e foram colocadas em estufa à 37°C com 5% de CO₂, sendo que o ECP foi observado três dias após a inoculação. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, o sobrenadante foi recolhido e centrifugado em centrífuga refrigerada Sorvall à 4°C, a 4000 x g por 30 minutos para clarificação. O sobrenadante foi recolhido e aliqüotado em frascos, armazenados a -80°C para posterior titulação.

3.4.2 Cultura de células

Foram utilizadas culturas de células de rim de macaco verde africano (Vero). Para titulação do vírus e realização da soroneutralização foi necessário padronizar a concentração de células dispensadas em cada pocinho (0,32 cm²) da microplaca. Um ensaio inicial procedeu-se com concentrações de células variando de 20.000 células/poço até 80.000 células/poço, com período de observação de cinco dias; como melhor concentração foi encontrada uma faixa entre 20.000 e 30.000 células/poço optando-se pela média 25.000 células/poço.

3.4.3 Titulação do vírus

Do vírus crescido em cultura de células e armazenado em freezer -80°C foi retirada uma alíquota para proceder a titulação. Foram feitas oito diluições decimais da amostra original (10^{-1} a 10^{-8}). Cada diluição foi colocada em quintuplicata. Foram mantidos em cada placa dois controles de células e meio. A leitura foi efetuada cinco dias após inoculação sendo o título do vírus calculado pelo método de Reed-Muench (1938) e determinado como $10^{3,36}$ TCID₅₀/25µl. A suspensão foi ajustada para se obter concentração de 100 TCID₅₀/25µl para o teste de soroneutralização.

3.4.4 Teste

O teste de SN foi padronizado em microplaca de 96 poços para cultura de tecido fundo chato segundo Appel et al. (1973), com modificações. Os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos. Cada amostra de soro foi testada em triplicata. Inicialmente foram colocados 25 µl de meio MEM com antibióticos (penicilina, estreptomicina, amphotericina B na concentração por ml de 200 UI, 200 µg e 50 µg, respectivamente) sem soro fetal bovino em toda placa, exceto na linha G. Em seguida, procedeu-se a diluição dos soros começando na coluna 2 até a 12. Diluições duplas dos soros foram realizadas de 1/2 até 1/2048. Reservou-se a linha G para os controles de meio, soro padrão positivo e negativo e célula. A linha H foi reservada para os controles de vírus com 100, 10, 1, 0, 00 TCID₅₀/25µl. O soro padrão positivo foi cedido pelo laboratório Biovet (Cotia, SP) cujo título soroneutralizante foi de 600 (2,8 log). O soro padrão negativo foi obtido de uma cadela de três meses de idade que não havia sido vacinada e estava isolada sem contato com outros da espécie cujo título era menor que 2 (0,3 log). Após a colocação do meio sem soro fetal e dos soros diluídos, foram colocados 25µl de vírus (100 TCID₅₀/25µl) e os controles. As placas foram incubadas em estufa por uma hora a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, tempo necessário para a formação do complexo antígeno/anticorpo. Após este período, foram colocados 100 µl de células Vero na concentração de 250.000 células/ml, as placas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ e a leitura foi realizada em microscópio invertido cinco dias após a inoculação, através da observação do ECP. Os pocinhos foram considerados negativos (sem sinais de neutralização viral) quando eram visualizados sinais da presença do vírus nas células pelo ECP característico. Em todas as placas existiam controles de meio, soro padrão positivo e negativo, célula e vírus. Para cada amostra

testada também foi feito controle de soro da amostra, que consistia no soro testado e células Vero para verificar se este soro não teria fatores tóxicos à célula, interferindo com a leitura. O cálculo dos títulos foi feito pelo método de Reed-Muench (1938) sendo expresso como logaritmo na base 10(log) ou como o inverso da diluição que contém a DE₅₀ (dose efetiva 50%).

3.5 Análise dos dados

Este experimento baseou-se na análise descritiva dos resultados encontrados. Os parâmetros avaliados seguiram os mesmos estudados por Scott et al. (1970) para a panleucopenia felina.



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 16 cadelas testadas, o resultado referente à transferência da imunidade passiva contra CIC somente foi possível em seis cadelas (1, 2, 9, 10, 12, 13) que foram acompanhadas no pré-parto com seus respectivos 24 filhotes. O nível de anticorpos neutralizantes (AN) pré-parto destas cadelas apresentou pequena variação em relação ao título 48/72 horas pós-parto (Figura 1A/1B), não sendo esta variação significativa nem para menos como nas cadelas (1, 2, 10) ou para mais como nas cadelas (9, 12, 13). Appel & Robson (1973), testando a reprodutibilidade dos títulos de soros usando a microtécnica, concluíram que o efeito combinado de todas as origens de variabilidade dentro do laboratório resultou em um erro padrão de 0,3 log, utilizando diluições triplas de soro em quadruplicata. Estes títulos de AN das cadelas observadas permaneceram razoavelmente constantes por todo período do experimento (Figuras 1A/1B), estando de acordo com Gillespie et al. (1958) e Winters (1981) que observaram que o título de anticorpos contra CIC nas cadelas por eles estudados mantiveram-se constantes desde o dia do parto e por toda lactação. Nas cadelas restantes não foi possível a coleta do soro pré-parto. Os títulos de AN das cadelas não acompanhadas sorologicamente no pré-parto, mas que possuíam níveis de AN contra CIC (cadelas 3, 8, 11, 14), seguiram o mesmo padrão, ou seja mantiveram-se constantes por todo período de observação (Figuras 1A/1B); exceto nas cadelas 4, 5 e 6 que serão comentadas posteriormente. As cadelas 7, 15 e 16 apresentavam níveis de AN muito baixos, menores que 2 (0,3 log).

Alguns filhotes com 48/72 horas de vida oriundos das cadelas com sorologia pré-parto (cadelas 1, 2, 9, 10, 12, 13), tiveram seus títulos de AN relacionando-se ao título de suas mães sendo observado uma grande variação dentro das ninhadas, exceto na cadela 9 que será comentada posteriormente (Tabela 2). Estes resultados confirmam os achados por Gillespie et al. (1958), Gillespie (1966), Krakowka et al. (1975), Krakowka et al. (1978), Greene (1990) e McDonald (1992) em que as imunoglobulinas absorvidas do colostro dão ao neonato título semelhante ao de sua mãe e que outros fatores podem influenciar no título dos neonatos tais como, competição entre os filhotes, boa habilidade materna, tempo de mamada.

Ninhadas procedentes das cadelas 10 e 13 com títulos pré-parto menores que 30 (1,5 log), título mínimo protetor estabelecido por Gillespie et al. (1958), apresentaram título médio inferior a este valor. Estes filhotes estão susceptíveis muito precocemente, tanto ao vírus virulento quanto ao vacinal, e uma vacinação antes de 21 dias de vida não resultará em boa resposta humoral e celular, já que o desenvolvimento completo do sistema imune ocorre até 21 dias de idade (Gillespie et al., 1958; Gillespie 1966; Povey, 1986). Estes pesquisadores demonstraram que os filhotes que não receberam colostro ou que são filhos de cadelas com baixos títulos, tornam-se susceptíveis antes de 42 dias de idade. Somente a ninhada procedente da cadela 12 apresentou título médio superior a 100 (2,0 log), considerado por Gillespie et al. (1958), Gillespie (1966) e Povey (1986) como solidamente protetor, mais uma vez revelando uma relação de proporcionalidade entre o título da mãe e aquele alcançado pela progênie.

A relação entre o título das cadelas 48/72 horas pré-parto, e de seus filhotes com 48/72 horas de vida, foi estabelecida como a porcentagem de transferência (PT) passiva de AN, tendo portanto sido o cálculo efetuado apenas nas cadelas em que foi possível a coleta de soro pré-parto (cadelas 1, 2, 9, 10, 12, 13), conforme apresentado na tabela 3. Entre os filhotes de uma mesma ninhada e entre ninhadas, este índice foi bastante variável. A porcentagem média (calculada através da mediana) de transferência encontrada entre as ninhadas avaliadas foi de 58%, discordando de Gillespie et al., (1958); Gillespie, (1966); Krakowka et al., (1975); Krakowka et al., (1978); Greene, (1990) e McDonald, (1992) que observaram que o título do filhote após mamar corresponde a 77% do título da mãe. Winters (1981) verificou que ainda dentro do útero existem diferenças marcantes na quantidade de anticorpos transferidos por via transplacentária e que diferenças nos níveis de anticorpos maternos entre as ninhadas, possivelmente são reflexos das diferenças de cuidado com os filhotes, boa habilidade materna, presença da mãe, tempo de mamada, número de filhotes e possivelmente diferenças nos níveis de anticorpos maternos transferidos *in utero* (Tizard, 1996). As cadelas 10 e 13 possuíam títulos inferiores ao protetor (menor que 30 ou 1,5 log) conseqüentemente é esperado que seus filhotes já nasçam com nível de AN abaixo de 30 (1,5 log). Entretanto o fato de uma cadela possuir título maior que 30 (1,5 log) não implicará que todos os seus filhotes nascerão com níveis também acima de 30. Na cadela 2, percebe-se que seu título pré-parto é de 45 (1,65 log), todos os filhotes nasceram com títulos acima de 30, exceto o F3 que apresentou um título de 11 (1,0 log) com 48 horas de vida estando completamente susceptível já na fase neonatal, refletindo uma variação dentro de uma mesma ninhada e relacionado

com outros fatores que contribuem para uma menor absorção de imunoglobulinas tais como, tempo de mamada, competição entre os filhotes, número de filhotes, boa habilidade materna, presença da mãe e tranquilidade ao mamar, além da transferência *in utero* (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Krakowka et al., 1975; Krakowka et al., 1978; Winters, 1981; Greene, 1990; McDonald, 1992; Tizard, 1996). Na cadela 9 foi observada a mesma situação acima citada, ou seja, filhote (F2) oriundo de mãe com níveis de anticorpos protetores 38 (1,58 log), nascendo completamente susceptível com título de AN de 19 (1,28 log), mais uma vez refletindo variação intra-ninhada e outros fatores que interferem na absorção adequada de colostro. Embora a cadela 2 tenha título ligeiramente superior ao da cadela 9, seu filhote (F3) apresentava-se com título AN bem menor em relação ao filhote da cadela 9 (F2), denotando mais uma vez, que outros fatores além do título materno influenciam no título dos filhotes. Por outro lado diferenças no título de 0,3 log são aceitáveis na soroneutralização (Appel & Robson, 1973).

Verifica-se diferença significativa da PT média encontrada nos filhotes da cadela 9 (165%) em relação às outras ninhadas avaliadas, nas quais a PT média variou de 44% a 69,3%. Quatro dos cinco filhotes da cadela 9 apresentaram PT materna superior a 100% (títulos superiores ao da mãe). Considerando não ser esta uma situação fisiologicamente normal em termos de anticorpos passivos e descartando a hipótese de ter ocorrido um erro experimental, já que estes soros foram retestados, provavelmente estes filhotes tiveram contato com o vírus virulento da CIC antes do nascimento. Isso confirma o descrito por Jacoby et al. (1969) e Tizard (1996) que a partir do terço final de gestação, os fetos já tornam-se imunocompetentes sendo capazes de responder à estímulos antigênicos de acordo com o seu desenvolvimento imunológico.

A tabela 4 apresenta a média quinzenal (sendo utilizado o cálculo da mediana) de títulos de AN transferidos passivamente das cadelas para 16 ninhadas de 2 dias até 60 dias de idade. O título médio inicial para os filhotes foi de 63 aos dois dias de idade, de 24 para aqueles compreendidos na faixa etária de três a 15 dias, 11 para os de 16 a 30 dias de idade, 3 entre 31 e 45 dias de idade e 1 entre 46 e 60 dias de idade. Percebe-se uma queda no título de AN transferidos passivamente diretamente proporcional à idade das crias. Estes resultados concordam com os de Gillespie et al. (1958) que estudaram a duração dos anticorpos maternos em filhotes, os quais gradualmente diminuíram em função do tempo. De acordo com McDonald (1992) e Tizard (1996) após cessar a absorção, os anticorpos passivamente transferidos, imediatamente começam a declinar através do processo catabólico

normal. O tempo necessário para que as imunoglobulinas decresçam a níveis não protetores é dependente da sua concentração inicial. Considerando como sendo maior ou igual a 30 (1,5 log) o título neutralizante mínimo protetor contra CIC e considerando ainda o título médio de cada uma das ninhadas testadas, observou-se que duas das nove ninhadas testadas (22%) apresentaram-se susceptíveis aos dois dias de idade, 6/12 (50%) entre 3 e 15 dias, 13/14 (93%) entre 16 e 30 dias, 9/10 (90%) entre 31 e 45 dias de idade e 8/8 (100%) entre 46 e 60 dias de idade. Esta proporção foi aumentando em função da idade dos filhotes e da perda fisiológica normal dos anticorpos maternos passivamente transferidos. Foi observado que 50% das ninhadas já estavam desprotegidas com até 15 dias de idade, revelando provavelmente baixos títulos maternos decorrentes de falha no manejo de não se vacinar as cadelas anualmente e/ou pré-cobrição ou outros fatores interferindo para uma boa aquisição de anticorpos por via colostro. A partir de 16 dias, 93% das ninhadas já haviam perdido sua proteção materna, exceto a ninhada 12 que era oriunda de cadela com título muito superior aos das outras cadelas (300; 2,5 log). A ninhada 12 apresentou níveis muito baixos de AN, tornando-se susceptível a partir de 46 dias de idade. Estes resultados foram diferentes dos encontrados por Gillespie et al. (1958), Gillespie (1966), Povey (1986) e Rude (1987) de que 50% dos filhotes até 42 dias já haviam perdido sua proteção materna e 90% com 84 dias de idade são capazes de responder à vacinação contra CIC.

Se considerarmos um programa de vacinação ideal, os filhotes deste estudo, deveriam ser imunizados a partir de 30 dias de idade, momento em que estão susceptíveis e seu sistema imune está completamente desenvolvido (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986). Considerando que uma única dose de vacina viva é suficiente para produzir boa resposta em animais susceptíveis e em contra partida, considerando que o índice de maior resposta ocorre a partir de 84 dias de idade, talvez uma sugestão seria proceder duas revacinações nestes animais com intervalos de 30 dias. Este procedimento seria totalmente flexível se o clínico tivesse acesso a uma sorologia para avaliar o momento mais apropriado de se vacinar, avaliando a resposta do animal perante tal procedimento. Como comentado anteriormente, a vacinação antes de 21 dias não resultará em boa resposta imune humoral e celular, mesmo que os filhotes já estejam sem a proteção materna deve-se esperar uma idade mais adequada. O uso de soro hiperimune com título de anticorpos conhecido seria uma estratégia alternativa nestes filhotes de 15 até 30 dias. Ou mesmo a reclusão destes filhotes sem permitir que

entrem em contato com outros da espécie até a determinação do momento mais adequado da vacinação, caso haja possibilidade.

Um período crítico ocorre em que o título declinante do filhote é inadequado para impedir uma infecção natural mas ainda interfere com imunização ativa (Baker et al., 1959; Shell, 1990; McDonald, 1992). Devido a queda de anticorpos passivos ter ocorrido muito precocemente nos animais estudados (15 dias) este período crítico não teria importância nestes animais já que eles seriam vacinados no mínimo a partir de 30 dias (Tabela 4), concordando com os autores acima citados que a proteção colostrar pode desaparecer antes dos filhotes serem vacinados e conseqüentemente, alguns estarão susceptíveis ao nascimento enquanto que outros estarão protegidos até idade mais avançada.

A seguir, são discutidos os dados obtidos pela análise individual de cada cadela com o seus respectivos filhotes, acompanhando seus perfis sorológicos. Percebe-se grande variação na transferência dos anticorpos maternos avaliada através da relação entre o título de AN da cadela 1 48/72 horas pré-parto e o título sorológico de seus filhotes com 48/72 horas de vida, conforme apresentado na tabela 3. O filhote nº. 2 (F2) apresentou uma taxa de transferência materna de 95% em relação ao título da mãe, diferenciando-o dos outros filhotes da ninhada que apresentaram taxa de transferência variando de 14 a 34%. Podemos considerar que somente o F2 estava seguramente protegido após colostro, com título acima de 100 (2,0 log). Os outros dois filhotes apresentaram-se dentro da faixa de moderadamente protegidos (maior que 30, 1,5 log), conotando grau variado de proteção (Gillespie et al. (1958), Gillespie (1966) e Povey (1986). Com 16 dias após o parto apenas o F1 estava ainda na faixa considerada protetora, acima de 30 (1,5 log) (Figuras 2A/2B). O F2 apresentava um título materno de 27 (1,4 log), refletindo variação na persistência dos anticorpos maternos na circulação do filhote e uma relação direta com a taxa de catabolismo protéico normal e com a taxa de crescimento do filhote (Gillespie, 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986; Brambel, 1970; Greene, 1990; McDonald, 1992; Tizard, 1996). Provavelmente o F2 era muito maior em relação aos da ninhada e sua taxa catabólica protéica maior. Todos os filhotes da cadela 1 estavam susceptíveis tanto ao vírus virulento quanto ao vacinal, aos 30 dias de idade, discordando de Baker et al. (1959), Shell (1990) e McDonald (1992) que encontraram um declínio de anticorpos maternos a níveis suficientemente reduzidos, na maioria dos filhotes, a partir de 42 a 56 dias de idade. Percebe-se um decréscimo gradativo no nível sérico de AN maternos nos filhotes em função do tempo/idade concordando com

Gillespie et al. (1958), Scott et al. (1970) e Winters (1981) que observaram uma queda gradativa da imunidade passiva no soro dos filhotes em função do tempo.

Nos filhotes da cadela 2 percebe-se uma menor variação na porcentagem de transferência, tendo como média 69,3% de transferência de imunidade passiva em relação ao título da mãe (Tabela 3). Ocorreu maior homogeneidade de transferência entre todos os filhotes da ninhada, em relação à cadela anterior. Com dois dias de vida todos estavam com títulos acima de 30 (1,5 log), exceto o F3. Quinze dias após o nascimento, todos os filhotes estavam abaixo do nível mínimo protetor, tornando-se susceptíveis à exposição natural e vacinação (Figuras 3A/3B 3). O F3 foi o que teve uma menor porcentagem de transferência, ou seja, de 24%. Treze dias após o seu nascimento constatou-se a sua morte. Provavelmente este filhote era o mais fraco da ninhada, explicando sua menor ingestão de colostro e conseqüentemente de anticorpos (Baker et al., 1959; Winters, 1981; MacDonald, 1992; Tizard, 1992). Ocorreu uma queda gradativa nos títulos AN específicos nos filhotes concordando com Gillespie et al. (1958), Scott et al. (1970) e Winters (1981).

Os filhotes da cadela 1 perderam seus títulos de anticorpos passivos contra CIC mais tardiamente do que os filhotes da cadela 2, refletindo que quanto maior o título da mãe, mais tardiamente seus filhotes irão perder a imunidade materna passivamente transferida, concordando com as observações encontradas por Gillespie et al. (1958), que demonstraram que filhotes que receberam títulos altos de suas mães, mostraram uma persistência deste título mais prolongada. Estas observações referem-se tanto para filhotes dentro de uma mesma ninhada quanto para filhotes de ninhadas diferentes.

Na cadela 3 percebem-se oscilações do nível sérico de AN durante todo período do experimento, entretanto sem diferenças significativas, variando de 256 a 700 (2,4 a 2,8 log) (Figuras 4A/4B). O título pré-parto da cadela não foi avaliado. Todos os filhotes apresentaram título de anticorpos passivos acima do nível seguramente protetor 100 (2,0 log) aos dois dias de vida (Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986). O filhote 1 (F1) apresentava título maior em relação aos outros da ninhada. Com 11 dias de vida, todos os filhotes apresentavam títulos abaixo de 100 (2,0 log), exceto o F1, entretanto, a maioria ainda estavam acima da faixa mínima protetora 30 (1,5 log) (Gillespie et al., 1958), indicando mais uma vez variação dentro da ninhada e diferenças entre os filhotes oriundos de uma mesma mãe com relação à perda da proteção



materna (Baker et al., 1959; Lewis et al., 1988b; Krakowka et al., 1985; Greene & Appel, 1990; McDonald, 1992). Com 25 dias de vida todos os filhotes apresentavam títulos de anticorpos passivos abaixo do nível mínimo protetor contra CIC, tornando-se susceptíveis à infecção e imunização ativa, discordando de Rude (1987) que registrou como proposta prática que em média os anticorpos maternos estão em níveis mínimos no soro dos filhotes com 63 dias de idade (2,1 meses). Percebe-se uma queda gradativa dos anticorpos passivos nos filhotes em função do tempo (Gillespie et al., 1958; Scott et al., 1970; Winters, 1981). Aos 52 dias de idade, todos os filhotes receberam a primeira dose da tríplice e parvovirose (vacina vírus vivo modificado). Nesta mesma data todos os filhotes possuíam títulos AN abaixo de 2 (0,3 log).

Quatorze dias após a dose inicial (66 dias de idade), somente o F4 teve seu título aumentado de 2 (0,3 log) para 11 (1,04 log) e com 28 dias após a dose inicial (80 dias de idade) este título elevou-se para 178 (2,25 log). Os filhotes 2, 5, 7 e 8 permaneceram com títulos menores que 2 (0,3 log). Os filhotes 1, 3 e 6 não foram acompanhados após a primeira dose. Todos os filhotes foram vacinados com vacina viva modificada oriunda do mesmo laboratório e partida, exceto o F4, sendo este vacinado com vacina oriunda de outro fabricante. Percebe-se diferença clara entre as duas vacinas utilizadas na capacidade de estimular o sistema imune, já que todos os animais estavam susceptíveis (títulos menores que 2; 0,3 log). Sabe-se que uma única dose com vacina viva é suficiente para produzir resposta satisfatória em animal susceptível. Entretanto, diferenças entre vacinas possivelmente ocorrem, e, desta maneira, fazem-se necessárias doses adicionais para maior segurança, quando não mais ocorre interferência de anticorpos maternos (Ott et al., 1957; Baker et al., 1959; Lewis et al., 1988b; Olson et al., 1988; Scott et al., 1970; Greene, 1990). Estes animais foram acompanhados somente até o período de 80 dias de idade.

As cadelas 8, 9, 11, 12, 14 tiveram uma manutenção dos títulos de AN contra CIC relativamente constante por todo período de observação (Figuras 1A/1B), coincidindo com outros autores que observaram que o nível sérico de anticorpos contra a CIC da mãe permanece constante durante o parto até a desmama (Gillespie et al., 1958; Winters, 1981). O título passivamente transferido para os filhotes das cadelas 8, 9, 11, 12, 14 foi decrescendo em função do tempo e idade estando de acordo com Gillespie et al., 1958; Scott et al., 1970 e Winters, 1981 (Figuras 5A/5B à 9A/9B). Estes títulos em todos os filhotes foram proporcionais aos níveis séricos das respectivas mães. Filhotes de mães que possuíam títulos mais altos perderam os anticorpos maternos transferidos passivamente

mais tardiamente (cadela 12) concordando com Gillespie et al. (1958). Os filhotes desta cadela tornaram-se susceptíveis entre 32 e 46 dias de vida discordando de Rude (1987) em que registrou como proposta prática que em média os anticorpos maternos estão em níveis mínimos no soro dos filhotes com 63 dias idade (2,1 meses). O F1 da cadela 12 não foi possível a determinação do título de AN com 5 dias de idade pois a amostra encontrava-se insuficiente.

Os filhotes das cadelas 8, 9, 11, 14, de uma maneira geral, tornaram-se susceptíveis entre 15 e 20 dias de idade (Figuras 5A/5B, 6A/6B, 7A/7B e 9A/9B), sendo observado que a idade com que os filhotes tornam-se susceptíveis é dependente do título de sua mãe. Filhotes que adquirem um maior título de AN maternos, os perdem mais tardiamente em relação aos outros; estas observações concordam com as de Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986; Greene, 1990; McDonald, 1992 e Tizard, 1996. Em todos os filhotes das cadelas 8, 9, 11, 12, 14 (Figuras 5A/5B a 9A/9B) foram observados títulos de AN variáveis até 9 dias de vida, demonstrando mais uma vez, variação dentro da mesma ninhada. Esta variação pode ser significativa o suficiente para que um filhote da mesma ninhada perca seus anticorpos maternos primeiramente do que outros da ninhada.

Os filhotes da cadela 8 (Figuras 5A/5B) foram imunizados ativamente aos 79 e 107 dias de vida recebendo a primeira e segunda doses, respectivamente. Foi utilizado vacina viva modificada proveniente do laboratório 1. Até imediatamente antes da segunda dose não havia resposta de anticorpos detectáveis pelo teste de soroneutralização. O F7 apresentou um aumento significativo de AN entre 60 e 80 dias de idade sendo atribuído a este, erro proveniente do ensaio utilizado, já que os níveis de AN retornaram a níveis idênticos aos anteriores e permaneceram neste nível até 107 dias de idade, período em que foi possível a observação. Ao primeiro contato com o antígeno vacinal todos os filhotes já estavam susceptíveis, exibindo títulos menores que 2 (0,3 log) desde 37 dias de vida. Segundo Lewis et al. (1988b), títulos de AN não podem ser estimulados nem pelo vírus virulento nem pelo atenuado a menos que o animal esteja susceptível que uma única dose de vacina viva já é capaz de estimular uma resposta imune em indivíduos susceptíveis, entretanto os achados nestes filhotes discordaram, sugerindo uma provável falha vacinal referente à vacina tais como: pouco material antigênico, atenuação excessiva, mal acondicionamento, inativação, ou fatores inerentes aos indivíduos tais como: fatores genéticos, desnutrição e provavelmente outros; como foi observado no caso da cadela 3.

As cadelas 7, 10, 13, 15, 16 (Figuras 10A/10B a 14A/14B) possuíam níveis séricos de anticorpos contra CIC muito baixos ou não detectáveis pela soroneutralização, portanto eram considerados menores que 2 (0,3 log). Estas cadelas passaram baixa ou não passaram imunidade para sua progênie, concordando com outros autores que preconizam que o título de anticorpos passivos transferidos depende do nível sérico da mãe (Gillespie et al, 1958; Baker et al, 1959; Gillespie, 1966; Krakowka et al., 1975; Krakowka et al., 1978; Greene, 1990; Shell, 1990; McDonald, 1992). Aqueles filhotes que receberam pequena quantidade de anticorpos maternos encontravam-se completamente susceptíveis muito precocemente (Figuras 10A/10B a 14A/14B). Todas as cadelas permaneceram com títulos baixos ou menores que 2 (0,3 log) por todo período de observação. Estas cadelas, provavelmente, receberam o esquema de três doses intercaladas de 30 dias ainda na fase de filhote, não sofrendo revacinações anuais nem estímulo ambiental. É importante lembrar que medir somente os anticorpos humorais não reflete a imunidade real do animal. Existem também outras formas de imunidade tais como, imunidade celular, interferon e sistema complemento. Entretanto, a presença de anticorpos humorais indicam um contato prévio com o agente (Ott et al., 1957; Baker et al., 1959; Lewis et al., 1988b; Olson et al. 1988; Scott et al., 1970; Greene, 1990).

Os filhotes da cadela 15 foram primovacinaos aos 65 dias de idade com vacina viva modificada tríplice e parvovirose oriundas do mesmo laboratório. De sete a nove dias após esta primeira dose, foi coletado sangue dos filhotes 1, 3, 4, 6, 8, 9; não foi observado nenhum aumento no título, permanecendo estes ainda muito baixos (Figuras 13A/13B). O filhote 8, uma semana após a primeira dose (72 dias de idade), apresentou gastroenterite hemorrágica e foi aplicado soro hiperimune contra parvovirose com título de 10240 DE50/ml. O sangue para titulação dos anticorpos específicos contra CIC foi coletado antes da aplicação do soro. Dois dias após, foi internado. Com 21 dias após a primeira dose (86 dias de idade), os títulos de AN destes filhotes foram medidos, tendo ocorrido um aumento bastante significativo destes títulos. Com aproximadamente 30 dias após a primeira dose, todos os filhotes (exceto F4) receberam a segunda dose da vacina. A coleta de soro foi novamente realizada imediatamente antes da aplicação da vacina e os títulos de anticorpos SN específicos foram novamente medidos. Todos os filhotes estavam com níveis séricos superiores a 100 (2,0 log), concordando com Ott et al. (1957), Baker et al. (1959), Lewis et al. (1988 a e b), Olson et al. (1988), Scott et al. (1970) e Greene (1990) que o título de AN só pode ser aumentado pelo vírus atenuado se o animal estiver susceptível. O F4 estava prostrado e apresentava quadro de diarreia,

não sendo vacinado com segunda dose de tríplice, entretanto seu título de AN contra CIC era o mais alto 1024 (3,01 log). Não houve interferência na resposta específica contra CIC naqueles animais que tomaram a primeira dose e adoeceram posteriormente.

Os filhotes 2 e 4 da cadela 16 (Figuras 14A/14B) foram vacinados inicialmente com 40 e 64 dias de idade, respectivamente, com vacinas do laboratório 3 e 4. Neste momento os filhotes apresentavam títulos de AN menores que 2 (0,3 log). Os outros filhotes não foi possível o acompanhamento. Trinta e seis dias e trinta dias após a primeira dose (76 dias e 94 dias de idade), os filhotes 2 e 4 receberam a segunda dose de vacina, respectivamente. Foi observado ligeiro aumento no nível sérico de AN no soro dos filhotes 2 e 4 aos 92 dias de vida. Com 106 dias de idade, o F2 apresentava título de anticorpos protetores, acima de 100 (2,0 log). Nesta mesma data, estava prostrado, desidratado e com gastroenterite hemorrágica. Foi internado e três dias após morreu. Este filhote foi acompanhado somente até esta data.

As cadelas de 4, 5 e 6 não seguiram o esquema normal no que se refere ao nível sérico de anticorpos contra CIC (Figuras 15A/15B a 17A/17B) discordando das observações encontradas por Gillespie et al (1958) e Winters (1981). Na cadela 4 (Figuras 15A/15B) percebe-se um aumento do título de AN de 53 (1,4 log) para 841 (2,9 log) 16 dias após o parto retornando para 256 (2,4 log) 27 dias após o parto, sugerindo um contato com o vírus virulento ou vacinal (Lewis et al, 1988 a e b; Krakowka et al., 1985; Appel, 1987; Greene, 1990). Outra hipótese a ser considerada seria erro experimental, entretanto, este título foi repetido duas vezes em triplicata e os resultados foram sempre elevados.

Na cadela 5 (Figuras 16A/16B) ocorreu um aumento gradativo e significativo no título de AN contra CIC de 53 (1,7 log) aos 2 dias após o parto, passando por 100 (2,0 log) aos 20 dias após o parto e alcançando 298 (2,47 log) 31 dias após o parto. Podemos inferir duas causas prováveis. A primeira é que o título dois dias após o parto diminuiu sensivelmente retornando, em seguida, aos valores do pré-parto. A segunda hipótese é que esta cadela estava em processo de imunização ativa, tendo seu título aumentado em função do tempo e estímulo (Krakowka et al., 1985; Appel, 1987; Lewis et al., 1988a; Lewis et al., 1988b; Greene, 1990), como o período de observação foi até 31 dias após o parto, esta cadela não foi mais observada.

Na cadela 6 (Figuras 17A/17B) o título de AN manteve-se constante e alto por todo período observado de acordo com Gillespie et al (1958) e Winters (1981). Com nove dias após o parto ocorreu queda significativa

no título de 1,0 log, refletindo provavelmente recente contato com o antígeno virulento ou vacinal, já que ocorre um decréscimo dos anticorpos séricos para neutralizar o agente (Baker et al., 1959; Lewis et al., 1988b; Krakowka et al., 1985; Greene & Appel, 1990; McDonald, 1992). Entretanto 14 dias após o parto, o nível sérico de AN contra a CIC nesta cadela, retornou aos níveis anteriores. A cadela também sofreu uma intervenção cirúrgica (cesariana) e foi separada de seus filhotes, o que poderia ter contribuído como fator de estresse para essa queda de imunidade (Povey, 1986; Gouveia et al., 1987; Lewis et al., 1988a e b; Olson et al., 1988; McDonald, 1992). Seus filhotes, devido à cesariana, não mamaram o colostro e foram alimentados por outra cadela que havia parido sete dias antes, não podendo ser calculado a porcentagem de transferência de anticorpos contra CIC. Dos cinco filhotes nascidos apenas sobreviveram dois dos quais apenas o F1 foi acompanhado sorologicamente, já que o F2 não apresentava amostra suficiente e nove dias após o nascimento morreu. O F1 apresentava título de AN de 75 (1,88 log) no dia do parto; entretanto 14 dias após, já se tornava susceptível apresentando título muito baixo (4; 0,6 log), concordando com Gillespie et al. (1958), Scott et al. (1970) e Winters (1981), que a proteção materna nos filhotes diminui em função do tempo/idade. Os filhotes das cadelas 4 e 5 seguiram o mesmo padrão com relação a perda da proteção passiva em função do tempo/idade (Figuras 15A/15B e 16A/16B).

Desta maneira, inferimos a importância de mamar o colostro até 48/72 horas de idade, refletindo na transferência adequada da proteção colostrada e proteção dos filhotes em uma fase precoce de vida até que seu sistema imune se desenvolva completamente para que possam responder aos estímulos naturais e artificiais satisfatoriamente. É claro que a interferência dos anticorpos maternos com a vacinação ocorre, o que é traduzido em um tipo de falha vacinal e que nenhum esquema de vacinação não vai conseguir atingir 100 % de sucesso, mas a proteção que os anticorpos maternos exercem na fase inicial de vida é indiscutível, para que o neonato possa estar protegido durante esta fase de alta susceptibilidade e tornar-se susceptível em idade mais avançada contribuindo para o deslocamento do período crítico para uma idade mais avançada, na qual o sistema imune já está completamente desenvolvido (Brambel, 1970; Povey, 1986; Gouveia et al., 1987; Lewis et al., 1988b; Olson et al., 1988; Greene, 1990; McDonald, 1992; Tizard, 1996).

Vale a pena destacar neste momento a conscientização do clínico frente a esta problemática e a sua postura a partir do conhecimento destes dados no que diz respeito ao esclarecimento dos proprietários e das possíveis estratégias de imunização, bem como da necessidade de

utilização da sorologia na determinação do momento da primovacinação ou mesmo na confirmação do desenvolvimento de uma resposta imune ativa satisfatória.

Tabela 1. Cadelas que participaram do experimento com suas respectivas crias.

Cadelas	Raça	Filhotes
1	Beagle	4
2	Beagle	4
3	Pointer	8
4	Beagle	3
5	Beagle	5
6	Beagle	2
7	Beagle	7
8	Weimaraner	9
9	Cocker Spaniel	5
10	Beagle	5
11	Cocker Spaniel	8
12	Daschound	2
13	Beagle	4
14	Poodle	5
15	Rottweiler	10
16	Rottweiler	6
Total		87

Tabela 2 - Título soroneutralizante 48/72 horas pré-parto e imunidade passiva contra CIC nos filhotes com 48/72 horas de vida.

Cadela	Título da cadela ¹		Título dos filhotes ²		Título médio por ninhada	
	Log	N	Log	N	Log	N
1	2,20	158	1,72	53	1,8	70
			2,18	150		
			1,72	53		
			1,34	22		
2	1,7	45	1,51	32	1,5	31
			1,65	45		
			1,04	11		
			1,57	37		
9	1,6	38	1,81	64	1,8	63
			1,28	19		
			1,72	53		
			1,95	89		
			1,95	89		
10	0,8	7	0,48	3	0,6	4
			0,70	5		
			0,60	4		
			0,30	2		
			0,85	7		
12	2,5	300	2,25	178	2,3	178
13	1,1	13	0,48	3	0,8	7
			0,85	7		
			0,70	5		
			1,04	11		
Título médio	1,64	94	1,29	41	1,47	59

¹ Título soroneutralizante 48/72 pré-parto, expresso em logaritmo (log), e como o inverso da diluição que contém a DE₅₀.

² Título soroneutralizante 48/72 horas de vida, expresso em logaritmo (log), e como o inverso da diluição que contém a DE₅₀.

Tabela 3. Porcentagem de transferência da imunidade passiva contra CIC da cadela para seus filhotes testados individualmente com 48/72 horas de idade.

Cadeira	F i l h o t e s										Mediana da ninhada	
	F1		F2		F3		F4		F5		Desvio padrão	% ²
Número	Título ¹	% ²										
1	158	33,6	150	95,0	53	34,0	22	14,0	NT	NT	53	34,0
2	45	71,0	45	100,0	11	24,0	37	82,0			35	77,0
9	38	168,0	19	50,0	53	139,0	89	234,0	89	234,0	64	168,0
10	7	43,0	5	71,0	4	57,0	2	29,0	7	100,0	4	57,0
12	300	NT	178	59,0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	178	59,0
13	13	23,0	7	54,0	5	38,0	11	85,0	NT	NT	6	46,0
											44	58%

NT- Não testado.

¹. Título 48/72 horas expresso como o inverso da diluição que contém a DE₅₀.

². Porcentagem de transferência = Título do filhote 48/72 horas de vida x 100 dividido pelo título da mãe no pré-parto.



Tabela 4. Títulos médios de anticorpos neutralizantes contra CIC em 16 ninhadas (87 filhotes) testadas quinzenalmente de dois até 60 dias de idade.

Ninhada	Quantidade de filhotes	Título ¹ médio dos filhotes / ninhada				
		Idade em dias				
		2	3 a 15	16 a 30	31 a 45	46 a 60
1	4	70	31	15	4	NT ²
2	4	31	10	3	NT	NT
3	8	196	48	11	2	1
4	3	NT	35	NT	NT	NT
5	5	66	NT	25	7	NT
6 ³	2	NT	NT	NT	NT	NT
7	7	NT	2	1	NT	NT
8	9	NT	37	18	2	2
9	5	63	17	13	NT	1
10	5	NT	3	1	1	1
11	8	162	NT	27	5	1
12	2	NT	178	66	38	8
13	4	7	6	2	NT	NT
14	5	56	34	12	3	NT
15	10	1	NT	1	2	1
16	6	NT	1	1	1	1
Susceptíveis/ Total testado		2/9	6/12	13/14	9/10	8/8
Mediana		63	24	11	3	1

¹ Expresso como o inverso da diluição que contém a DE₅₀.

² Não testado.

³ O F1 não mamou na mãe e o F2 morreu, não sendo, portanto, testados.

Figura 1A. Perfil sorológico das cadelas com título pré-parto conhecido (linhas contínuas) e pré-parto desconhecido (linhas descontínuas) medidos 48/72 horas pré-parto e após o parto e quizenalmente até 60 dias de idade contra CIC.

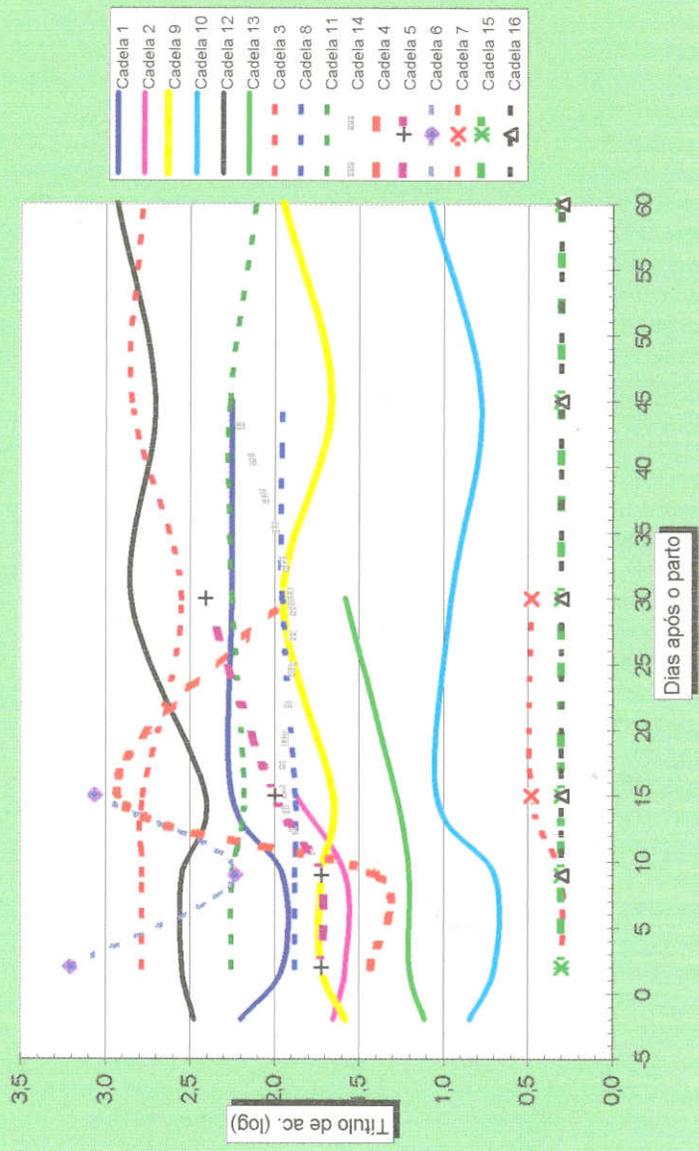


Figura 1B- Título de AN das cadelas apresentados no gráfico 1 expressos em logaritmo (log).

	Dias após o parto						
	-2	2	9	15	30	45	60
Cadela 1	2,2	1,9	1,9	2,3	2,3	2,3	
Cadela 2	1,7	1,6	1,6	1,9			
Cadela 9	1,6	1,7	1,7	1,7	1,9	1,7	1,9
Cadela 10	0,8	0,7	0,7	1,0	1,0	0,8	1,1
Cadela 12	2,5	2,6	2,6	2,4	2,9	2,7	2,9
Cadela 13	1,1	1,2	1,2	1,3	1,6		
Cadela 3		2,8	2,8	2,8	2,6	2,8	2,8
Cadela 8		1,9	1,9	1,9	2,0	1,9	
Cadela 11		2,3	2,3	2,2	2,3	2,3	2,1
Cadela 14		1,7	1,7	1,9	1,9	2,3	
Cadela 4		1,4	1,4	2,9	2,0		
Cadela 5		1,7	1,7	2,0	2,4		
Cadela 6		3,2	2,2	3,1			
Cadela 7		0,3	0,3	0,5	0,5		
Cadela 15		0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Cadela 16			0,3	0,3	0,3	0,3	0,3

Figura 2A. Perfil sorológico da cadela 1 e de seus filhotes.

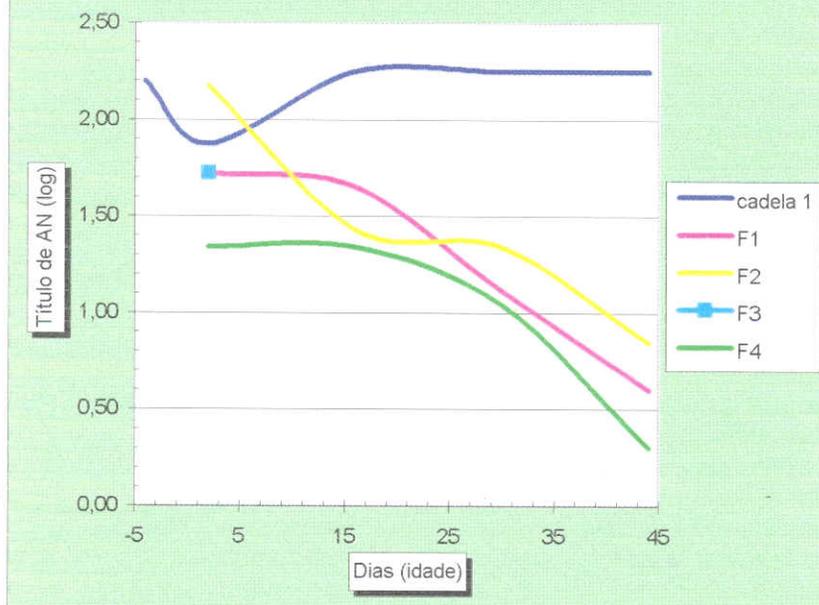


Figura 2B. Títulos de AN apresentados na Figura 2 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.	4a.
Dias/animal	-4	2	16	30	44
cadela 1	2,20	1,88	2,25	2,25	2,25
F1		1,72	1,65	1,11	0,60
F2		2,18	1,43	1,34	0,85
F3		1,72			
F4		1,34	1,34	1,04	0,30

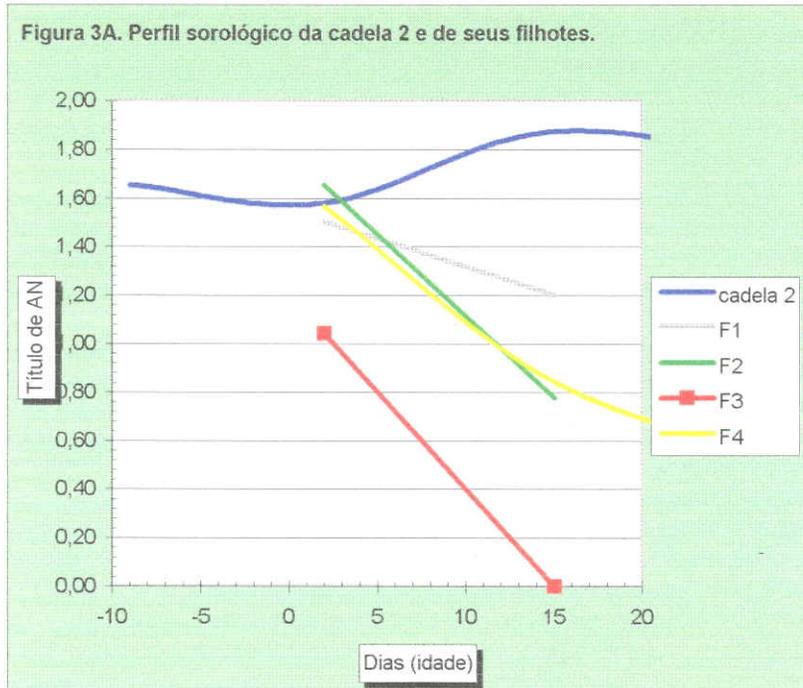


Figura 3B. Títulos de AN apresentados na Figura 3 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	-9	2	15	30
cadela 2	1,65	1,58	1,88	1,72
F1		1,51	1,20	
F2		1,65	0,78	
F3		1,04	óbito	
F4		1,57	0,85	0,48

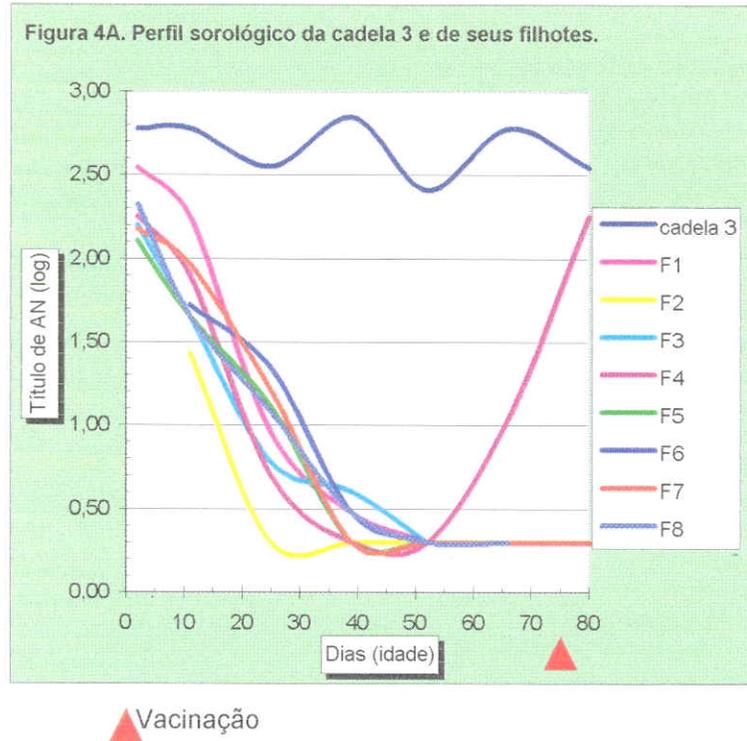


Figura 4B. Títulos de AN apresentados na Figura 4 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.
Dias/animal	2	11	25	39	52	66
cadela 3	2,78	2,78	2,55	2,85	2,41	2,78
F1	2,54	2,25	0,95	0,48	0,30	
F2		1,43	0,30	0,30	0,30	0,30
F3	2,20	1,65	0,78	0,60	0,30	
F4	2,25	1,90	0,70	0,30	0,30	1,04
F5	2,11	1,65	1,11	0,30	0,30	0,30
F6		1,72	1,34	0,48	0,30	
F7	2,18	1,96	1,20	0,30	0,30	0,30
F8	2,32	1,65	1,08	0,48	0,30	0,30

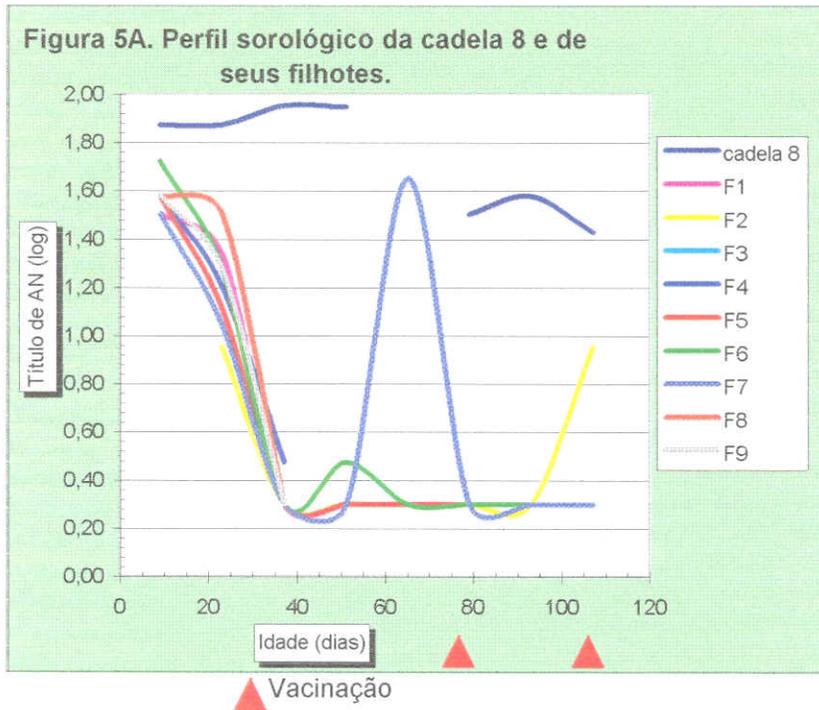


Figura 5B. Títulos de AN apresentados na Figura 5 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.
Dias/animal	9	23	37	51	65	79	93	107
cadela 8	1,88	1,88	1,95	1,95		1,51	1,58	1,43
F1	1,51	1,34	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
F2		0,95	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,95
F3	1,43							
F4	1,58	1,20	0,48					
F5	1,58	1,11	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
F6	1,72	1,28	0,30	0,48	0,30	0,30	0,30	0,30
F7	1,51	1,04	0,30	0,30	1,65	0,30	0,30	0,30
F8	1,58	1,51	0,30					
F9	1,58	1,28	0,30					

Figura 6A. Perfil sorológico da cadela 9 e de seus filhotes.

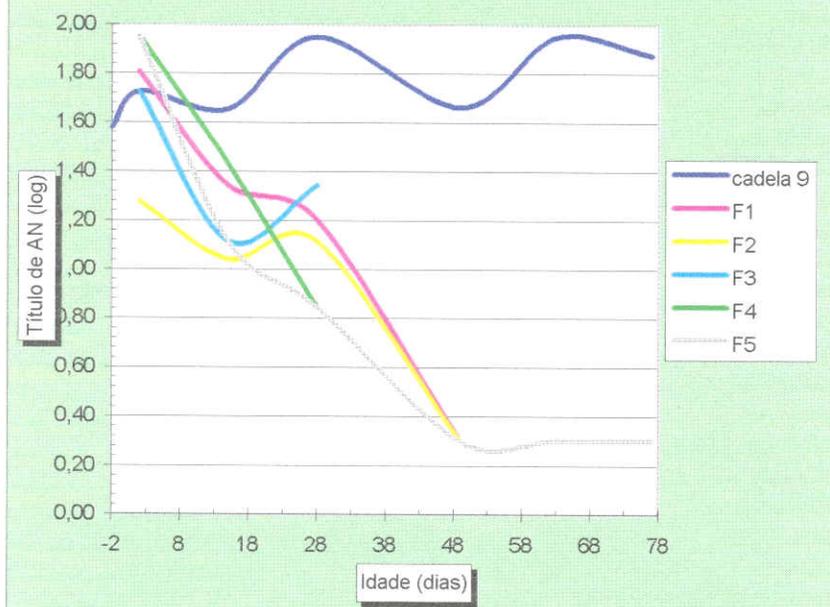


Figura 6B. Títulos de AN apresentados na Figura 6 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.
Dias/animal	-2	2	15	28	49	63	77
cadela 9	1,58	1,72	1,65	1,95	1,66	1,95	1,88
F1		1,81	1,34	1,20	0,30		
F2		1,28	1,04	1,11	0,30		
F3		1,72	1,11	1,34			
F4		1,95	1,43	0,85			
F5		1,95	1,11	0,85	0,30	0,30	0,30

Figura 7A. Perfil sorológico da cadela 11 e de seus filhotes.

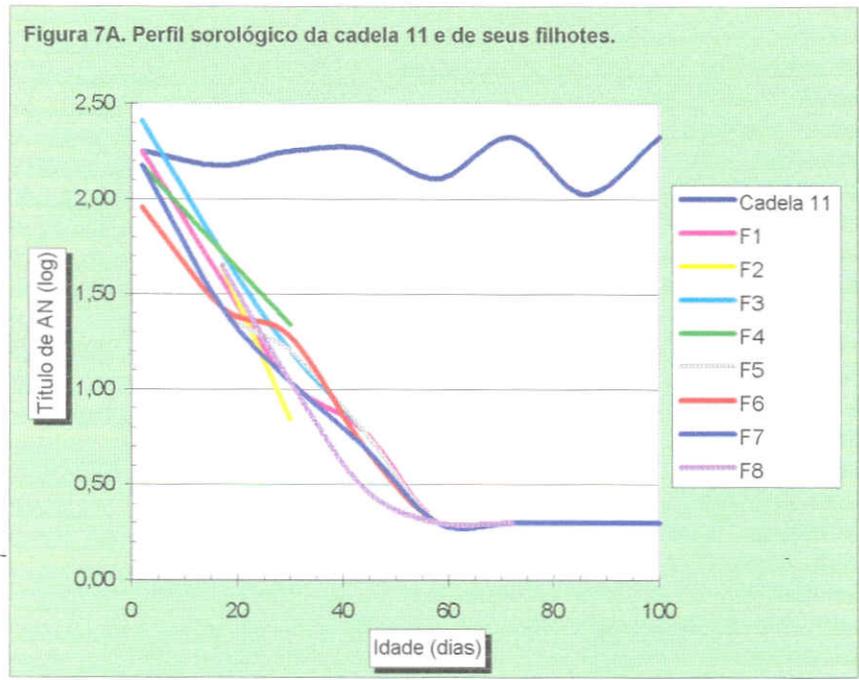


Figura 7B. Títulos de AN apresentados na Figura 7 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.
Dias/animal	2	17	30	44	58	72	86	100
Cadeira 11	2,25	2,18	2,25	2,26	2,11	2,32	2,03	2,32
F1	2,25	1,58	1,04	0,78	0,30	0,30	0,30	0,30
F2		1,65	0,85					
F3	2,41	1,72	1,20	0,78	0,30	0,30	0,30	
F4	2,18	1,72	1,34					
F5	2,18	1,43	1,20	0,78	0,30	0,30		
F6	1,95	1,43	1,28	0,70	0,30	0,30	0,30	
F7	2,18	1,43	1,04	0,70	0,30	0,30	0,30	0,30
F8		1,65	1,04	0,48	0,30	0,30		

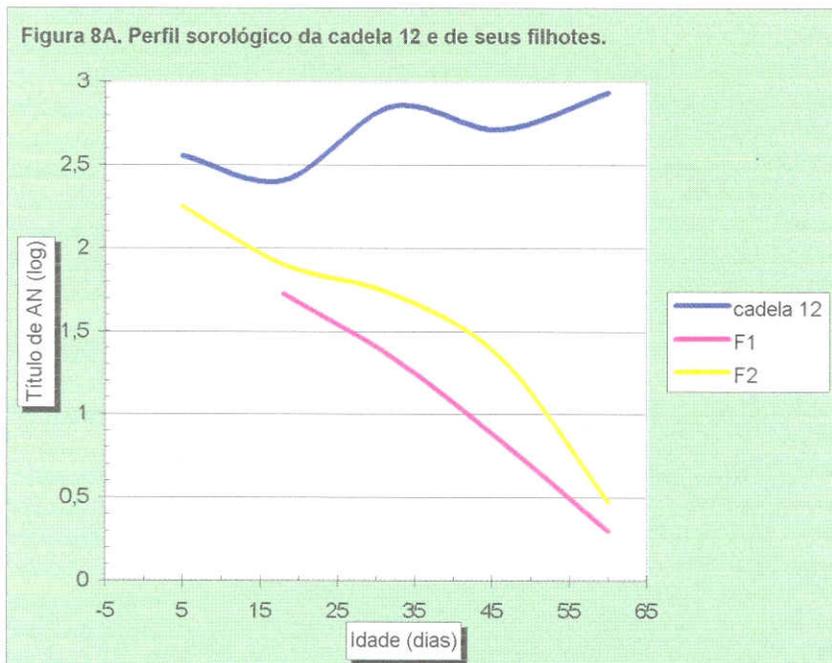


Figura 8B. Títulos de AN apresentados na Figura 8 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.
Dias/animal	-5	5	18	32	46	60
cadela 12		2,55	2,41	2,85	2,71	2,93
F1			1,72	1,34	0,85	0,30
F2		2,25	1,90	1,72	1,34	0,48

Figura 9A. Perfil sorológico da cadela 14 e de seus filhotes.

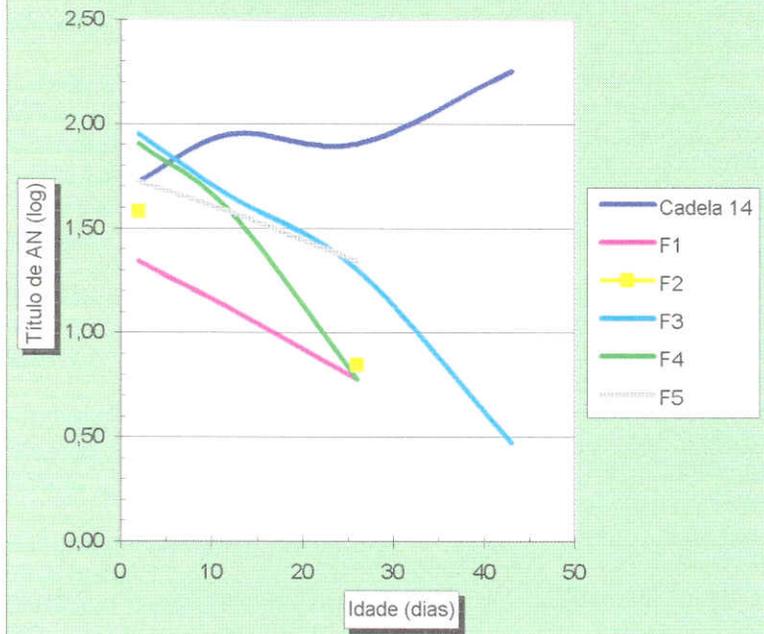


Figura 9B. Títulos de AN apresentados na Figura 9 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.
Dias/animal	2	12	26	43
Cadela 14	1,72	1,95	1,90	2,25
F1	1,34	1,11	0,78	
F2	1,58		0,85	
F3	1,95	1,65	1,30	0,48
F4	1,90	1,58	0,78	
F5	1,72	1,58	1,34	

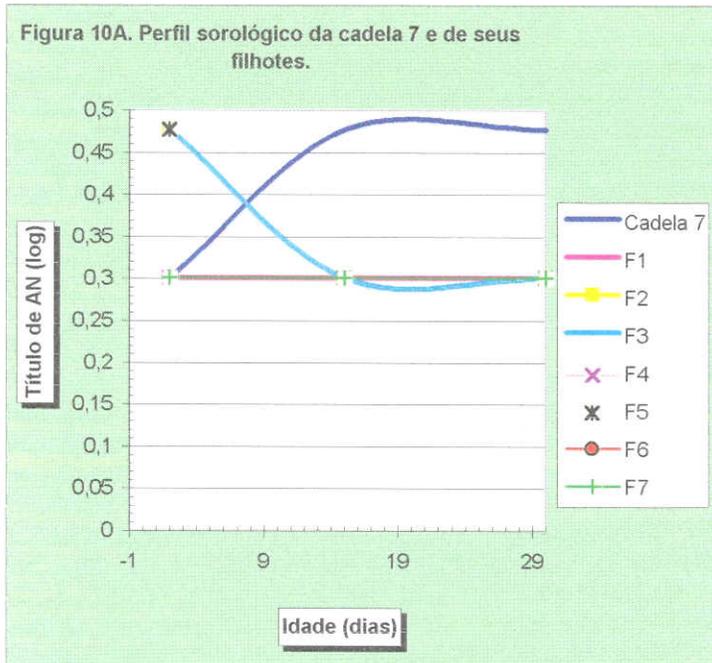


Figura 10B. Títulos de AN apresentados na Figura 10 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	-1	2	15	30
Cadela 7		0,30	0,48	0,48
F1		0,30	0,30	0,30
F2		0,48	0,30	0,30
F3		0,48	0,30	0,30
F4		0,30	0,30	0,30
F5		0,48	0,30	0,30
F6		0,30	0,30	
F7		0,30	0,30	0,30

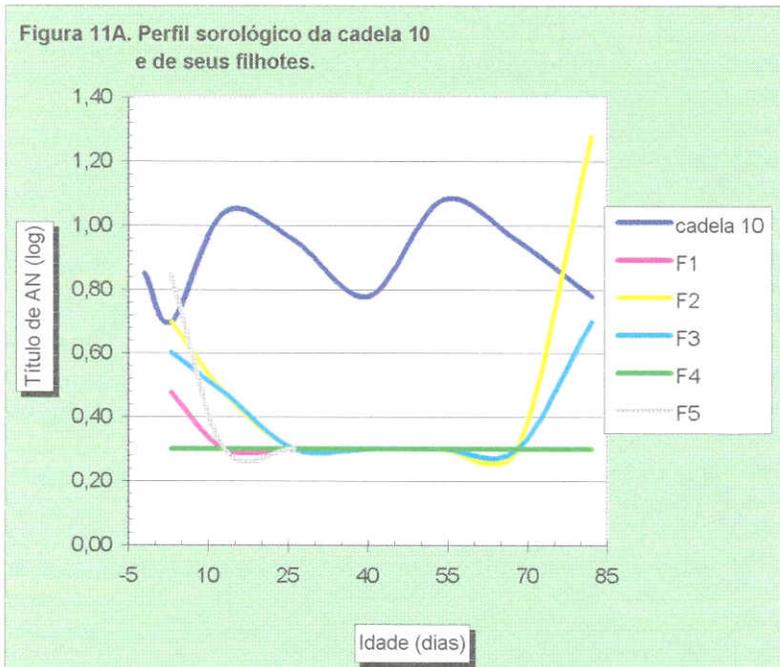


Figura 11B. Títulos de AN apresentados na Figura 11 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.
Dias/animal	-2	3	13	26	40	54	68	82
cadela 10	0,85	0,70	1,04	0,95	0,78	1,08	0,95	0,78
F1		0,48	0,30	0,30				
F2		0,70	0,48	0,30	0,30	0,30	0,30	1,28
F3		0,60	0,48	0,30	0,30	0,30	0,30	0,70
F4		0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30
F5		0,85	0,30	0,30				

Figura 12A. Perfil sorológico da cadela 13 e de seus filhotes.

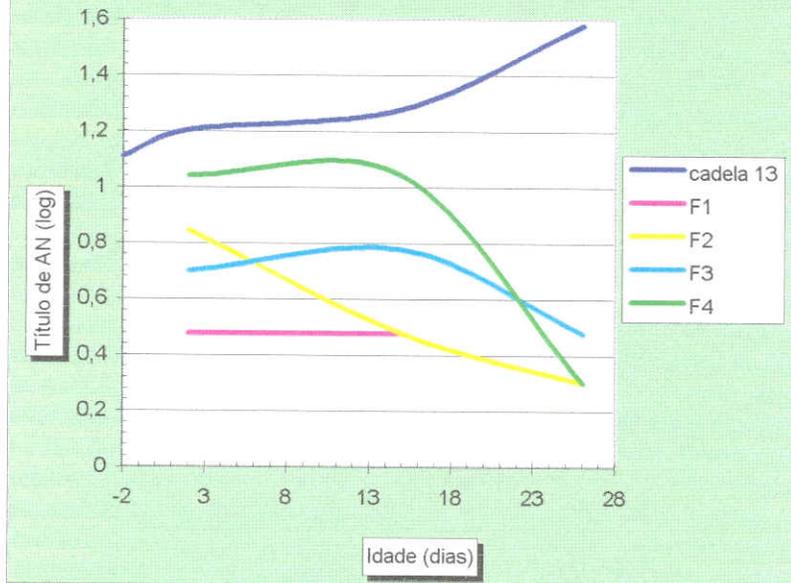
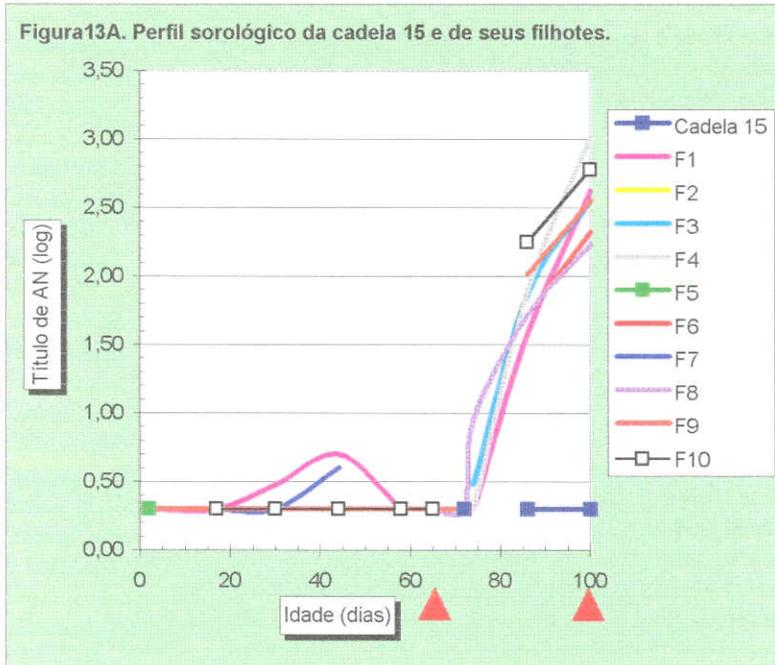


Figura 12B. Títulos de AN apresentados na Figura 12 expressos em log.

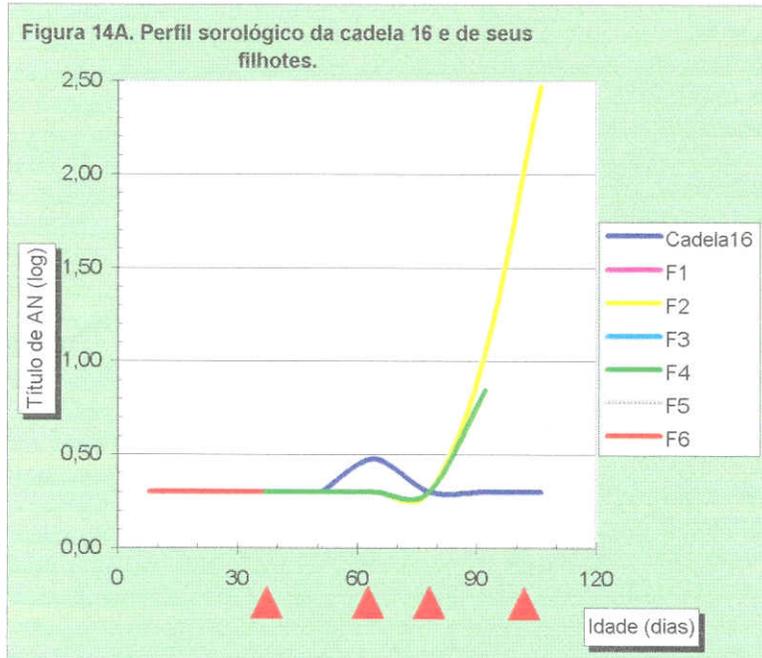
Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	-2	2	15	26
cadela 13	1,11	1,20	1,28	1,58
F1		0,48	0,48	
F2		0,85	0,48	0,30
F3		0,70	0,78	0,48
F4		1,04	1,04	0,30



▲ Vacinação

Figura 13B. Títulos de AN apresentados na Figura 13 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	7a.	8a.	9a.
Dias/animal	2	17	30	44	58	65	72	74	86	100
Cadela 15	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30		0,30		0,30	0,30
F1	0,30	0,30	0,48	0,70	0,30			0,30	1,58	2,63
F2	0,30									
F3	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30		0,48	1,87	2,55
F4	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30			0,30	1,89	3,01
F5	0,30									
F6	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30		1,72	2,32
F7	0,30	0,30	0,30	0,60						
F8	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,95	1,72	2,24
F9	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30		2,02	2,55
F10		0,30	0,30	0,30	0,30	0,30			2,25	2,77



▲ Vacinação

Figura 14B. Títulos de AN apresentados na Figura 14 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.
Dias/animal	8	22	36	51	64	78	92	106
Cadeira16	0,30	0,30		0,30	0,48	0,30	0,30	0,30
F1	0,30	0,30	0,30					
F2		0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	1,04	2,47
F3	0,30	0,30	0,30					
F4	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,85	
F5	0,30	0,30	0,30					
F6	0,30	0,30	0,30					

Figura 15A. Perfil sorológico da cadela 4 e de seus filhotes.

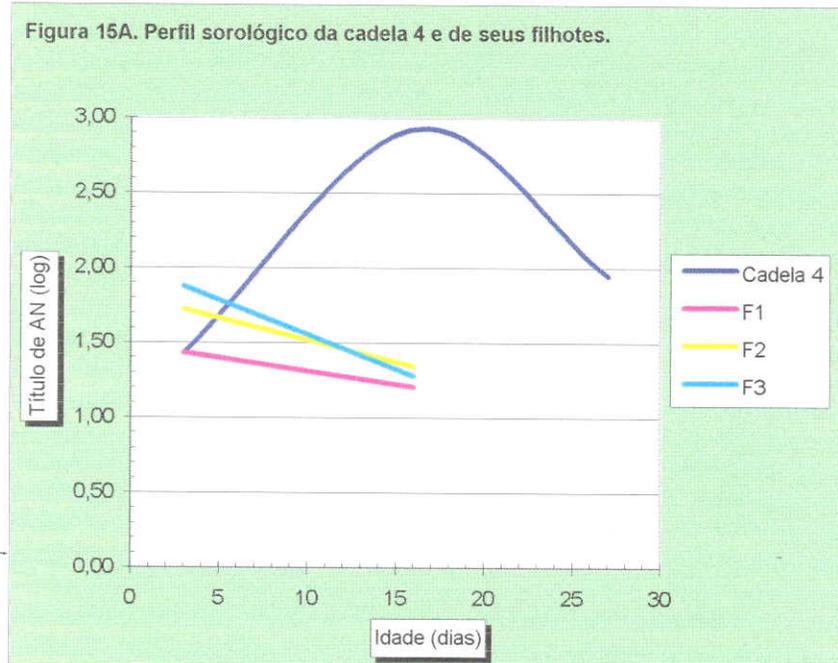


Figura 15B. Títulos de AN apresentados na Figura 15 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	3	16	27
Cadela 4	1,43	2,92	1,95
F1	1,43	1,20	
F2	1,72	1,34	
F3	1,88	1,28	

Figura 16A. Perfil sorológico da cadela 5 e de seus filhotes.

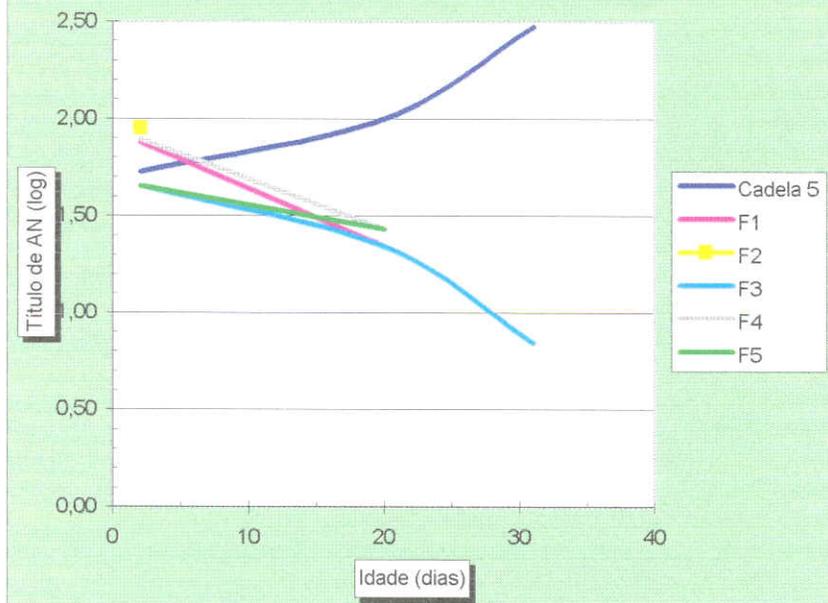


Figura 16B. Títulos de AN apresentados na Figura 16 expressos em log.

Coleta	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	2	20	31
Cadela 5	1,72	2,00	2,47
F1	1,88	1,34	
F2	1,95		
F3	1,65	1,34	0,85
F4	1,89	1,43	
F5	1,65	1,43	

Figura 17A. Perfil sorológico da cadela 6 e de seus filhotes.

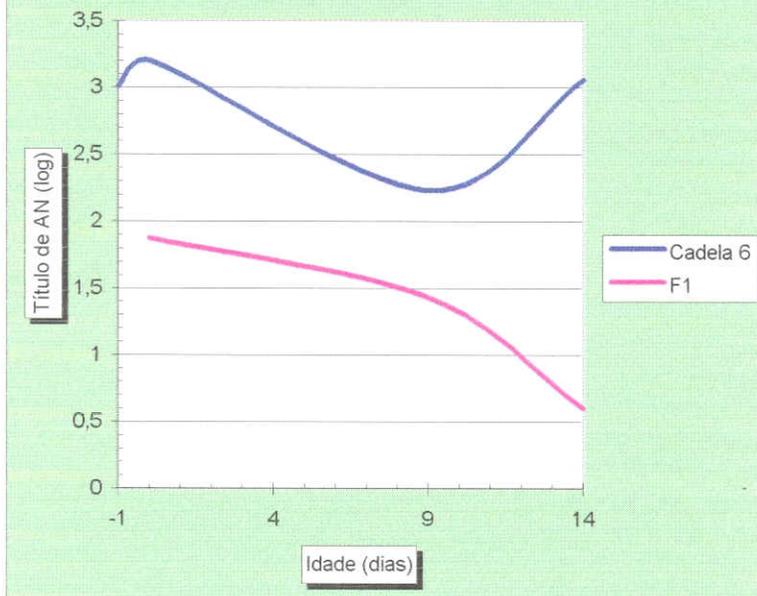


Figura 17B. Títulos de AN apresentados na Figura 17 expressos em log.

Coleta	Pré-parto	1a.	2a.	3a.
Dias/animal	-1	0	9	14
Cadela 6	3,01	3,20	2,23	3,06
F1		1,88	1,43	0,60

5 CONCLUSÃO

1. O nível sérico de anticorpos neutralizantes contra CIC nos filhotes é diretamente proporcional ao título de suas mães e decresce proporcionalmente em relação ao aumento da idade.
2. Ocorre grande variação na transferência de anticorpos intra e inter-ninhada, não sendo adequado simplesmente, através do título da mãe inferir qual a melhor época de vacinação do filhote.
3. A porcentagem de transferência de anticorpos passivos (título de anticorpos da cadela no pré-parto/mediana do título dos filhotes 48/72 horas de idade x 100) foi de 58%.
4. A maioria dos filhotes testados (93%) apresentaram títulos sorológicos não protetores contra CIC (menores ou iguais a 30 ou 1,5 log) a partir de 16 dias de idade.

Summary

The current study evaluated the transference and duration of maternal antibodies against canine distemper (CDV) in dams and their progeny using the soroneutralization test. Experiment was carried out with 16 bitches of different breeds and their respective offsprings. Serum samples were collected 48 and 72 hours before parturition, 48 hours afterwards and every two weeks until the end of the experiment. In puppies, serum sample were obtained 48 hours after birth and every two weeks until eight collects. Neutralization antibodies were detected with serum-neutralization test in cell culture in microtitration plates. Titers were expressed as inverse serum dilution either as \log_{10} which protected 50% of the cell cultures against infection with 100 TCID₅₀ "Onderstepoort" strain.

The SN titer against CDV in the majority of dams remained fairly constant for the observation period. An increasing of the level of neutralizing antibodies against CDV was observed in two dams 16 and 20 days after parturition; this fact could be due a possible contact with either the virus or vaccine antigen. The SN titers of the dams which were not annually vaccinated were always less than 2 (0,3 log), and consequently their offsprings not acquired adequately passive maternal antibodies. The percentage of maternal immunity transmission for 16 litters from dams varied from 34,0 to 168,0%, with an average of 58%. Great variation was observed in the same litter. Puppies from dam with high SN titers against CDV, remained higher titers than those from dam with lower SN titers. A constant and gradual decreasing of seric level of maternal antibodies in the puppies occurred with time increasing, reaching fairly very low levels from 16 days of age.



6 Referências Bibliográficas

- ALVES, P.A.B. **Perfil epidemiológico da população canina atendida em hospitais veterinários de Belo Horizonte - MG, 1987 a 1994.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1996. 130p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- APPEL, M. Canine distemper. In: _____. **Virus infectious of vertebrates.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1987, 133-159 p.
- APPEL, M.; ROBSON, D.S. A microneutralization test for canine distemper virus. **American Journal Veterinary Research**, v.37, n.11, p.1459-1463, 1973.
- BAKER, J.A.; ROBSON, O.S.; GILLESPIE, J.H. et al. A nomograph that predicts the age to vaccinate puppies against distemper. **Cornell Veterinary**, v.49, n.2, p.158-167, 1959.
- BRAMBELL, F.W.R. Título do cap. In: _____. **The transmission of passive immunity from mother to young.** Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1970, p.142-165.
- GILLESPIE, J.H. The significance of passive immunity and the biological tests used in the study of distemper. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.149, n.5, p.623-628, 1966.
- GILLESPIE, J.H.; BAKER, J.A.; BURGHER, J. et al. The immune response of dogs to distemper virus. **Cornell Veterinary**, v.48, p.103-126, 1958.
- 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, n.4, p. 539-545, 1987.

- GREENE, C.E. Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.S. Company, 1990, 21-53p.
- GREENE, C.E.; APPEL, M.J. Canine distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.S. Company, 1990, 226-241p.
- JACOBY, R.O. et al. Development of immunity in fetal dogs: humoral responses. **American Journal Veterinary Research**, v.30, n.9, p.1503-1510, 1969.
- KRAKOWKA, S.; AXTHELM, N.K.; JOHNSON, G.C. Canine distemper virus. In: RICHARD, G.O.; KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, Jr. **Comparative pathobiology of viral diseases**. Florida: CRC Press, Inc., 1985, 137-164 p.
- KRAKOWKA, S.; DAVID, L.; KOESTNER, A. Influence of transplacentally acquired antibody on neonatal susceptibility to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v.137, n.5, p.605-608, 1978.
- KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.; CONFER, A. et al. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v.132, n.4, p.384-392, 1975.
- LEWIS, D.C.; DHEIN, C.R.; EVERMANN, J.F. Current concepts in vaccination programs for dogs, cats and ferrets, part 1. **Companion Animal Practice**, v.2, n^o.11, p. 3-8, 1988a.
- LEWIS, D.C.; DHEIN, C.R.; EVERMANN, J.F. Current concepts in vaccination programs for dogs, cats and ferrets, part 2. **Companion Animal Practice**, v.2, n.12, p. 21-29, 1988b.
- McDONALD, L.J. Factors that can determine the success of routine vaccination protocols **Veterinary Medicine**, v. 87, n.2, p. 223-230, 1992.
- NOON, K.F. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **American Journal Veterinary Research**, v.41, n.4, p. 605-609, 1980.

- OLSON, P.; KLINGEBORN, B.; HEDHAMMAR, A. Serum antibody response to canine parvovirus, canine adenovirus-1, and canine distemper virus in dogs with known status of immunization: study of dogs in Sweden. **American Journal Veterinary Research**, v.49, n.9, p. 1460-1466, 1988.
- OTT, R. L.; GORHAN, J.R.; GUTIERREZ, J.C. Distemper in dogs. II. The response to vaccination. **American Journal Veterinary Research**, v.18, n.67, p. 375-381, 1957.
- OTT, R.L. Introduction to the symposium on canine distemper immunization. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.149, n.5, p.607-609, 1966.
- POVEY, R.C. Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. **Canine Veterinary Journal**, v.27, n. 9, p.321-323, 1986.
- REED, L.J., MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v.27, n.3, p. 493-497, 1938.
- RIBEIRO, V.M. **Perfil nosológico e algumas características de cães atendidos em clínicas veterinárias de Belo Horizonte, 1985/86.** Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 1988. 56p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva).
- ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. Serologic techniques. In: ____. **A manual of basic virological techniques.** New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1973, p. 94-98.
- RUDE, T.A. Canine distemper virus: infection and prevention. **Canine Practice**, v.114, n.3, p. 16-24, 1987.
- SCOTT, F.W.; CZISA, C.K.; GILLESPIE, J.H. Maternally derived immunity to feline panleukopenia. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.156, n.4, p.439-453, 1970.
- SHELL, L.G. Canine distemper. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.12, n.2, p. 173-179, 1990.

TIZARD, I. Immunity in the fetus and newborn. In:____. **Veterinary immunology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 5 ed., 1996, p. 239-243.

WINTERS, W. D. Time dependent decreases of maternal canine virus antibodies in newborn pups. **Veterinary Record**, v.108, n.4, p.295-299, 1981.

UFMG - ESCOLA DE VETERINÁRIA - BIBLIOTECA

Doação de Col. curso Pós-Grad

AV. UFMG Preço 5700

Data 28/01/97