

T636-083 63
R335p
1398

1

Magda Regina

Produção de antígenos virais para a detecção de anticorpos contra o vírus da cinomose canina

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária.
Área: Medicina Veterinária Preventiva.
Orientador: Prof^a Aurora Maria
Guimarães Gouveia

U.F.M.G. - BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA



05/02/03/04/06

NÃO DANIFIQUE ESTA ETIQUETA

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
1998

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

16/04/99

144399-02

0262 - 93560

R 335p Regina, Magda, 1966 -

Produção de antígenos virais para detecção de anticorpos contra o vírus da cinomose / Magda Regina. - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1998.

000p : il.

Dissertação (mestrado)

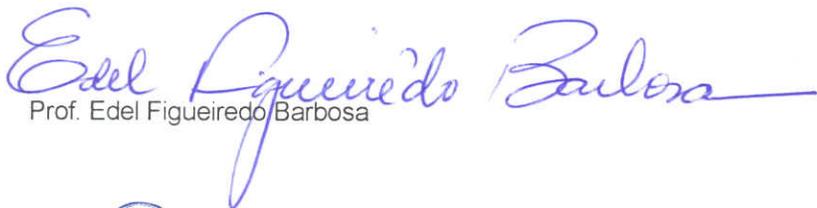
1 Cão - Doenças - Teses. 2. Cinomose - Teses
3. Antígenos - Teses. I. Título.

CDD - 636 708 96

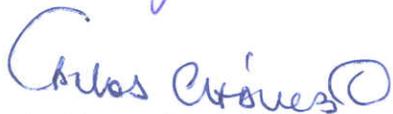
Dissertação defendida e aprovada em 29/09/98 pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Aurora Maria Guimarães Gouveia
(orientadora)



Prof. Edel Figueiredo Barbosa



Dr. Carlos Chaves Orlotegue



Prof. Maurílio Rocha



Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Aos meus pais, Antonio e Edméia,
aos meus irmãos Luis Otávio, Maria
Alice, Magali, e a minha cadela Loa,
companheira desta e muitas
jornadas.

AGRADECIMENTOS

À Prof^ª. Aurora Maria Guimarães Gouveia pela orientação e compreensão.

À Prof^ª Zélia Inês Portela Lobato pelo auxílio na orientação.

A Edel Figueiredo pela carinhosa atenção e co-orientação nesse trabalho.

Ao Dr. Carlos Chaves Orlotegue por me ensinar os primeiros passos na técnica do ELISAI.

Ao Dr. Sérgio Luis de Freitas Balsamão pelo auxílio com o vírus.

Aos funcionários do laboratório de virologia pela assistência e estímulos.

À Nádia pela ajuda, paciência e energia dedicadas também ao processo de digitação da tese.

À todos os funcionários envolvidos direta ou indiretamente com esta dissertação.

Ao colega Rizaldo pelo prestimoso auxílio na elaboração estética deste trabalho

Às amigas Andréa, Regina e Áurea, pela presença, apoio e carinho nas fases mais difíceis.

A todos colegas do mestrado e doutorado com quem tive contato.

À toda minha família pelo carinho.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho, a autora agradece sinceramente.



SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Amostras	23
3.2	Cultivo de células de rim de macaco verde (Vero)	23
3.3	Produção antigênica do vírus da CIC para o ELISAI-Vero	23
3.4	Cultivo primário de células fibroblásticas de embrião de galinha (FEG)	24
3.5	Cultivo do vírus da cinomose canina (CIC) utilizado para os testes de soroneutralização (SN) e produção da suspensão viral em FEG.	24
3.6	Teste de SN	25
3.7	Produção da suspensão do vírus da CIC em FEG	25
3.8	Produção do antígeno viral semi-purificado para o ELISAI-FEG	26
3.9	Dosagem protéica	27
3.10	Eletroforese em gel poliacrilamida (SDS-PAGE)	27
3.11	Titulação do vírus da CIC	28
3.12	Padronização do ELISAI	28
3.13	ELISAI-FEG	30
3.14	ELISA-Vero	31
3.15	Análise dos resultados	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5	CONCLUSÕES	45
6	SUMMARY	47
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Resultados do pré-teste para o inóculo em FEG	34
Tabela 2	Resultados da dosagem protéica dos antígenos positivos e negativos pelo método de Lowry.	35
Tabela 3	Teste Qui-Quadrado aplicado aos resultados do ELISAI frente ao teste padrão de SN	41
Tabela 4	Soros utilizados no experimento com seus respectivos títulos na SN e absorbância no ELISAI-FEG (DO 492nm)	42
Tabela 5	Soros utilizados no experimento com seus respectivos títulos na SN e absorbância no ELISAI-Vero (DO 492nm)	43
Figura 1	Microscopia eletrônica do vírus da cinomose	16
Figura 2	Monocamada de FEG após quatro dias de inoculação do vírus da cinomose	34
Figura 3	Eletroforese em minigel de poliacrilamida (SDS_PAGE)	36
Figura 4	Resultados da titulação em bloco do ELISAI-FEG	38
Figura 5	Resultados da titulação em bloco do ELISAI-Vero	38
Figura 6	Distribuição dos soros positivos e negativos no ELISAI	44

RESUMO

O antígeno do vírus da cinomose canina (CIC) foi produzido em dois tipos de cultivos celulares, células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) e células de rim de macaco verde (Vero). Esses antígenos foram utilizados para ensaio do teste de ELISA indireto (ELISAI), detectando anticorpos sorológicos de cães. Os oitenta e um soros testados frente ao antígeno produzido em FEG e os sessenta testados frente ao antígeno produzido em Vero foram previamente analisados pela soroneutralização (SN). Neste trabalho são apresentados e discutidos os procedimentos para a produção do antígeno viral e os resultados obtidos em sua utilização nos dois sistemas de ELISAI desenvolvidos.

1 INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CIC) é uma doença altamente contagiosa causada por um morbilivírus, podendo acometer membros das Famílias Canidae, Mustelidae e Procyonidae. O vírus da CIC produz doença natural no cão, caracterizada por um período de incubação de três a seis dias, envolvendo febre, secreção nasal e ocular, distúrbios intestinais e pulmonares. Comumente ocorrem sintomas no sistema nervoso central (SNC) durante a fase aguda da doença ou, após três a quatro semanas de evolução clínica. Em alguns casos a infecção do SNC pode aparecer sem sinais prévios de doença ou após o período de recuperação das manifestações sistêmicas. Durante muito tempo foi uma das maiores causas de doenças neurológicas em cães, porém, a partir da vacinação sistemática, houve grande redução na sua incidência; contudo a frequência da doença entre animais previamente imunizados ainda é significativa. Dentre os diversos fatores de falhas vacinais, os inerentes à vacinação poderiam ser evitados através do conhecimento dos níveis de anticorpos passivos que possuem efeito neutralizante sobre a vacina, estabelecendo-se um programa de imunização mais adequado.

A determinação do perfil sorológico de filhotes, permite avaliar o momento certo da primovacinação. Como a ingestão de colostro é variável para cada filhote, os títulos de anticorpos também irão diferir, existindo dessa forma, uma época individual mais apropriada para iniciar o esquema vacinal. A alta prevalência da doença na população canina torna necessária a vacinação sistemática e portanto, a sorologia no diagnóstico da CIC é limitada, já que títulos de anticorpos no soro de um animal, mesmo com sintomatologia clínica compatível, poderiam indicar contato prévio com o vírus ou a presença de anticorpos vacinais. Títulos aumentados de IgM podem ser detectados no soro de cães que se recuperam da fase aguda da doença. Em cães vacinados ou não, altos níveis de IgG podem ser encontrados em infecção recente, passada ou presente, o mesmo podendo ocorrer após vacinação. O uso da sorologia pareada, associada à presença da sintomatologia, pode auxiliar no diagnóstico clínico, sendo portanto essencial um exame sorológico com boa sensibilidade e especificidade, que seja de baixo custo, simples e rápido. O teste sorológico seria ainda indicado para titulação de soros hiperimunes contra a CIC, e para avaliar o estado imunológico de cães

pertencentes a canis, detectando animais com títulos baixos, dentre eles, cadelas na época de cobrição, para que possam receber a vacina em tempo hábil atingindo títulos protetores.

O vírus da CIC tem sido propagado em diferentes sistemas de cultura, incluindo células de aves, mustelídeos, cães, humanos, felinos e primatas. O efeito citopático característico (ECP) é a formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) e lise celular, porém em alguns sistemas como as células de fibroblasto de embrião de galinha o ECP pode ser menos evidente.

O teste de soroneutralização é altamente sensível e específico sendo, entretanto, de custo superior, pela necessidade do uso de cultivos celulares e os resultados são mais demorados, limitando seu uso na rotina. O teste imunoenzimático (ELISA) é reconhecido como um bom método de pesquisa para várias classes de anticorpos contra antígenos conhecidos, sendo rápido, sensível e específico quando bem padronizado.

O presente trabalho objetivou a produção de antígenos virais para o uso em ensaios com ELISA indireto, visando a detecção de anticorpos sorológicos de cães contra o vírus da CIC. Testou-se duas metodologias de produção do antígeno: o vírus cultivado em células de fibroblasto de embrião de galinha e em células Vero. A sensibilidade e especificidade, de cada teste, foi avaliada frente ao teste de soroneutralização (SN).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Agente etiológico

O vírus da CIC é membro da Família Paramyxoviridae, Sub-Família Paramyxovirinae, Gênero Morbilibivirus, onde encontram-se também, o vírus do sarampo, morbilibivirus dos golfinhos, cinomose das focas, peste bovina, peste de pequenos ruminantes, conforme a classificação feita em 1993 pelo International Committee on the Taxonomy of Viruses (Lamb & Kolakofsky, 1996).

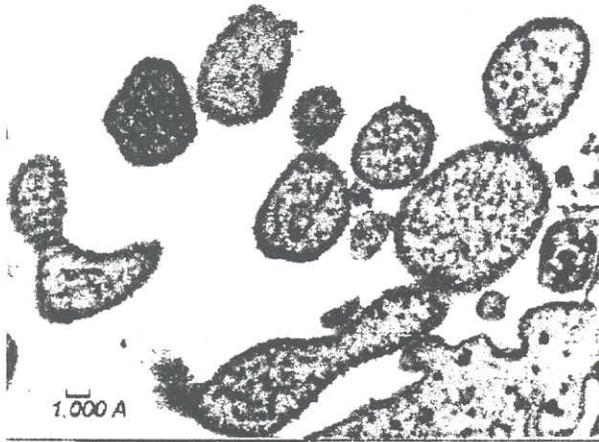
A natureza contagiosa da CIC já era conhecida desde meados do século XIX, porém Carré (1905) considerou-a como enfermidade causada por um vírus, posteriormente confirmado por DunKin & Laindlaw (1926).

Em simpósio sobre imunização para CIC, Ott (1966) em retrospectiva com relação às origens das amostras vacinais, referenciou Green (1939), o qual descobriu que inoculando sucessivamente o vírus da CIC em furões aumentava a virulência para estes e aparentemente reduzia a virulência para os cães, estabelecendo assim pela primeira vez a vacina com vírus vivo modificado ou atenuado para proteção contra CIC. Haig (1948) adaptou em membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha a amostra trabalhada por Green, produzindo a amostra Onderstepoort utilizada como amostra vacinal. Cabasso & Cox (1949) confirmaram os resultados de Haig, partindo de uma amostra viral de campo adaptando-a em ovo, obtendo dessa forma a amostra Lederle. Outra, adaptada por Belcher, ficou conhecida como amostra Wisconsin FXNO. Os primeiros a cultivarem o vírus em cultivo celular foram Dedie & Klopte (1951), porém Rockborn (1958), adaptou o vírus em cultura de células de rim de cão, originando uma nova amostra. O vírus adaptado em ovo foi adaptado em cultura de célula de embrião de galinha por Cabasso et al. (1959).

Segundo Corrêa & Corrêa, 1992, acredita-se que amostras virais isoladas até o presente momento, pertençam ao mesmo sorotipo, por serem sorologicamente indistinguíveis, apesar da duração e do tipo de sintomas produzidos por elas variarem muito. Porém recente pesquisa desenvolvida por Gema et al., (a) (1996) utilizando um teste de

imunoperoxidase, analisando 129 amostras de soros de cães contra o vírus da CIC contradiz a afirmação anterior. No referido teste, o soro anti-Onderstepoort reagiu fracamente contra duas amostras isoladas, sugerindo a presença de diferentes populações do vírus da CIC à campo.

O vírus apresenta genoma de RNA de fita simples, envelope lipídico pleomórfico circundando o cerne, derivado da membrana plasmática da célula do hospedeiro, (Lamb & Kolakofsky, 1996) (FIG. 1). Por ser um vírus envelopado é sensível aos solventes lipídicos; agentes como calor e luz ultravioleta inativam o vírus, o qual permanece estável à liofilização (Krakowka et al., 1985; Appel et al., 1987; Greene & Appel, 1990; Shell, 1990).



Fonte: Dr. Irene Mc Candlish (Universidade de Glasgow)

Figura 1. Microscopia eletrônica do vírus da cinomose

Estudo realizado por Hall et al. (1979) descreve as proteínas virais com seus respectivos pesos moleculares (PM), sendo: L "large protein" (PM=200) uma proteína grande e menos abundante localizada no complexo transcriptase juntamente com as proteínas NP e P; H "hemagglutinin protein" (PM=76) uma glicoproteína responsável pela interação com a célula do hospedeiro localizada na membrana viral; P "phosphoprotein" (PM=66); NP "nucleocapsid protein" (PM=58) associada as proteínas P e L durante o processo de transcrição e replicação do vírus; F - F₁ (PM=40) e F₂ (PM=23) "fusion protein"; responsáveis pela fusão com a célula do hospedeiro e M "matrix protein" (PM=34) proteína da membrana mais abundante.

O vírus atenuado da CIC adaptado em cultura de células tem sido propagado em diferentes sistemas, incluindo cultura de células de aves, mustelídeos, cães, humanos, felinos e primatas. O vírus adsorve-se a célula alvo em aproximadamente uma hora. O efeito citopático (ECP) é característico, com a formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) e lise celular (Krakowka et al., 1985). Porém em alguns sistemas como células fibroblásticas de embrião de galinha (FEG), o ECP pode ser menos evidente, dependendo da amostra utilizada, número de passagens e método de cultivo. Cultivando a cepa Onderstepoort em sucessivas passagens em FEG, Karson & Bussel (1959) encontraram como ECP o arredondamento das células que permaneciam aderidas, mas eventualmente dispersas no sobrenadante, sem formação de sincícios. Os autores observaram que com aumento do número das passagens, a presença dos ECP ocorria em menor tempo e com maior destruição, e que pequenas quantidades de partículas virais propiciavam o aparecimento tardio dos efeitos e de forma mais focal. Essas pesquisas possibilitaram o desenvolvimento de métodos menos complexos para diagnóstico viral e para monitoramento sorológico do curso da doença, e o desenvolvimento de vacinas atenuadas.

Estudo realizado por Cabasso et al. (1959) propagando o vírus da CIC em FEG avaliou o tempo ótimo para coletar o sobrenadante, após titulá-lo com quatro, cinco, seis e sete dias de incubação. Os resultados indicaram que com quatro dias o título viral atingiu o seu pico.

A perda da virulência é um fenômeno frequentemente observado após cepas virulentas terem sido adaptadas à linhagem celular, mas esse mecanismo ainda é pouco entendido. Parece que certos sítios do genoma do vírus da CIC, responsáveis pela perda ou ganho da virulência são sítios mais sujeitos à mutações, requerendo somente um pequeno número de passagens em sistema apropriado para mudar em ambas direções, ou seja perda ou ganho de virulência, segundo Hamburguer et al. (1991).

2.2 - Epidemiologia

O vírus da CIC é abundante nos exsudatos respiratórios, mas pode ser isolado de outros tecidos e exsudatos do organismo de um animal enfermo, inclusive da urina. A eliminação pode ocorrer por 60 a 90 dias após infecção, apesar de períodos menores serem mais comuns. A imunidade é prolongada, mas não necessariamente sólida, pois pode ser alterada por enfermidades imunossupressoras, ou por estresse. A taxa de infecção é superior ao número dos animais que apresentam a enfermidade, estimando-se que até 75% dos cães susceptíveis se tornam subclínicamente infectados

e eliminam o vírus, sem sinais clínicos da CIC (Greene,1990; Corrêa & Corrêa, 1992).

O sexo ou raça não tem influência no aparecimento da CIC, mas a idade de maior incidência em cães coincide com a época em que diminui a taxa de anticorpos maternos passivamente transmitidos, sendo de ocorrência mais freqüente em cães com idade entre três e seis meses (Greene,1990). O contato com animais infectados, mantém o vírus na população, e o freqüente nascimento de filhotes ajuda a manter uma população susceptível (Greene, 1990).

Em estudo realizado no Hospital Veterinário da UFMG no período de janeiro de 1981 a agosto de 1983, através da análise de 3.193 fichas clínicas da rotina, Gouveia et al.(1987) encontraram 6,1% de ocorrência de CIC, diagnosticada clínica e/ou laboratorialmente. Dentre os animais que apresentaram a doença 22,3% haviam recebido pelo menos uma dose de vacina, indicando que falhas de imunização são freqüentes. Prováveis causas para esse fato seriam: presença de baixos títulos virais e conservação inadequada das vacinas, interferência entre imunógenos em vacinas polivalentes, ou ainda, doenças concorrentes, parasitoses, hipertermia, estado nutricional e interferência de anticorpos maternos. Observações semelhantes foram feitas por Alves (1996) que encontrou uma prevalência da CIC de 5,25% dos quais 4,4% tinha idade entre 0-2 meses; 51,2% entre 2-12 meses e 38,3% acima de 12 meses de idade. O autor verificou que 18,5% dos cães em estudo foram acometidos por doenças infecciosas que poderiam ter sido prevenidas mediante imunização. Ribeiro (1988) constatou maior ocorrência da CIC em região geográfica onde haviam baixos níveis de vacinação.

2.3 - Patogenia

A via de ingresso mais comum é a respiratória, entretanto o vírus da CIC pode penetrar pela via digestiva ou conjuntival, por contato direto; as fontes de infecção mais comuns são o ar, os fômites, água e alimentos contaminados por secreções de cães enfermos (Corrêa & Corrêa, 1992).

Dentre 24 horas, o vírus replica-se nos macrófagos do trato respiratório anterior e tonsilas. Do segundo ao quarto dia pós-infecção (PI), o número de partículas virais aumenta nas tonsilas e linfonodos retrofaringeos e bronquiais. Entre o quarto e sexto dia PI, ocorre a replicação do vírus dentro dos folículos linfóides do baço, da lâmina própria do estômago e intestino delgado, linfonodos mesentéricos e células de Kuppfer no fígado. A

disseminação do vírus em órgãos linfóides corresponde a presença de leucopenia e aumento de temperatura no organismo. A leucopenia deve-se principalmente aos linfócitos lesados pelo vírus, afetando as células T e B (Krakowka et al., 1980; Greene, 1990).

A partir do nono dia pode haver invasão das células epiteliais ocorrendo replicação do vírus e correspondendo ao segundo pico febril, com presença dos sintomas e sinais clínicos. Nessa fase é determinante o estado imune do animal, com títulos de anticorpos adequados para CIC e imunidade celular para eliminar o vírus da maioria dos tecidos sem demonstrar sinal clínico da doença. Anticorpos IgG-CIC específicos tem-se mostrado efetivos em neutralizar o vírus extracelular, bem como inibir a disseminação intercelular (Appell et al., 1982; Winters et al., 1984; Greene, 1990).

Cães com níveis intermediários tanto da resposta celular como humoral apresentam entre o nono e 14º PI disseminação do vírus para todos os tecidos epiteliais. Os sinais clínicos que se desenvolvem podem ser eliminados com aumento do título dos anticorpos, porém o vírus pode persistir por longos períodos como vírus completo em neurônios, células epidérmicas e tecido da úvea. Esta permanência explicaria a encefalite tardia e o "hard pad disease", onde o vírus está restrito a neurônios e células dos coxins plantares (Greene, 1990; Corrêa & Corrêa, 1992).

Cães com estado imune debilitado apresentam entre o 9º e 14º dia PI disseminação do vírus para diversos tecidos, incluindo pele, glândulas exócrinas e endócrinas, epitélios gastrointestinal e respiratório e trato genitourinário. Sinais clínicos da doença nesses cães são geralmente severos permanecendo o vírus nesses tecidos até a morte do animal (Greene, 1990).

2.4 - Imunidade

Anticorpos IgG-CIC específicos tem se mostrado efetivos em neutralizar o vírus extracelular, bem como em inibir a disseminação intercelular (Appel et al., 1982; Winters et al., 1984; Greene, 1990).

Cães com estado imune debilitado apresentam entre o nono e 14º dia pós-infecção disseminação do vírus para diversos tecidos, incluindo pele, glândulas exócrinas e endócrinas, epitélios gastrointestinal e respiratório e trato genitourinário. Sinais clínicos da doença nesses cães são graves permanecendo o vírus nesses tecidos até a morte do animal. (Greene, 1990).

Estudos da resposta sorológica à CIC em cães gnotobióticos confirmam que os títulos de anticorpos soroneutralizantes variam inversamente com a gravidade da doença (Winters et al., 1984; Greene, 1990).

As imunoglobulinas absorvidas do colostro conferem ao neonato título semelhante ao da mãe, variável de acordo com a doença considerada. 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 meia-vida dos anticorpos para CIC é de 8,4 dias, ou seja, a cada 8,4 dias o nível de anticorpos no filhote decresce em torno de 50%. Esta queda reflete um catabolismo protéico normal. Desta forma ocorrerá uma variação intra e inter-ninhadas (Greene, 1990; Mc Donald, 1992; Souza, 1996).

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).

A quantidade de anticorpos maternos transferidos para o filhote é diretamente proporcional ao título da mãe. Estes anticorpos transferidos passivamente da mãe para o filhote 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. Assim, o programa de vacinação para proteger os filhotes contra a CIC deve começar quando os anticorpos transferidos passivamente declinem a um nível que permita que os filhotes respondam imunologicamente frente à exposição ao vírus vacinal. Várias pesquisas indicam que um grande número de filhotes a cada ano estão expostos durante o período crítico. Na maioria dos filhotes, o título de anticorpos de origem materna é suficientemente reduzido com 42 a 56 dias de idade. Em alguns filhotes, os níveis de anticorpos maternos ainda são protetores aos 98 dias de idade interferindo com a imunização contra a CIC. Em outros casos, a proteção colostrálica 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. (Baker et al., 1959; Shell, 1990; McDonald, 1992, Souza, 1996).

Em trabalho realizado na Escola de Veterinária da UFMG, estudando em condições de campo o perfil sorológico de filhotes provenientes de cadelas vacinadas, de acordo com os esquemas de imunização preconizados pelo

veterinário ou proprietário, Souza (1996) observou grande variação nos títulos de anticorpos passivos contra CIC em filhotes. A técnica de soroneutralização utilizada mostrou-se eficaz, porém cara, trabalhosa e demorada, pela necessidade do uso de culturas celulares. O autor destaca a necessidade do estabelecimento de testes sorológicos mais acessíveis ao clínico, para monitoramento da imunidade passiva e, conseqüentemente, do momento mais adequado à primovacinação.

2.5 - Testes sorológicos

Testes de soroneutralização (SN) para CIC foram feitos em ovos embrionados por duas décadas. Através de testes quantitativos, com concentração de vírus pré-determinada, pode-se demonstrar a especificidade e a relação entre vírus e título de anticorpos soroneutralizantes em ovos embrionados. Embora confiável, este teste era caro e demandava tempo para se obter o resultado (Winters, 1981).

O teste de SN em cultura de célula mostrou-se tão sensível quanto o teste convencional em ovo embrionado de galinha (Gillespie, 1966; Appel & Robson, 1973). A formação de sincícios em célula de rim de macaco verde (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 (Appel & Robson, 1973; Greene, 1990).

O teste imunoenzimático (ELISA) é largamente utilizado para pesquisa de anticorpos contra antígenos conhecidos. Noon et al. (1980) utilizaram o ELISA indireto para pesquisa de anticorpos IgG e IgM de forma comparativa com a soroneutralização, obtendo alto grau de correlação entre os dois testes. Em um dos experimentos, dois cães foram infectados com o vírus da CIC, e o ELISA conseguiu detectar IgM uma semana antes que se obtivessem resultados positivos por SN. No ELISA-IgG foi possível detectar anticorpos cinco a seis dias pós-infecção. Após testarem 273 soros por ELISA (com a diluição de 1/100) e SN, análises estatísticas indicaram que houve 97,1% de correlação entre os testes, sendo que o ELISA apresentou 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade.

Bernard et al. (1982) desenvolveram um ELISA com alta sensibilidade e especificidade para detecção de anticorpos IgG em soros de cães contra a CIC, preparando um antígeno purificado em colchão e gradiente de sacarose, para separar as proteínas virais. Segundo os autores, para evitar reações inespecíficas de soros positivos com o soro fetal bovino este foi retirado durante o processo de produção da suspensão viral. O ELISA foi utilizado para avaliar a resposta humoral de cães após receberem vacina comercial com vírus vivo modificado da CIC. Sendo comparado à SN, o teste

apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes, e a vantagem de reduzir o tempo de obtenção dos resultados.

2.6 - Testes virológicos

Shin et al. (1995) utilizaram a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (PCR-RT), para diagnóstico da CIC, com o gene da proteína do nucleocapsídeo (CIC-NP), segundo os autores, a desvantagem nesse método é a necessidade de equipamentos laboratoriais específicos, embora seja de alta sensibilidade.

Gemma et al (1996b) utilizaram o soro contra CIC-NP (polipeptídeo estrutural do nucleocapsídeo) no ELISA de captura para detecção e caracterização do vírus da CIC. Essa proteína é necessária para a replicação do vírus e é uma das mais abundantes entre as proteínas virais do vírus da CIC. Os resultados demonstraram a utilidade do ELISA de captura para titulação, diagnósticos rápidos e análises antigênicas do vírus da CIC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Amostras

Para esse experimento foram utilizadas amostras, de soros de cães, do banco do Laboratório de Víruses Animais do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. As amostras estavam identificadas apenas pela numeração, portanto era desconhecido idade, sexo e raça dos cães doadores. Estas foram escolhidas de forma aleatória obtendo-se 81 soros para o teste em FEG e 60 soros para o teste em Vero, os quais foram analisados previamente pela SN.

3.2 - Cultivo de células de rim de macaco verde (Vero)

Células Vero (ATCC, CLL-81, USA) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM-Sigma), contendo 5% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 2% de P/S, em garrafas de vidro de 120 cm². As garrafas permaneceram em estufa com 5% de CO₂ durante três dias a 37°C para a formação da monocamada; após esse período o meio de cultura foi desprezado e novo meio acrescido para manutenção da monocamada, contendo 2% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 2% de P/S e após dois dias a monocamada era tripsinizada para o repique da mesma.

3.3 - Produção antigênica do vírus da CIC para o ELISA-Vero

O Laboratório Lema do Brasil forneceu três litros de suspensão do vírus da CIC, amostra Ondersterpoort, cultivado em células Vero. Para esta produção foram utilizados 500mL da suspensão, com título de 10^{3,1}TCID₅₀/mL., sendo clarificada por centrifugação a 4.000 x g (Sorvall, rotor GSA) durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colocado em um "becker", contendo barra magnética, para receber a solução saturada de sulfato de amônia 35% em sistema de gotejamento, e ficou, após a adição, em repouso por duas horas a 4°C. A solução foi centrifugada a 4.000 x g (Sorvall, rotor GSA) durante 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso com NTE pH 7,4 (0,1M Tris, HCl, NaCl, EDTA), sendo posteriormente dializado overnight em água bidestilada a 4°C. O vírus foi distribuído em microtubos e armazenado em nitrogênio líquido. As mesmas

etapas foram realizadas para o antígeno negativo (suspensão de células Vero).

3.4 - Cultivo primário de células fibroblásticas de embrião de galinha (FEG)

3.4.1 - Coleta do tecido

Ovos embrionados de galinha (spf) Setor de Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva) com nove a dez dias de idade foram limpos com álcool iodado sendo a casca aberta, em fluxo laminar, para retirada dos embriões. Cabeça, patas e asas foram descartadas e o restante do embrião colocado em tampão PBS (NaCl 8,0g, KCl 0,2g, Na₂PO₄ 0,78g, KH₂PO₄ 0,2g, NaHCO₃ 0,35g - pH 7.4) contendo 0.5% de anfotericina B e 2% de penicilina/estreptomicina (P/S). Os embriões foram triturados por pressão, em seringa de 20 mL, e os fragmentos recebidos em becker contendo PBS para lavagem.

3.4.2 - Preparação das células para o cultivo primário

Após a retirada do PBS, foram adicionados 50 mL de tripsina 0.25% contendo vermelho fenol 1%, para cada seis embriões, e mantida a 37°C. O material permaneceu agitando por cinco minutos com barra magnética sendo filtrado, logo após, em dupla camada de gaze e centrifugado em tubos de 15 mL por 10 minutos a 120 x g (Centrifugador Excelsa 2, modelo 205N, Fanem Brasil). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com meio de cultivo Parker 199 (Gibco-BRL, USA) com anfotericina B 0.5% e P/S 2%. Por contagem celular em câmara de Neubauer a concentração de células utilizada para o cultivo foi em média 4×10^5 células/cm² em meio 199 acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C durante três dias, para posterior repique das células em cultivos secundários.

3.5 – Cultivo do vírus da CIC utilizado para os testes de SN e para a produção da suspensão viral em FEG.

A amostra de vírus Onderstepoort cultivada em células Vero foi gentilmente cedida pelo Laboratório Lema Biologic do Brasil. A suspensão viral foi clarificada por centrifugação a 4.000 x g durante 30 minutos, a 4°C e acondicionada a -20°C. A amostra de vírus foi inoculada (passagem cega) em suspensão de cultivo primário de FEG (garrafa de 25 cm²). Após quatro dias em estufa de 5% CO₂ a 37°C, o sobrenadante foi coletado e titulado, apresentando um título de $10^{3,24}$ TCID₅₀/mL. O volume de 1,0 mL desse

sobrenadante foi inoculado em cultivo secundário de FEG e obtendo título de $10^{4.2}$ TCID₅₀/mL, sendo este o inóculo para produção da suspensão viral em célula Vero.

Para a produção de suspensão viral a monocamada de células Vero, cultivada em garrafa de 120 cm² de área de cultivo, recebeu 1,6 mL do inóculo diluído em MEM contendo 2% de SFB. Após uma hora de incubação em estufa com 5% de CO₂ a 37°C sendo homogeneizado a cada 15 minutos, o inóculo foi retirado e acrescentou-se MEM com 5% de SFB. Após o aparecimento do efeito citopático (ECP) característico, com a formação de sincícios e destruição de aproximadamente 75% da monocamada, foram feitos três ciclos de congelamento e descongelamento, sendo o sobrenadante recolhido e clarificado (Sorvall, rotor GSA) a 4.000 x g durante 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi aliquotado em criotubos de 1,0 mL, titulado obtendo-se título de $10^{6.2}$ TCID₅₀/mL e acondicionado a -80°C (Revco®). Essas alíquotas foram utilizadas para o inóculo da produção da suspensão viral em células FEG e para os testes de SN.

3.6 - Teste de soroneutralização (SN)

O teste de SN foi realizado em microplaca Costar® de 96 poços para cultura de tecido fundo chato, segundo Souza (1996), com as amostras em triplicata e presença dos seguintes controles: soro padrão positivo, soro padrão negativo, soro, meio com soro fetal e meio sem soro fetal. A amostra Onderstepoort foi cultivada conforme descrito no item 3.4.

3.7 – Produção da suspensão do vírus da CIC em FEG

3.7.1- Pré-teste da inoculação do vírus da CIC em FEG

Foi realizado um pré-teste em garrafas de 120 cm² para padronizar o inóculo a ser utilizado em garrafas de vidro de 250 cm². Três tipos de multiplicidade de infecção (MOI – “multiplicity of infection”) foram testados: 0,01, 0,001 e 0,003. Os sobrenadantes foram coletados após quatro dias, conforme Cabasso et al. (1959), e alíquotas foram retiradas para posterior titulação em células Vero, como descrito no item 3.10.

3.7.2 - Suspensão do vírus da CIC em FEG

Os cultivos primários de FEG em garrafas de vidro de 120 cm² e 250 cm², permaneceram por três dias em estufa a 37°C o sobrenadante foi descartado e as células foram repicadas com tripsina 0,25%, na proporção de 1:2,

utilizando-se em média 4×10^5 células/cm². As garrafas de 250 cm² foram utilizadas para inóculo da CIC e as de 120 cm² para repiques posteriores.

Após a formação da monocamada (24 horas) o sobrenadante foi descartado e as células receberam o inóculo diluído em 10mL de meio 199 sem SFB. A adsorção ocorria durante uma hora a 37°C sendo homogeneizada a cada 15 minutos, após o que o inóculo era descartado. Meio 199 (120 mL) sem SFB foi acrescentado às células inoculadas as quais permaneciam em estufa a 37°C durante quatro dias, após o que o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C, até ser realizado o processo de semipurificação.

3.7.3 - Produção da suspensão de antígeno negativo (controle) em FEG

O antígeno controle negativo foi obtido a partir de sobrenadante de monocamada de FEG não inoculada, submetido ao mesmo processamento que o antígeno viral, sendo o inóculo substituído por PBS pH 7,4. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -20°C, até o processo de semipurificação.

3.8 - Produção do antígeno viral semi-purificado para o ELISAI-FEG.

O protocolo de semi-purificação foi seguido conforme proposto por Bernard et al. (1982), com modificações. Todas as etapas de semi-purificação, descritas para a suspensão do antígeno viral, foram também realizadas com a suspensão do antígeno negativo.

3.8.1 - Clarificação e concentração

A suspensão de antígeno viral foi clarificada por centrifugação a 4.000 x g (Sorvall RC-2B, rotor GSA) por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e o sedimento celular desprezado. O sobrenadante contendo partículas virais foi concentrado por ultracentrifugação. Tubos de 50 mL do rotor A-641/Sorvall Ultra Pro-80 foram utilizados para concentrar o volume total de 500 mL da suspensão viral a 122.121 x g por 3 horas, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento recoberto com 500µL, em cada tubo, de NTE pH 7,4 (0,1M Tris, HCl, NaCl, EDTA) para ressuspender e homogeneizar o sedimento. No final do processo obteve-se um volume final 1000 vezes concentrado.

3.8.2 - Semi-purificação

O material resultante da concentração foi ultracentrifugado em colchão de sacarose a 60% (p/v), preparado em PBS pH 7,4, a 65.000 x g (rotor AH-629/Sorvall Ultra Pro-80) durante uma hora e 40 minutos, a 4°C. Em tubos de 20 mL foram colocados 5 mL do colchão de sacarose 60% para 5 mL do material ressuspenso em NTE pH 7,4. Após a ultracentrifugação formou-se a banda de vírus sobre o colchão de sacarose 60%, a qual foi coletada, diluída com NTE pH 7,4 e concentrada por ultracentrifugação 122.000 x g por duas horas, a 4°C, para remoção da sacarose. O sobrenadante após a concentração foi descartado e o sedimento ressuspenso em 500µL de NTE pH 7,4. O material resultante da semi-purificação foi acondicionado em freezer -20°C, até a sua utilização no teste ELISA.

3.9 - Dosagem protéica.

As concentrações dos antígenos, viral e negativo, utilizadas nos experimentos, foram determinadas empregando-se o método de Lowry (1959).

3.10 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).

A eletroforese foi utilizada para analisar o protocolo de semi-purificação empregado. A técnica avaliou comparativamente o perfil eletroforético das proteínas dos Ag+sp da CIC e Ag-sp, bem como esses antígenos na etapa de concentração e a produção do vírus da CIC em célula Vero.

O método utilizado foi a eletroforese em placa vertical de minigel de poliacrilamida (Mini-Protean®II/Bio-Rad) contendo SDS, com sistema descontínuo de pH, segundo descrito por Laemmli (1970)

O gel de resolução usado para análise das amostras foi de 12% e o de empilhamento de 4%, sendo confeccionados com (Bis-acrilamida 40%, Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, Tris-HCl 0,5M, pH 6,8, SDS 10% p/v, Glicerol 80%, Persulfato de amônio 10% p/v, TEMED 0,05%) Como padrão de peso foi utilizado o Broad Range da Bio-Rad®. A corrida teve a duração de uma hora em TBS pH 8,3 (Tris25mM, Glicina 0,2M, SDS 0,05%) à 150 volts.

3.10.1 Solubilização das amostras

Imediatamente antes da eletroforese as amostras foram desnaturadas e solubilizadas pela adição de tampão de amostra preparado com Tris-HCl 0,5M; 0,8 g SDS; 3 ml de glicerol 80% (Merck®); 0,4 ml de Azul de bromofenol 0,05%; seguido pela fervura por cinco minutos.

3.10.2 Fixação e Coloração do minigel

O gel foi fixado em solução de metanol 10% e ácido acético 5% em água destilada por três horas, corado com 0.04% Commassie Blue Brilhant, 10% ácido acético e 25% de metanol por trinta minutos e descorado na solução de metanol e ácido acético, por dois dias, segundo Fairbanks et al. (1971).

3.11 - Titulação do vírus da CIC.

A titulação da suspensão de vírus produzida em células Vero para a SN, e produzida em FEG para o ELISAI, foi realizada da mesma forma, utilizando-se microplacas (Costar) com 96 poços. Foram feitas seis diluições decimais da amostra original do vírus (10^{-1} a 10^{-6}) em MEM sem SFB e adicionado posteriormente a suspensão de células Vero na concentração de 25.000 células/poço em MEM com 5% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 2% de P/S. Em cada microplaca foram mantidos controles de MEM com 5% SFB, de MEM sem SFB e de célula. As placas permaneceram em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$ durante cinco dias, sendo feita a leitura logo após esse período e o título calculado pelo método de Reed & Muench (1938). A leitura foi realizada considerando como positivo o ECP característico em células Vero, produzido pelo vírus da CIC, com a formação de sincícios e destruição da monocamada.

3.12 – Padronização do ELISA indireto (ELISAI)

3.12.1- Teste de ELISA indireto

Neste teste o antígeno vírico e o antígeno controle negativo participam da fase sólida, seguidos pelo soro (Ac) de cão a ser testado e por último o conjugado anti-espécie canina marcado com peroxidase.

3.12.2 - Titulação em bloco dos reagentes no ELISA-FEG.

Para estabelecer a diluição ótima de trabalho dos soros e antígenos foi realizada a titulação em bloco em microplaca (Costar). Foram utilizadas três diluições (1/30, 1/50, 1/100) do antígeno semi-purificado positivo e controle negativo frente a duas diluições (1/50, 1/20) dos soros positivo e negativo padrão e do conjugado (1/1000 e 1/1500). A placa foi adsorvida com as três diferentes diluições dos antígenos Ag+sp e Ag-sp durante duas horas a $37^\circ C$ em Tampão Tris (Solução A = Trisma Base 6.05g + NaCl 8.78g + H_2O q.s.p. 1000mL. Solução B = Tris HCl 1,58g + NaCl 1,76g + H_2O q.s.p. 200 mL pH=9,0, misturadas na proporção de uma parte da Solução B para 9 da Solução A, no momento do uso), segundo Lobato, 1997. Após esse período

foram adicionados 100 μ L de Tampão de Bloqueio (TB - PBS pH 7,4 / Leite em pó desnatado 5% / Tween 0,05%) incubando-se a placa por uma hora a 37°C e lavando-se logo após com Tampão de Lavagem (TL - PBS pH 7,4 / Tween 20- 0,05%) três vezes. Os soros padrão positivo (p+) e negativo (p-), foram diluídos em TB e adicionados (50 μ L/poço) na placa e incubados por uma hora a 37°C. Após a lavagem com TL (3x), foram adicionados 50 μ L/poço do conjugado anti-IgG canina¹ diluído em TB nas diluições previamente definidas durante 30 minutos a 37°C. O excesso de conjugado foi retirado lavando-se a placa seis vezes com TL e posteriormente sendo adicionados 50 μ L/poço do substrato (Ortophenilenediamina 2mg -Sigma + 3 μ L H₂O₂ 30 volumes + 10 mL Tampão Citrato(TC) - Ácido Cítrico 10,51 g/L pH 4,5). A reação foi paralisada após 15 minutos com 50 μ L H₂SO₄ 4N e a leitura realizada no espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda 492nm e filtro diferencial de 405nm.

3.12.3 - Titulação em bloco dos reagentes para o ELISA-Vero.

Para estabelecer a diluição ótima de trabalho dos soros e antígenos foi realizada a titulação em bloco em microplaca (Costar). Foram utilizados quatro diluições dos antígenos positivo e negativo (1/50, 1/100, 1/200, 1/400), três dos soros padrão positivo e negativo (1/50, 1/100, 1/150) e a diluição do conjugado testado previamente na diluição 1/4000. A placa foi adsorvida com as quatro diferentes diluições dos antígenos positivo e negativo durante três horas a 37°C em Tampão Carbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 15mM; NaHCO₃ 35mM). Após esse período a placa foi lavada com Tampão de Lavagem (TL - PBS pH 7,4 / Tween 20- 0,05%) três vezes. Em seguida foram adicionados 100 μ L de Tampão de Bloqueio (TB) PBS-Caseína 2% pH 7,4 (NaCl 0,15M; KCL 2,7mM; Na₂HPO₄ 8mM; KH₂PO₄ 1,5mM e 2% (p/v) de caseína (Merck) incubando-se a placa por uma hora a 37°C e lavando-se logo após com TL três vezes. As diluições dos soros padrão positivo (p+) e negativo (p-), foram em TB e adicionados (100 μ L/poço) na placa e incubados por uma hora a 37°C. Após a lavagem com TL (3x), foram adicionados 100 μ L/poço do conjugado anti-IgG canina² diluído em TB na diluição previamente definida durante 30 minutos a 37°C. O excesso de conjugado foi retirado lavando-se a placa seis vezes com TL e posteriormente sendo adicionados 50 μ L/poço do substrato (Ortophenilenediamina 2mg -Sigma + 3 μ L H₂O₂ 30 volumes + 10 mL Tampão Citrato(TC) - Ácido Cítrico 10,51 g/L pH 4,5). A reação foi paralisada após 15 minutos com 50 μ L H₂SO₄ 4N e a leitura realizada no

¹ Conjugado anti-IgG canina gentilmente cedido pela Fundação Ezequiel Dias.

espectrofotômetro com filtro de comprimento de onda 492nm e filtro diferencial de 405nm.

3.12.4 - Critérios de avaliação dos resultados das titulações em bloco

Os resultados foram interpretados levando em consideração, a análise dos resultados das leituras obtidas por densidade ópticas (DO). Para estabelecer a melhor diluição de trabalho os reagentes sistematicamente utilizados foram o soro positivo com título na SN de 256, soro negativo com título na SN <2 e os controle de conjugado, de bloqueio e de soro. A média aritmética dos valores de absorbância foi calculada para cada diluição em duplicata, dos reagentes e controles, usada na padronização do teste frente a cada tipo de antígeno positivo e controle negativo. O resultado final de cada diluição teste foi calculado da seguinte forma: média dos resultados das DO de cada diluição teste frente ao antígeno positivo menos a média dos resultados das DO da diluição teste frente ao antígeno negativo. O mesmo método foi utilizado para o cálculo da DO dos soros de campo.

3.13 – ELISAI-FEG

Foram utilizadas microplacas para ELISA (Costar) com 96 poços adsorvidas com 50 μ L/pocinho dos antígenos Agv-sp e Agt-sp, ambos na diluição de 1:30, em Tampão Tris diluído conforme em 3.12.2. Após o período de duas horas de adsorção a 37 $^{\circ}$ C as placas foram bloqueadas e posteriormente lavadas como descrito em 3.12.2.

Foram testadas por placa duplicatas de 20 soros de campo, soros padrão positivo e negativo, controle de soro e bloqueio. Os soros foram diluídos 1:20 em TB sendo adicionados 50 μ L/poço e incubados por uma hora a 37 $^{\circ}$ C. Após a incubação a placa foi lavada com TL (três vezes) e 50 μ L/poço do conjugado, diluído 1:1500 em TB, foram colocados nas placas que foram incubadas por 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C e lavadas com TL (seis vezes).

Todos os poços receberam 50 μ L da solução de substrato, conforme em 3.12.2 e a reação foi paralisada após 15 minutos com ácido sulfúrico 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Sigma) com filtro de 492nm e filtro diferencial de 405nm. Os resultados foram analisados estatisticamente levando-se em consideração os critérios definidos em 3.12.4.

3.14 - ELISAI-Vero

Foram utilizadas microplacas para ELISA (Costar) com 96 poços adsorvidas com 100 μ L/pocinho dos antígenos positivo e negativo, ambos na diluição de 1/400, em Tampão Carbonato pH 9,6, após o período de três horas de adsorção a 37°C as placas foram bloqueadas e posteriormente lavadas como descrito em 3.12.3.

Foram testadas por placa duplicatas de 20 soros de campo, soros padrão positivo e negativo, controle de soro e bloqueio. Os soros foram diluídos 1:100 em TB sendo adicionados 100 μ L/poço e incubados por uma hora a 37°C. Após a incubação a placa foi lavada com TL (três vezes) e 100 μ L/poço do conjugado, diluído 1:4000 em TB, foram colocados nas placas que foram incubadas por 30 minutos a 37°C e lavadas com TL (seis vezes).

Todos os poços receberam 50 μ L da solução de substrato, conforme em 3.12.3 e a reação foi paralisada após 15 minutos com ácido sulfúrico 4N. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Sigma) com filtro de 492nm e filtro diferencial de 405nm. Os resultados foram analisados estatisticamente levando-se em consideração os critérios definidos em 3.12.4.

3.15 - Análise dos resultados

A sensibilidade, especificidade da SN em relação aos ELISAI propostos foram calculados com os dados da tabela 1 através do Teste Qui-quadrado. O ponto de corte foi estabelecido através da média das DO dos soros negativos mais um desvio padrão.

Na análise dos resultados comparada à SN foram considerados animais positivos e/ou protegidos aqueles com título de anticorpos neutralizantes maior ou igual a 100, segundo Gillespie et al., 1958; Gillespie, 1966; Povey, 1986.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivo primário de células FEG

A produção de cultivo primário de FEG é um processo trabalhoso que envolve disponibilidade de ovos embrionados livres de patógenos em idade adequada (9 a 10 dias) além da possibilidade de ocorrer contaminação do cultivo durante o preparo, portanto esses fatores limitam uma grande produção de suspensão viral em pouco tempo, o que difere da linhagem celular contínua. Durante o experimento com FEG esses foram os inconvenientes encontrados com a célula, mesmo tendo ocorrido poucas vezes contaminação celular, o que exigia o descarte das garrafas contaminadas e nova produção de cultivo primário.

4.2 – Cultivo do vírus da CIC para o teste de SN e produção da suspensão viral em FEG.

O vírus utilizado sofreu antes algumas passagens cegas em FEG para elevar o título viral sendo que no primeiro inóculo resultou no aumento do título de $10^{3,1}$ TCID₅₀/mL para $10^{3,24}$ TCID₅₀/mL. Uma alíquota desse sobrenadante foi inoculada em cultivo secundário de FEG obtendo novo aumento do título para $10^{4,2}$ TCID₅₀/mL. Com o aumento do título, o vírus foi inoculado novamente em células Vero. A partir de 1,6mL da suspensão viral em FEG secundário, correspondendo ao MOI de 0,0064 em células Vero obteve-se o título de $10^{6,2}$ TCID₅₀/mL. Essa suspensão viral foi utilizada para os testes de SN e para inóculo das células FEG.

4.3 – Pré-teste da inoculação do vírus da CIC em FEG

Um pré-teste foi realizado para estabelecer a MOI a ser utilizada na produção da suspensão viral em FEG, sendo a MOI de 0,001 a que forneceu o melhor título viral ($10^{5,4}$ TCID₅₀/mL), conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados do pré-teste para o inóculo do vírus da CIC em FEG.

MOI	TCID ₅₀ /mL
0,01	10 ^{4,1}
0,001	10 ^{5,4}
0,003	10 ^{4,2}

4.4 – Produção da suspensão de vírus da CIC em FEG

A produção da suspensão viral foi realizada sem a utilização de soro fetal bovino, conforme Bernard et al. (1982), permanecendo as garrafas em estufa a 37°C durante quatro dias, conforme Cabasso et al. (1959).

Como descrito por Karson & Bussell (1959) e Cabasso et al. (1959), não foram encontrados ECP característicos em FEG com a propagação do vírus. Os efeitos encontrados ao quarto dia nas monocamadas (Fig. 2) foram o arredondamento celular e principalmente a fragmentação das células. As células permaneciam aderidas a garrafa, mas eventualmente muitas dispersas no sobrenadante.

Portanto para avaliar a presença do vírus no sobrenadante, uma pequena alíquota era retirada para titular em célula Vero, na qual o vírus apresenta ECP característico com a formação de sincícios. O título do vírus da CIC em FEG variou entre 10^{4,6} e 10^{5,2} TCID₅₀.

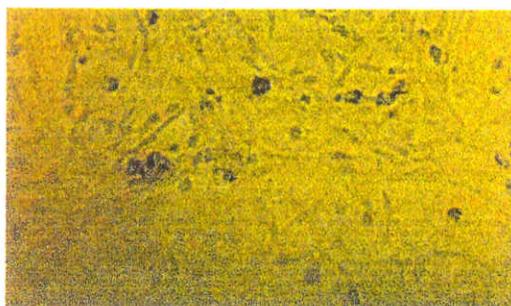


Figura 2 - Monocamada de FEG após quatro dias de inoculação com vírus da CIC.

4.5 – Produção do antígeno viral semi-purificado para o ELISAI-FEG

Para a preparação do antígeno viral as coletas do sobrenadantes foram realizadas sem congelamento e descongelamento da monocamada, como proposto por Wechsler, et al. (1985), evitando desta forma uma maior contaminação da suspensão viral com debris celulares, que são uma das prováveis causas para reações inespecíficas em ELISAI, segundo Bernard et al., (1982); Bidwell et al (1977). Com o intuito de evitar ao máximo a possibilidade dessa contaminação, decidiu-se fazer a semi-purificação do material. Após a concentração da suspensão viral utilizou-se o colchão de sacarose 60%, segundo Bernard et al.(1982), sendo a banda coletada na interface do colchão, já que o vírus da CIC apresenta um coeficiente de sedimentação igual a 50s permanecendo, desta forma, acima do colchão.

4.6 – Dosagem protéica

Como pode ser visto na Tabela 2, os antígenos viral e celular produzidos em FEG apresentaram uma diminuição na concentração total de proteína após a semi-purificação, devido às etapas de clarificação e ultracentrifugação, onde parte das proteínas contaminantes foram provavelmente retiradas. Os antígenos produzidos em Vero apresentaram a quantidade de 1500 μ g/mL de antígeno positivo e 17000 μ g/mL de antígeno controle negativo.

Tabela 2. Resultados das dosagens protéicas dos antígenos positivo e controle negativo produzidos em FEG, empregando-se o método de Lowry.

	Ag +	Ag -
Concentrado FEG	167,1 μ g/mL	77,12 μ g/mL
Semi-purific. FEG	51,5 μ g/mL	16,28 μ g/mL

4.7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese comparou o vírus da CIC produzido em células Vero e em células FEG, bem como o vírus nas fases de concentração e após semi-purificação em colchão de sacarose (FIG 3). O método de coloração utilizado "comassie blue brilliant" não apresentou uma boa sensibilidade para amostras com baixa concentração protéica, justificando a dificuldade de visualização de bandas nas canaletas (4) e (5) referentes ao sobrenadantes após semi-purificação. A coloração com nitrato de prata talvez pudesse ter evidenciado as bandas devido à sua maior sensibilidade. Nas etapas de concentração do sobrenadantes virais em Vero e em FEG, canaletas (3) e (7) respectivamente pode-se notar uma banda mais acentuada na altura do PM = 58 correspondendo provavelmente a proteína do nucleocapsídeo e

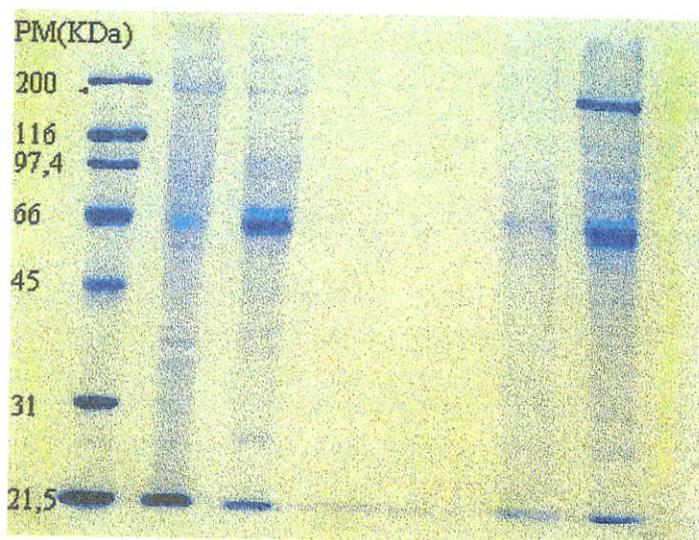


Figura 3- Eletroforese em minigel de poliacrilamida. Amostras: (1) Peso Molecular Padrão (PM) Broad Range (Bio-Rad), (2) célula Vero com SFB concentrada; (3) CIC em célula Vero com SFB concentrada; (4) sobrenadante de célula FEG sem SFB concentrado e passado em colchão de sacarose 60% ; (5) sobrenadante de CIC em célula FEG sem SFB concentrado e passado em colchão de sacarose 60%; (6) sobrenadante de célula FEG com SFB concentrado; (7) sobrenadante de CIC em célula FEG com SFB concentrado.

outra na altura do PM=66 correspondendo a proteína P (PM=66). Comparando as bandas virais com as celulares, pode-se evidenciar na canaleta (3) além da banda na altura do PM=58, duas bandas variando entre 35 e 38 Kda e outra variando entre 25 e 28 Kda, que podem ser bandas correspondentes a proteína M (PM=34) e a proteína F₂ (PM=23), respectivamente. Na canaleta (7), pode-se evidenciar bandas na altura dos pesos moleculares iguais a 180 KDa, 58 KDa uma banda variando entre 25 e 28 Kda, correspondendo às proteínas L ("large protein" PM=200), do nucleocapsídeo e proteína F₂.

4.7 – Padronização do ELISAI

Testes anteriores de padronização por titulação em bloco foram realizados, variando desde tempo de adsorção do antígeno, diluição dos antígenos, diluição dos soros, diluição do conjugado. Em cada titulação procurou-se os resultados que melhor separassem o soro padrão positivo do negativo. Aqui é descrito apenas a titulação em bloco, com o intervalo de diluições dos reagentes, que obteve melhor resultado.

A padronização possibilitou determinar a melhor diluição de trabalho dos reagentes, sendo para o ELISAI-FEG as diluições de: 1:30 para os antígenos, 1:20 para os soros padrões e 1:1500 para o conjugado (Fig. 4). Para o ELISAI-Vero as diluições de trabalho foram 1/400 dos antígenos, 1/100 dos soros testes e 1/4000 do conjugado (Fig. 5) Os soros padrão utilizados como controle positivo e negativo apresentavam títulos de 400 e < 2 na SN, respectivamente, e foram utilizados como referência nos testes subsequentes.

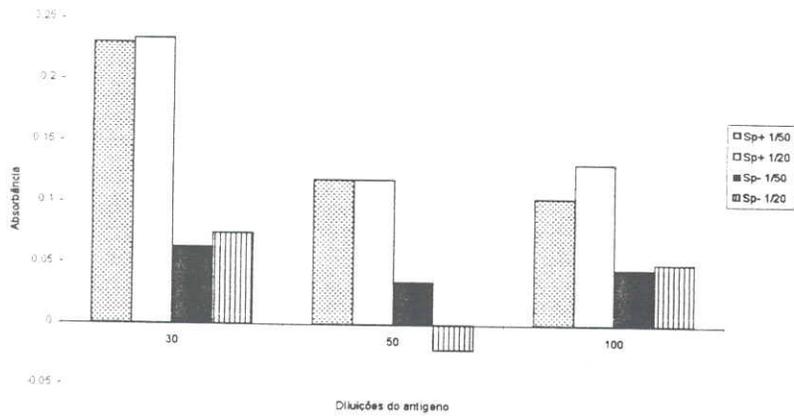


Figura 4 – Resultados da titulação em bloco do ELISAI em FEG, conjugado diluído 1:1500.

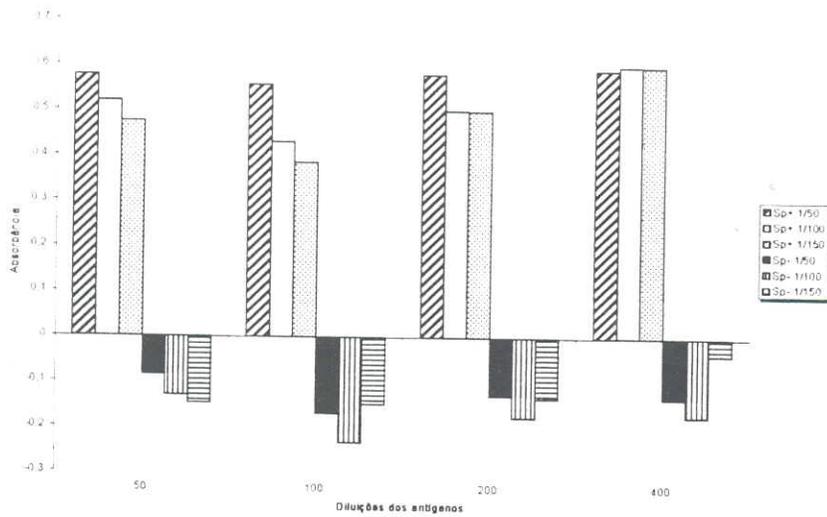


Figura 5 – Resultados da titulação em bloco do ELISAI-Vero, conjugado diluído 1:4000.

4.8 – ELISAI

Utilizando o teste de SN como referência, encontrou-se como ponto de corte no ELISA-FEG uma DO (Densidade Ótica) igual a 0,097 e a análise dos resultados revelou 61,76% de sensibilidade e 83% de especificidade. O ponto de corte no ELISA-Vero foi de 0,36 e a análise dos resultados revelaram 41,6% de sensibilidade e 81,3% de especificidade (Tab.3). Nos dois testes observou-se uma baixa sensibilidade e uma especificidade ainda inadequada para a utilização dos mesmos.

Noon et al (1980) utilizando a célula Vero na produção do vírus da CIC, para um ELISAI, obteve como resultado 95,7% de sensibilidade e 98,1% de especificidade, neste experimento os autores realizaram o processo de congelamento e descongelamento do sobrenadante, sonicação da suspensão e posterior clarificação. Com essas etapas talvez tenham conseguido obter partículas virais ainda associadas à células, refletindo dessa forma melhores resultados.

Bernard et al. (1982) utilizando inicialmente a metodologia de Noon et al (1980) observaram que havia reação cruzada ao antígeno negativo prejudicando os resultados. Com isso realizaram o processo de purificação da suspensão, com o colchão e o gradiente de sacarose para redução de proteínas contaminantes, o que levou a melhores resultados.

Durante os experimentos (ELISAI-FEG e ELISA-Vero) observou-se como fator de interferência na sensibilidade dos testes a presença de soros positivos à SN que apresentavam forte reação ao antígeno negativo por razões ainda não bem esclarecidas, fato já descrito por outros pesquisadores (Bernard et al. 1982; Bidwell, et al., 1977). Apesar de terem sido tomadas algumas medidas para evitar essa reação, pelo menos durante o experimento do ELISAI-FEG, como a não utilização do SFB após o inóculo e a coleta sem congelamento e descongelamento da monocamada. A alternativa de fazer a diluição do soro teste com antígeno negativo a 37°C por uma hora e posterior centrifugação, para minimizar a reação cruzada, segundo Bidwell et al. (1977), não conduziram a uma melhoria dos resultados aqui apresentados.

Os resultados das absorvâncias dos soros positivos (positivos/protetores na SN) apresentaram valores extremamente baixos sendo o valor máximo de 0,189 (ELISA-FEG), inclusive para soros com altos títulos de anticorpos soroneutralizantes, o mesmo pode-se notar para os soros negativos com títulos <2 na SN. Não foi possível, então, estabelecer correlação dos títulos na SN com as respectivas absorvâncias no

ELISAI-FEG (TAB 4). No ELISAI-Vero observou-se a mesma falta de correlação (Tab.5), ou seja, soros com títulos na SN altos, apresentando absorvâncias extremamente baixas e títulos baixos com absorvâncias elevas.

Um dos fatores para contribuir com os resultados encontrados neste ELISAI pode estar na etapa de semi-purificação em colchão de sacarose, que pode ser responsável pela perda de grande parte de partículas virais, como descreve Wechsler, et al.(1985). Os autores desenvolveram um trabalho utilizando, dentre outros, o vírus do sarampo, no qual analisou a quantidade de partículas virais e debris celulares após a coleta do sobrenadante. O experimento avaliou dois métodos de coleta: com agitação e sem agitação prévia do sobrenadante (não sendo realizado o congelamento e descongelamento do mesmo). Após a coleta, o sobrenadante foi clarificado em baixa rotação e concentrado por ultracentrifugação. Analisando por eletroforese em gel de poliacrilamida o autor concluiu que, a coleta do sobrenadante viral com agitação prévia aumenta a quantidade de partículas virais, sem aumentar a contaminação celular, como ocorre com o congelamento e descongelamento, e sem ocorrer perdas de partículas virais como ocorre com o método de purificação utilizando colchão e gradiente de sacarose.

A FIG 6 mostra a freqüência de soros com relação aos valores das D.O. obtidas no ELISAI-FEG. Nesse gráfico observa-se a presença de soros negativos com valores de D.O. elevadas, bem como soros positivos/protetores com valores de D.O. baixas, não encontrando dessa forma a separação das curvas de soros positivos/protetores e negativos esperada.

Tabela 3. Teste Qui-Quadrado aplicado aos resultados do ELISAI frente ao teste padrão de SN

		SN					SN		
		Pos.	Neg.	Total			Pos.	Neg.	Total
E L I S A V E R O	Pos. (DO> 0,36)	5	9	14	E L I S A F E G	Pos. (DO> 0,097)	21	8	28
	Neg. (DO< 0,36)	7	39	46		Neg. (DO< 0,097)	14	39	53
Total		12	48	60	Total		34	47	81

Sensibilidade= 41,6%;
Especificidade=81,3%

Sensibilidade=61,76%
Especificidade=83%

Tabela 4. Soros utilizados no experimento do ELISAI com antígeno em FEG com seus respectivos títulos na SN e absorbância (492 nm).

Soros	SN	DO492	Soros	SN	DO492
1	128	0.059	42	16	0.091
2	128	0.102	43	22	0.112
3	128	0.183	44	32	0.087
4	128	0.161	45	32	0.125
5	211	0.142	46	74	0.102
6	305	0.053	47	81	0.091
7	305	0.101	48	81	0.093
8	350	0.099	49	87	0.132
9	362	0.065	50	89	0.034
10	362	0.189	51	< 2	0.124
11	362	0.113	52	< 2	0.077
12	396	0.083	53	< 2	0.042
13	429	0.094	54	< 2	0.050
14	429	0.142	55	< 2	0.009
15	430	0.114	56	< 2	0.017
16	512	0.112	57	< 2	-0.008
17	595	0.145	58	< 2	0.015
18	610	0.103	59	< 2	0.012
19	610	0.018	60	< 2	-0.032
20	724	0.082	61	< 2	0.072
21	724	0.080	62	< 2	0.088
22	724	0.085	63	< 2	0.033
23	841	0.122	64	< 2	0.058
24	860	0.152	65	< 2	0.01
25	860	0.098	66	< 2	0
26	1448	0.125	67	< 2	-0.021
27	1448	0.164	68	< 2	-0.022
28	2048	0.060	69	< 2	0.081
29	2048	0.068	70	< 2	0
30	2048	0.054	71	< 2	0.047
31	2048	0.085	72	< 2	0.005
32	2048	0.108	73	< 2	0.055
33	2048	0.141	74	< 2	0.091
34	2048	0.1475	75	< 2	0.005
35	6	0.106	76	< 2	-0.005
36	6	0.046	77	< 2	0.145
37	10	0.132	78	< 2	0.041
38	11	0.051	79	< 2	0.1
39	11	0.053	80	< 2	0,052
40	13	0.046	81	< 2	0
41	13	0.057			

Tabela 5. Soros utilizados no experimento do ELISAI com antígeno em Vero com seus respectivos títulos na SN e absorvância (492 nm).

Soros	SN	DO492	Soros	SN	DO492
1	128	0.099	31	2	0.045
2	150	0.197	32	2	0.146
3	172	-0.092	33	2	0.137
4	178	0.417	34	2	0.058
5	211	0.420	35	3	0.052
6	298	0.69	36	3	0.095
7	355	-0.190	37	3	0.059
8	600	0.125	38	3	0.30
9	1024	0.803	39	6	0.175
10	1413	-0.347	40	6	0.157
11	2048	-0.49	41	7	0.214
12	2048	0.494	42	22	0.078
13	2	-0.002	43	25	0.216
14	2	0.009	44	27	0.30
15	2	0.009	45	27	0.366
16	2	0.077	46	27	0.318
17	2	0.066	47	38	0.44
18	2	0.016	48	45	0.225
19	2	0.056	49	45	0.223
20	2	-0.002	50	45	-0.346
21	2	0.242	51	45	0.284
22	2	0.265	52	45	0.338
23	2	0.263	53	45	0.401
24	2	0.23	54	45	0.407
25	2	0.24	55	45	0.353
26	2	0.29	56	53	0.422
27	2	0.25	57	53	0.395
28	2	0.329	58	53	0.39
29	2	0.056	59	79	0.406
30	2	0.357	60	92	0.393

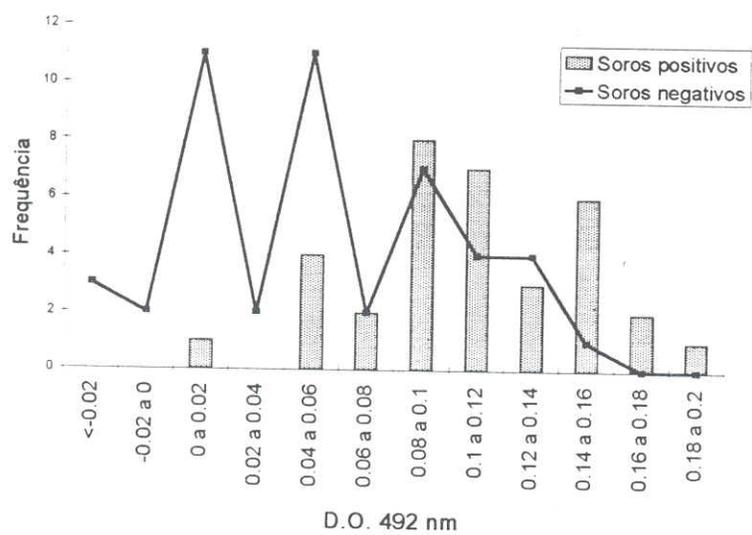


Figura 6 – Distribuição dos soros positivos ($SN > 100$) e negativos ($SN < 2$) pelo ELISAI-FEG.

5 CONCLUSÕES

A produção antigênica do vírus da cinomose em células de fibroblasto de embrião de galinha (FEG) não se mostrou uma boa opção, devido às dificuldades inerentes ao cultivo primário, como a facilidade de contaminação e impossibilidade de produção de antígeno em larga escala, embora esta seja uma célula sensível ao vírus.

A produção antigênica do vírus da cinomose em células Vero torna-se mais interessante por se tratar de linhagem contínua, podendo desta forma aumentar a massa viral de forma rápida.

Os ELISA indiretos propostos apresentaram valores de sensibilidade (61,8%) e especificidade (83%) para o ELISA-FEG e 41,6% de sensibilidade e 81,3% de especificidade para o ELISA-Vero, baixos, e, foram incapazes de separar soros positivos de soros negativos, portanto, não estabeleceram correlação com os resultados obtidos no teste de soroneutralização viral.

Alguns aspectos tornam-se importantes para produção de antígenos mais eficientes, como a reavaliação dos processos de purificação antigênica adicionando-se por exemplo uma etapa de Western Blot para avaliar o antígeno produzido. Para o ELISAi seria válido, durante a padronização, o teste de outros tampões na fase de adsorção do antígeno da CIC à placa, bem como o seu tempo de adsorção.

A utilização de um banco de soros de cães com procedência, idade, raça estado de saúde e vacinação conhecidos auxiliaria para algumas inferências na discussão dos resultados encontrados.

6 SUMMARY

Antigens of canine distemper virus (CDV) were prepared from chicken embryo fibroblast (CEF) or green monkey kidney cells (VERO). CDV infected monolayers and used to develop an indirect ELISA (iELISA) for testing CDV specific serum antibodies in dogs. 81 and 60 sera were assayed against CEF CDV antigen or VERO CDV antigen, respectively, all previously tested by serum neutralization (SN). Alternatives for producing iELISA CDV antigen are discussed in perspective of obtaining improved antigen yield as well as a higher specificity and sensitivity.

7 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.J.G.; Shek, W.R.; Summers, B.A. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. **Infect. Immun.** v.37, p.592-600, 1982.
- Appel, M.; Robson, D.S. A microneutralization test for canine distemper virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.37, n.11, p.1459-1463, 1973.
- Barker, 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.
- Bernard, S.L.; Shen, D.T.; Gorham, J.R. Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. **Am. J. Res.** v.43, n.12, p.2266-2269, 1982.
- Bidwell, D.E.; Bartlett, A.; Voller, A. Enzyme Immunoassays for viral diseases. **J.Infect. Dis.**, v.136, p.274-278, 1977.
- Cabasso, V.J. & Cox, H.R. Propagation of canine distemper virus on the chorioallantoic membrane of embryonated hen eggs. **Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.**, v.71, p.246-250, 1949.
- Cabasso, V.J.; Kiser, K.; Stebbins, M.R. Propagation of canine distemper virus in tissue culture. **Proc. Exptl. Bio. Med.**, v.100, p.551-554, 1959.
- Carré, H. On the disease of young dogs. **Comp. Rev. Acad. Sci.** v.140, p.689-690, 1905.

- Côrrea, W.M & Côrrea, C.N.M. **Cinomose** em: *Enfermidades Infecciosas dos mamíferos domésticos*. São Paulo: MEDSI, p.655-670, 1992.
- Dedie, K. & Klapotke, E. Die Zuchtung des virus der hundestaube in gewebsexplantat. **Exptl. Vet. Med.**, v.4, p.137-146, 1951.
- Dunkin, G.W. and Laindlaw, P.P. Studies in dog distemper. I. Dog distemper in the ferret II. Experimental distemper in the dog. **J. Comp. Path. Therap.**, v.39, p.201-221, 1926.
- Fairbanks, G.; Steck, T.L.; Wallach, D. F. H.. Eletrophoresis analysis of the major polipeptides of the human erythrocyte membrane. **Biochemistry**, v.10, p.2606-2617, 1971.
- Gemma, T. et al. (a) Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. **J. Vet. Med. Sci.** v.58, n.6, p.547-550, 1996.
- Gemma T. et al. (b) Serological analysis of canine distemper virus using na Immunocapture ELISA. **J. Vet. Med. Sci.** v.58, n.8, p.791-794, 1996.
- Gillespie, J.H. The significance of passive immunity and the biological tests used in the study of distemper. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, 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. **Arqu. Bras. de Med. Vet. e Zoot.**, v.39, n.4, p.539-545, 1987.
- Green, R.G. Modification of the distemper virus. **J.A.V.M.A.**, v.95, p.465-466, 1939.
- Greene, C.E. Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: _____. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.S.Company, 21-53p, 1990.
- Greene, C.E. & Appel, M.J. Canine distemper. In: Greene, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.S.Company, 226-241p, 1990.

- Haig, D.A. Preliminary note on the cultivation of Green's distemperoid virus in fertile Hen eggs. **Onderstepoort J. Vet. Sci. & Anim. Husbandry**, v.23, p.149-155, 1948.
- Hall, W.W.; Imagawa, D.T. and Choppin, P.W.. Immunological evidence for the synthesis of all canine distemper virus polypeptides in chronic neurological diseases in dogs. Chronic distemper and old dog encephalitis differ from SSPE in man. **Virology**, v.98, p.283-287, 1979.
- Hamburger, D.; Griot, C.; Zurbriggen, A. et al. Loss of virulence of canine distemper virus is associated with a structural change recognized by a monoclonal antibody. **Experientia**, v.47, p.842-845, 1991.
- Karson, D.T. & Bussel R.H. Cytopathic effect of canine distemper virus in tissue culture. **Science**, v.130, p.1708-1709, 1959.
- Krakovka, S.; Higgins, R.J.; Koestner, A. Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. **Am. J. Vet. Res.** v.41, p.284-292, 1980.
- Krakovka, S.; Axthelm, N.K.; Johnson, G.C.. **Canine distemper virus**. In: Richard, G.O.; Krakowka, S.; Blakeslee, Jr. Comparative pathology of viral diseases. Florida: CRC Press, Inc., p.137-164, 1985.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D. **Paramyxoviridae: The Viruses and their replication**. FieldsVirology, Trird Edition, edited by B.N. Fieds, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Lippincott-Raven Publishers-Philadelphia-1996.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227,p.680-685, 1970.
- Lobato, Z.I.P. **Vírus de língua azul: construção de recombinantes em vírus vaccinia e resposta imune**. Belo Horizonte: Escola de Veterinária UFMG, 1996. 219p. Tese (Doutorado).
- Lorry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.

- McDonald, L.J. Factors that can determine the success of routine vaccination protocols. **Veterinary Medicine**, v.87, n.2, p.223-230, 1992.
- Mulley, A. G. Screening tests for the healthy patient. **Med.Clin.of North Am.**, v.71, n.4, p.625-637, 1987.
- Noon, K.F. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **Am. J. Vet. Res.**, v.41, n.4, p.605-609, 1980.
- Ott, R.L. Introduction to Symposium on canine distemper immunization. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 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 Am. J. 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).
- Rockborn, G. Canine distemper virus in tissue culture. **Arch. Ges Virusforsch**, v.8, p.1-8, 1958.
- Shell, L.G. Canine distemper. **Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.**, v.12, n.2, p.173-179, 1990.
- Shin, Y.S.; Mori, T.; Okita, M.; Kawashige, Y.; Kai, C. and Mikami, T. **J. Vet. Med. Sci**, v.57, p.439-445, 1995.
- Souza, P.G. **Perfil sorológico de cadelas e respectivas crias: Transferência e declínio de anticorpos passivos contra o vírus da cinomose canina.** - Belo Horizonte: UFMG - Escola de Veterinária, 1996. (Dissertação de Mestrado).
- Weschler, S.L. et al. A simple method for increased recovery of purified paramyxovirus virions. **J.Virol. Methods**, v.12, p.179-182, 1985.

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

Winters, K.A; Mathers, L.E., Krakowka, S. et al. Immunoglobulin class response to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **Vet. Immunopathol.**, v.5, p.209-215, 1984.