

Gissandra Farias Braz

**PADRONIZAÇÃO E TESTE DA TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA
DIRETA PARA O DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE CANINA.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Prof. Rômulo Cerqueira Leite

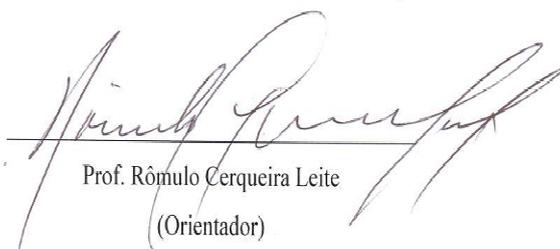
**Belo Horizonte
Escola de veterinária da UFMG
2009**

B819p Braz, Gissandra Farias, 1976-
Padronização e teste da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da cinomose canina / Gissandra Farias Braz. – 2009.
43 p. : il.
Orientador: Rômulo Cerqueira Leite
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

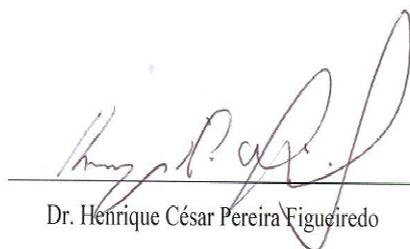
1. Cão – Doenças – Teses. 2. Cinomose – Diagnóstico – Teses. 3. Imunofluorescência – Teses. I. Leite, Rômulo Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 96

Dissertação defendida e aprovada em 16 de fevereiro de 2009, pela Comissão
Examinadora constituída por:



Prof. Rômulo Cerqueira Leite
(Orientador)



Dr. Henrique César Pereira Figueiredo



Dr.ª Zélia Inês Portela Lobato

Meus pais, Maria e José,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença constante em minha vida.

Aos meus pais pela confiança, apoio, amor, incentivo, força e conselhos.

As minhas irmãs, Gislane, Giselda, Gisleide, Dyana, e Graciéla, pelo apoio, amizade, alegria, incentivo e carinho.

Aos meus sobrinhos, Tháfyne, Letícia, Gustavo e Deyvisson pelos momentos de felicidade e carinho.

Ao professor Rômulo pela oportunidade, confiança, conselhos, orientação e exemplo.

Ao Professor Marcos Bryan Heinemann, pelo apoio, paciência, dedicação e amizade.

Ao Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pelo suporte científico e apoio.

A Comissão organizadora, pelas contribuições dadas.

Ao Prof. Almir S. Martins do Instituto de ciências Biológicas pela contribuição e a Prof^a. Zélia Inês Portela Lobato pela ajuda neste trabalho.

Aos companheiros do laboratório de Retrovíruses Fernanda Gonçalves, Daniela Rajão, Fabiana Alves, Elizangela Maira, Helen Del Puerto, Andreza Pain, Roberta Tavares, Philippe Pimenta, Juliana Quintanilha pelo companheirismo, amizade e apoio.

Aos colegas do DMVP Simone Machado, Amanda Soriano, Cíntia Favero, Telma, Filipe do Carmo pelos momentos compartilhados e amizade.

A Sílvia Minharro e Juliano Cezar Minardi pela amizade, conselhos e carinho.

A Eduardo Nunes, Grazielle Cossenzo e Doraci pelo suporte técnico, paciência e dedicação.

A Nádia pela ajuda, pelo auxílio na formatação.

A Escola de veterinária da UFMG, pela contribuição à minha formação profissional.

A Capes pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Sofrer, é só uma vez;

Vencer, é para a eternidade.

Soren Kierkegaard

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRAT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. LITERATURA CONSULTADA	14
2.1 VÍRUS DA CINOMOSE CANINA.....	14
2.1.1 Proteína e replicação viral.....	14
2.1.2 Efeito citopático.....	15
2.2. PATOGENIA.....	15
2.3. SINAIS CLÍNICOS.....	17
2.2. DIAGNÓSTICO.....	17
2.4.1 Métodos diretos.....	17
2.4.2 Métodos indiretos.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 AMOSTRAS.....	19
3.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA.....	20
3.2.1 Cultivo de células de rim de macaco verde (VERO).....	20
3.2.2 Cultivo do vírus da cinomose em vero (VCC).....	20
3.2.3 Titulação do vírus da cinomose.....	20
3.2.4 Produção de antígeno semi-purificado do vírus de cinomose canina.....	21
3.2.5 Dosagem protéica e titulação de antígeno viral semi-purificado.....	21
3.2.6 Produção de soro hiperimune de cinomose canina.....	21
3.2.7 Precipitação de IgG anti-VCC.....	21
3.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page).....	22
3.2.9 Conjugação e purificação IgG anti-VCC em coluna de cromatografia.....	22
3.2.10 Titulação do conjugado IgG anti -VCC ITFC.....	22
a. Padronização de controles com cultivo sob lâminulas em placa de 24 poços.....	22
b. Padronização de controles em citocentrífuga.....	23
c. Padronização de controles com cultivo sob lâmina em placas de Petri.....	23
d. Padronização de controles por sedimentação celular.....	23
e. Imunofluorescência direta para titulação de conjugado.....	24
3.2.11 Imunofluorescência direta (IFD).....	24
a. Técnica.....	24
b. Critérios para leitura das lâminas de IFD.....	24
3.2.12 Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 SINAIS CLÍNICOS.....	26
4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA PARA TITULAÇÃO DO CONJUGADO IgG ANTI-VCC ITFC.....	27
4.2.1 Dosagem protéica e titulação do soro hiperimune, IgG anti-VCC e antígeno.....	27
4.2.2 Padronização do método de obtenção de lâminas controles para IFD e titulação de conjugado IgG anti-VCC ITFC.....	27
4.3 TÉCNICAS DE IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA E DIAGNÓSTICO DA.....	28
CINOMOSE CANINA.....	
4.3.1 Leituras das lâminas de IFD.....	28
4.3.2 Comparação entre IFD e sinais clínicos compatíveis com cinomose.....	29
5. CONCLUSÃO	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ANEXO	38

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1 -	Valores do teste de McNemar dos substratos estudados.	31
Tabela 2 -	Associação do quadro clínico e resultado das amostras em IFD.	31
Tabela 3 -	Concordância de resultados positivos e negativos entre sinais e os espécimes de genital (n=40), nasal (n=39) e ocular (n=39) dos animais com sinais clínicos no teste de imunofluorescência direta, resultado do índice de Kappa.	32
LISTA DE QUADROS		
Quadro 1 -	Características de resultados positivos e negativos de IFD de cinomose canina.	25
Quadro 2 -	Resultados do teste de imunofluorescência direta de animais com e sem sinais clínicos de cinomose canina.	30
LISTA DE ANEXO		
Anexo 1 -	Relação de cães com e sem sinais clínicos de cinomose, idade, sexo, sinais e quadro clínico.	38
Anexo 2 -	Ficha de avaliação clínica	40
Anexo 3 -	Fotografias de IFD de lâminas do epitélio nasal, conjuntiva e genital de cães com suspeitas de cinomose canina. (Imagens 1 a 6)	41
Anexo 4 -	Fotografias de lâminas de células VERO infectadas e não infectadas com VCC e coradas com May Grunwald-Giemsa. (Imagens 7 a 12)	42
Anexo 5 -	Fotografias da titulação do conjugado IgG anti-VCC IFTC através da técnica de IFD em lâminas de células VERO infectadas com VCC e confeccionas pela método de sedimentação celular 4 horas. (Imagens 13 a 18)	43
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1 -	Lâmina de IFD de células do epitélio vaginal (400x), apresentando fluorescência intracitoplasmática e grumos células fluorescentes.	41
Figura 2 -	Lâmina de IFD de células do epitélio vaginal (200x), apresentado fluorescência intracitoplasmática e grumos de células fluorescentes.	41
Figura 3 -	Lâmina de IFD de células do epitélio peniano (1000x), apresentando fluorescência intranuclear.	41
Figura 4 -	Lâmina do epitélio peniano (400x), apresentado células com citoplasma florescente.	41
Figura 5 -	Lâmina de IFD de células da conjuntiva (1000x), apresentado fluorescência intracitoplasmática.	41
Figura 6 -	Lâmina de IFD de células do epitélio nasal (1000x), apresentando fluorescência intracitoplasmática e intranuclear, e grânulos fluorescentes no citoplasma.	41

Figura 7-	Lâmina preparada pela técnica de citocentrifugação (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 200µL, demonstrando aderência e ótima distribuição celular.	42
Figura 8 -	Lâmina confeccionada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (200x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 20µL (lâminas de IF), demonstrando monocamada homogênea.	42
Figura 9 -	Lâmina confeccionada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 20µL (lâminas de IF). Células VERO aderidas, visualização do núcleo e citoplasma e figura de mitose evidente.	42
Figura 10-	Lâmina confeccionada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 40µL (lâmina comum). Células VERO aderidas, visualização do núcleo e citoplasma.	42
Figura 11 -	Lâmina confeccionada pela técnica de cultivo em placa de Petri (400x). Monocamada de células VERO e visualização do núcleo e citoplasma.	42
Figura 12 -	Lâmina confeccionada pela técnica de cultivo em placa de Petri (1000x). Células VERO infectada com VCC apresentando inclusões eosinofílicas no citoplasma.	42
Figura 13 -	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (200x). Título 20 com expressiva fluorescência.	43
Figura 14 -	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 40 com ótimo balanço de fluorescência.	43
Figura 15 -	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 50 com boa fluorescência.	43
Figura 16 -	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 60 com reduzida fluorescência.	43
Figura 17 -	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 70 com discreta fluorescência.	43
Figura 18	Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 80 com escassa fluorescência	43

LISTA DE ABREVIações

BSA - Soro albumina bovina
CC - Cinomose canina
CDV - *Canine distemper virus* (vírus da cinomose canina)
Célula MDCK - Célula de rim de cão
Célula VERO - Célula de rim de macaco verde
CVV - Vírus da cinomose canina
DEAE - celulose - Colunas de Dietilaminoetil celulose
EDTA - Ácido etilnodiamino tetracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
IDGA - Imunodifusão em gel de Agar
IFD - Imunofluorescência direta
IFTC - Corante isoticionato de fluoresceína
IgG - Imunoglobulina G
M.O. I - Multiplicidade de infecção
MEM - Meio essencial mínimo
NaCl - Cloreto de sódio
PBS - Solução salina de fosfato
PI - Pós-inoculação
PO₄ - Fosfato
Proteína F - Proteína de fusão
Proteína H - Proteína hemaglutinina
Proteína N - Proteína do nucleocapsídeo
RNP - Complexo ribonucleoproteico
SDS-PAGE - Gel de eletroforese desnaturante em poliacrilamida
SFB - Soro fetal bovino
SNC - Sistema nervoso central
STV - Solução de tripsina Versene
TCID - Dose de infecção em cultura de tecido

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi padronizar e avaliar o uso da técnica de imunofluorescência direta no diagnóstico da cinomose canina (CC). Amostras do epitélio nasal, conjuntiva e impressão da mucosa genital de 40 cães foram testadas em imunofluorescência direta (IFD) para diagnóstico de CC. Entre os 32 animais com sinais clínicos de cinomose, 30 (93,8%) foram positivos e oito animais sem sinais clínicos de CC foram negativos pelo teste de IFD. A concordância entre os sinais clínicos e IFD foi alta (κ : 0,85), apresentando uma sensibilidade relativa e especificidade de 93,8% e 100%, respectivamente. A impressão de genital apresentou maior positividade (87,5%), seguida pelo nasal (67,7%) e conjuntival (51,6%). Os resultados do teste Q de Cochran mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os espécimes ($Q = 534$). A concordância entre os sinais clínicos e os espécimes testados na IFD foi de 50 a 87,5% entre o resultado positivo, enquanto que o negativo foi 100%. As lâminas de impressão genital mostraram-se maior concordância (κ : 0,73). O diagnóstico positivo de IFD foi mais eficiente nos animais com quadro sistêmico da cinomose.

Palavras chaves: Cinomose canina, diagnóstico, imunofluorescência direta, sinais clínicos.

ABSTRACT

The objective of the present study was standardized and evaluated the Direct immunofluorescence assay (DIF) in the diagnosis of canine distemper. Genital mucous membrane, nasal and ocular smears from 40 dogs (32 with clinically suspected distemper symptoms and 8 with no clinical signs of distemper) was used. Thirty out of 32 dogs under suspicion of disease were positive (93.8%), and 8 out of 8 dogs with no clinical signs of distemper were negative by DIF assay. Our results demonstrated high agreement between clinical signs and DIF diagnosis (κ : 0.85), presenting a relative sensitivity and specificity of 93.8% and 100%, respectively. Positive results in DIF reach up to 87.5% in genital mucous, 67.7% in nasal, and 51.6% in conjunctival smears. The Cochran's Q statistics conclude that there is a statistically significant difference among the three specimens. The results agreement among animals presenting distemper clinical signs and specimens tested in DIF ranged from 50 to 87.5%, and animals with no signs of disease with the same test DIF was 100%. The highest agreement between symptoms and positive results in DIF were observed with genital impression samples (κ : 0.73) and in animals with systemic symptoms.

Keywords: Canine distemper, diagnostic, direct immunofluorescence, clinical signs

1. INTRODUÇÃO

A Cinomose canina (CC) é uma enfermidade viral pantrópica, com manifestações de doença contagiosa aguda apresentando sinais clínicos respiratório, gastrointestinal e ou nervoso. A infecção pode apresentar-se nas formas pulmonar, neurológica e sistêmica e sua intensidade pode variar de acordo com a variante viral, o estado imunológico e a idade dos cães. O Vírus da cinomose canina (VCC) é considerado um dos mais importantes patógenos que acomete cães jovens e adultos em todo o mundo, além de outros carnívoros e mamíferos marinhos.

O VCC é um *paramyxovirus* com diferenças consideráveis na patogenicidade entre suas variantes. É encontrado em todas as excreções dos animais infectados durante a fase sistêmica da doença e a transmissão ocorre usualmente através de inalação de aerossóis.

O diagnóstico clínico é dificultado pelo amplo espectro de sinais, que também podem ser encontrados em outras doenças. Os exames complementares como hemograma, análise de líquido, exame radiográfico, métodos sorológicos não corroboram para o diagnóstico diferencial definitivo.

A confirmação laboratorial da cinomose é realizada por meio de diagnóstico virológico, sorológico, molecular e histopatológico. Algumas destas técnicas tornam-se inviáveis por apresentar altos custos e a obtenção de seu resultado é demorada. A identificação do vírus pela técnica de imunofluorescência direta (IFD) em amostras clínicas de animais com sinais de cinomose tem sido amplamente utilizada na rotina laboratorial. A IFD foi uma das primeiras técnicas que identificou o VCC, e tem demonstrado ser muito sensível e específica no estudo da patogênese e diagnóstico deste vírus. Adicionalmente, é uma técnica simples, prática, acessível e de rápida execução.

O objetivo deste trabalho foi padronizar e avaliar o uso da técnica de imunofluorescência direta no diagnóstico da cinomose canina em amostras de mucosa nasal, conjuntival e genital de animais com e sem suspeita clínica de infecção.

2. LITERATURA CONSULTADA

2.1 Vírus da Cinomose Canina

O vírus da cinomose canina (CCV) é um membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus* e está relacionado com o vírus do sarampo, Rinderpeste bovino, peste de pequenos ruminantes, morbillivirus de cetáceos e cinomose das focas (Harder e Osterhaus, 1997).

Como todos os *Paramyxoviridae* contêm um envelope bilipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira (Lamb e Parks, 2007). O genoma do VCC é de 15.900 pb composto de uma molécula de RNA fita simples de polaridade negativa, com simetria helicoidal não segmentado. São pleiomórficos, muitos, entretanto, são aproximadamente esféricos e medem ao redor de 150-250 nm (Harder e Osterhaus, 1997; Lamb e Parks, 2007).

2.1.1 Proteínas e replicação Viral

O VCC possui seis genes que codificam oito proteínas virais: duas não estruturais (C e V); e seis estruturais (proteína do nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H) e a grande proteína (L) (Harder e Osterhaus, 1997, Lamb e Parks, 2007). As proteínas N, P e L juntamente com o RNA viral constituem o complexo ribonucleoproteico (RNP), que orienta a síntese de RNA mensageiro e a replicação (Messling et al., 2001; Lamb e Parks, 2007).

No envelope estão duas glicoproteínas (H e F) chaves para o processo de infecção, estando relacionadas com a entrada do vírus dentro da célula alvo e são antigenicamente determinantes (Lamb et al.,

2006). A hemaglutinina é a maior determinante do tropismo viral e da extensão da fusão (F-H) na célula infectada, influenciando assim a propagação do vírus e a citopatogenicidade (efeito citopático - ECP) (Messling et al., 2001).

A glicoproteína H media a ligação do vírus ao receptor celular da membrana e a proteína F executa a fusão das duas membranas, viabilizando a entrada do RNP viral para dentro do citoplasma (Lamb, 1993; Messling et al., 2001; Lamb e Parks, 2007). Uma camada interna formada pela proteína da Matriz (M) estabiliza as membranas e media o contato com o nucleocapsídeo (Harder et al., 1997). Depois da infecção, a proteína F expressada na membrana plasmática da célula infectada pode intermediar a fusão com outras células vizinhas formando uma célula gigante multinucleada (sincício) (Rankin, et al., 1972; Lamb e Parks, 2007).

O ciclo de replicação do VCC em cultivo celular é geralmente de 14 a 30 horas (Lamb e Parks, 2007). Biótipos de VCC virulentas e atenuadas se diferenciam pela habilidade de replicação em várias culturas celulares de macrófagos, linfócitos e células epiteliais. Amostras vacinais (Rockborn, Onderstepoort, Convac e Lederle, etc.) se replicam em todos estes tipos celulares, enquanto os isolados virulentos requerem adaptação (várias passagens cegas) para obter uma replicação eficiente em linhagens epiteliais, tais como VERO e MDCK (Evans et al., 1991; Lednicky et al., 2004). Cornwell et al. (1971) descreveram a replicação do VCC (amostra CDV Glasgow 841) em células MDCK durante um período de 72 horas: Oito horas pós-infecção (PI) nenhuma mudança ultra-estrutural foi encontrada, mas 12 horas PI obtiveram evidências do nucleocapsídeo dentro do citoplasma, através de um pequeno foco perinuclear do nucleocapsídeo. Em 18 horas PI, os focos são numerosos e o processo de brotação do vírus pela superfície celular se inicia com o alinhamento do nucleocapsídeo abaixo da membrana plasmática, formando uma configuração simétrica. Às 24 horas PI há uma protrusão e a pressão nesta área leva

a formação de um 'botão' viral, e finalmente a liberação do vírion. O processo de brotação continua de 24 a 72 horas PI, a duração é relacionada com a proporção de degeneração celular.

2.1.3 Efeito citopático

O VCC possui uma característica citopatogenicidade que é evidenciada pelo efeito citopático (ECP), tais como sincício, inclusão citoplasmática e intranuclear, arredondamento celular, citólise e apoptose. A replicação de CDV em células induz a formação de células gigantes com inclusões eosinofílicas intracitoplasmática e intranuclear (Karzon e Bussell, 1959; Martella e Buonavoglia, 2008). Inclusões eosinofílicas surgem no citoplasma entre 24 e 48 horas PI, que consiste de uma massa de cobertura do nucleocapsídeo com material granular entremeado com sistema de túbulos e vesículas, semelhantes ao complexo de golgi. Após 48 horas PI, como mecanismo de defesa, esta estrutura sem as vesículas e com microvilos é expulsa da célula. Seguindo 60 horas PI há uma marcante formação das microvilosidades ocorrendo depois à fusão celular. Inclusões intranucleares eosinofílicas ocorrem depois da formação de sincício, que consiste de uma extensão rígida do nucleocapsídeo sem o material granular associada com a forma citoplasmática (Cornwell et al., 1971).

2.2 Patogenia

Após entrar em seus hospedeiros pela via oral ou nasal, o VCC inicia sua replicação nos tecidos linfóides (Appel, 1969). Os primeiros lugares de replicação são os macrófagos das tonsilas (Liu e Coffins, 1957) e os linfonodos bronquiais (Coffin e Liu, 1957; Appel, 1969; Krakowka et al., 1980). No segundo dia pós-infecção (PI) há uma progressão, aumentando o número de linfócitos e células reticulares infectadas. Em seguida o vírus se distribui pelos linfonodos mediastinais e mesentéricos, baço, fígado e tecidos linfóides do trato gastrointestinal (3 a 4 dias), sendo que a expansão viral ocorre pelas vias linfáticas e

sanguíneas (Liu e Coffin, 1957; Appel, 1969).

Uma viremia na primeira semana pós-infecção coincide com a proliferação viral nos órgãos linfóides associada à leucopenia por linfopenia, como conseqüentes danos às células linfóides B e T (Liu e Coffin, 1957; Schobesberger et al., 2005, Greene e Appel, 2006; Rudd et al., 2006; Bonami et al., 2007). No quinto e sexto dia PI se espalha para o pulmão e lâmina própria da nasofaringe e mucosa conjuntival (Appel, 1969). Uma segunda viremia, com vírus associado à célula e fase plasmática pode ocorrer entre o oitavo ao décimo quarto dia PI, sendo que algumas vezes podem ser observadas até o vigésimo quarto dia PI (Appel, 1969; Schobesberger et al., 2005; Greene e Appel, 2006; Rudd et al., 2006). O estágio virêmico pode durar até seis semanas (Cello et al., 1959).

Durante o período de viremia, o curso da infecção e a severidade dos sinais clínicos variam em conseqüência da virulência do vírus, idade e estado imune do animal. Se os cães desenvolverem uma forte resposta imune, podem se recuperar da infecção (Appel, 1969; Martella et al., 2008), e o vírus desaparece dos tecidos dentro de 10 a 14 dias (Krakowka et al., 1980). Entretanto, àqueles que produzem níveis de anticorpos insuficientes, o vírus permanece nos tecidos linfóides e continua a sua dispersão para pele, glândula endócrina e exócrina, trato respiratório e reprodutivo (Appel, 1969; Krakowka et al., 1980).

A ausência de uma resposta imune na fase inicial da infecção leva a um quadro fatal (Ho e Babiuk 1979a), possivelmente, devida à extensiva replicação viral em tecidos linfóides e subseqüentes imunossupressão pela depleção de linfócitos T e B (McCullough et al., 1974; Ho e Baiuk 1979b; Krakowka et al., 1980).

A invasão do vírus no sistema nervoso central (SNC) ocorre com mais de 15 dias PI, após sua expansão nos tecidos linfáticos e epiteliais, sendo a via de acesso o bulbo olfatório ou a hematogênica através dos linfócitos infectados (Liu e Coffin, 1957;

Rudd et al., 2006). A encefalite é uma causa comum de morte em animais acometido por cinomose (Summers e Appel, 1994). A desmielinização é uma característica constante na fase aguda de infecção (Bathen-Noethen et al., 2008) e é induzida pela presença do vírus em células nervosas (Summers Appel, 1985; Summers e Appel, 1994). O VCC causa uma doença crônica desmielinizante em decorrência da persistência viral no CNS, que é multifocal e dependente de propriedades do hospedeiro e do vírus. O fator relacionado ao vírus inclui mudanças conformacionais nas proteínas virais N e M após interação com diferentes determinantes moleculares (Stettler et al., 1997) ou a proteína viral H das amostras neurovirulentas, as quais são mais eficientes em mediar à infecção em neurônios, o que ocorre provavelmente devido a sua maior afinidade pelos receptores destas células (Bonami et al., 2007).

A encefalite aguda pelo VCC, que ocorre no início da infecção em cães jovens ou animais imunossuprimidos, é caracterizada pela replicação viral direta e injúria, causando lesões multifocais na massa branca e cinzenta, geralmente é acompanhada de sinais clínicos sistêmicos. Enquanto na encefalite VCC crônica, é um processo imunopatológico vírus independente, que afeta predominantemente as células dendríticas, onde a reação do sistema imune é o mecanismo patogênico da desmielinização (auto-imune), e com freqüência, não manifesta sinais clínicos sistêmicos (Koutinas et al, 2002; Gebara et al, 2004b; Greene e Appel, 2006).

O VCC pode persistir em alguns tecidos do cérebro (locais não afetados) de animais sobreviventes da infecção (Greene e Appel, 2006). A persistência do vírus pode induzir uma encefalite tardia ou a hiperqueratose dos coxins plantares, pelo qual o vírus fica restrito aos neurônios e substância branca do encéfalo e células epidérmicas (Appel, 1969). Animais com hiperqueratose nasal ou digital, usualmente, também apresentam complicações neurológicas (Greene e Appel, 2006), isso porque o SNC e os

queratinócitos são infectados na segunda viremia (Gröne et al., 2004).

2.3 Sinais clínicos

Os sinais clínicos de cinomose dependem da virulência do vírus, condições ambientais e a resistência individual de cada hospedeiro (Greene e Appel, 2006). O período de incubação é variável, podendo ir de uma a quatro semanas ou mais (Appel et al., 1982). A infecção pode ser de subclínica a aguda, com ou sem envolvimento de sinais nervosos (Appel e Summers, 1999).

A infecção aguda caracteriza-se por ser mais comum em animais com idade entre 4 a 6 meses, após a perda da imunidade passiva, apresentando febre, moderada conjuntivite serosa a mucopurulenta, tosse seca, ruídos respiratório (inferior), depressão, anorexia, vômito e diarreia. Uma forma branda da doença clínica pode ocorrer e os sinais incluem apatia, diminuição de apetite, febre e infecção do trato respiratório superior (Greene e Appel, 2006).

Os sinais são exacerbados pela infecção secundária bacteriana e incluem descarga nasal purulenta, tosse, dispnéia, pneumonia, diarreia, vômito e pústulas. Em cães na fase de crescimento, a hipoplasia dentária após infecção é uma observação comum (Appel e Summers, 1999). Entre os sinais dermatológicos, a hiperqueratose de coxins e focinho é um achado comum (Greene e Appel, 2006)

Durante o curso inicial da doença ocorrem dois picos febris que é acompanhado de leucopenia. A contagem de linfócitos retorna a normalidade aproximadamente em oito semanas PI em cães que se recuperaram de cinomose, mas permanece diminuído em cães moribundos. (Liu e Coffin, 1957; Appel, 1969; McCullough et al., 1974; Schobesberger et al., 2005; Rudd et al., 2006; Bonami et al., 2007).

Manifestações neurológicas podem surgir em uma a três semanas após os sinais sistêmicos, associados ou não com

manifestações clínicas sistêmicas, caracterizadas por inflamação da substância cinzenta no cérebro e cerebelo. Os sinais clínicos observados são incoordenação motora, andar em círculo, nistagmo, paralisia parcial ou completa dos membros, convulsão, rigidez cervical e demência (Greene e Appel, 2006). Alterações no SNC podem aparecer meses ou anos depois da infecção primária, desenvolvendo uma meningo-encefalite crônica (Rima et al., 1987). A fase crônica é representada pela persistência viral e os animais apresentam somente sinais clínicos restritos ao SNC (Krokowka et al., 1980)

Baseados nos sinais clínicos e na localização tecidual do vírus, Coffin e Liu (1957) dividiram o quadro clínico de cinomose em três categorias: infecção sistêmica (febre, conjuntivite, pneumonia, hiperqueratose de pele e diarreia); infecção sistêmica e nervosa (sinais sistêmicos e tique nervoso, convulsão e ataxia) e infecção nervosa (sintomas de SNC).

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da cinomose canina baseado nas suspeitas clínicas e na patologia clínica não auxilia no diagnóstico definitivo (Greene e Appel, 2006). A CC pode ser diagnosticada por métodos diretos, tais como, isolamento, histopatologia, imunohistoquímica, imunofluorescência direta, métodos moleculares e indiretos como ELISA, imunofluorescência indireta, soroneutralização e outros.

2.4.1 Métodos diretos

a. Isolamento viral

O isolamento do VCC de animais infectados é difícil, e às vezes, inviável quando o animal não está no estágio agudo da infecção. O isolamento pode ser realizado por meio da inoculação de amostras clínicas (secreção nasal, ocular e sangue) em células de linhagem, como células MDBK e VERO. Os efeitos citopáticos observados são: lise celular, arredondamento celular, descolamento da monocamada, formação

de sincício. A monocamada pode ser corada com cristal violeta e corpúsculos de inclusão podem ser vistos tanto intranuclear como intracitoplasmático (Evans et al., 1991; Mochizuki, 2005; Yamaguchi et al., 2005, Lan et al., 2006).

b. Diagnóstico molecular

Métodos que moleculares, como RT-PCR, RT-Nested-PCR e Real-time RT-PCR têm contribuído para o diagnóstico de cinomose. Amostras como sangue, urina, soro, secreção nasal ou ocular e fragmentos de órgãos podem ser utilizados para a detecção do VCC (Kim et al., 2001; Józwik e Frymus, 2005; Elia et al., 2006; Kim et al., 2006).

c. Histopatologia

O VCC produz inclusões intracitoplasmáticas ou intranucleares em diversos tecidos as quais podem ser visualizadas após coloração pelos métodos de Sellers, Shorr ou Giemsa (Liu e Coffin, 1957; Kristensen e Vandeveld, 1978; Queiroz da Silva et al., 1999; Queiroz da Silva, 2004). Histologicamente as inclusões são compostas por agregados de nucleocapsídeos e restos celulares resultantes da ação vírica (Greene e Appel, 2006).

d. Imunohistoquímica

O diagnóstico da cinomose canina pela da técnica de imunohistoquímica pode ser realizado ante-morte utilizando mucosa nasal, epitélio dos coxins e pele (tecido do pescoço dorsal), ou pós-morte a partir de tecidos do baço, tonsilas, linfonodos, estômago, pulmão, duodeno, bexiga e cérebro (Haines et al., 1999; Damiàn et al., 2005; Greene e Appel, 2006). Os resultados são mais satisfatórios na fase aguda da infecção (Greene e Appel, 2007).

e. Imunofluorescência

- A técnica de IFD

A imunofluorescência pode se executada em duas formas: Imunofluorescência direta

(IFD) e imunofluorescência indireta (IFI). No procedimento direto o anticorpo anti-cinomose é marcado com corante isotiocianato de fluoresceína (ITFC). Já no método indireto, o teste é realizado em duas etapas, na primeira introduz o anticorpo anti-cinomose não marcado, na segunda etapa um anticorpo anti-imunoglobulina é adicionado (Santos et al., 2002).

A qualidade do conjugado com ITFC é muito importante para um adequado desempenho da técnica de imunofluorescência e sua especificidade é um ponto chave. The e Feltkamp (1970a, 1970b), avaliaram as condições de conjugação de anticorpos com ITFC, e obtiveram conjugados com ITFC de relativa pureza quando obtidos pela técnica de cromatografia DEAE Sephadex, e uma concentração de proteína inicial de 25mg/mL conjugada durante 30 a 60 minutos sob temperatura ambiente em pH 9,5 resultaram em conjugados de alta qualidade. Quando estas condições estão padronizadas a concentração final de fluoresceína – proteína (F/P) depende da quantidade de ITFC usada.

Segundo Goldstein et al. (1961), a não especificidade do conjugado está diretamente relacionada com o número médio de fluoresceína ligada por molécula de anticorpo, o ideal é que estes estejam uniformemente agrupados e em concentrações apropriadas.

A especificidade do conjugado também foi avaliada por Cello et al. (1959), através da utilização de controles, dentre eles, esfregaços sanguíneos de um cão sem e com cinomose. Este último foi tratado com IgG anti-VCC e depois corado com anticorpo fluorescente para checar a inibição da fluorescência, e duplicatas dos esfregaços sanguíneos também foram tratadas com soro de coelho. Além de corar os esfregaços de bexiga, traquéia, conjuntiva e pelve renal com conjugado anti-VCC ITFC e um esfregaço sanguíneo com conjugado anti-*brucella* ITFC (rato), os quais apresentavam corpúsculos de inclusões sugestivos de cinomose, e todos os esfregaços que continham inclusões exibiram uma fluorescência específica. As

lâminas positivas tratadas com a IgG anti-VCC apresentaram uma diminuição da intensidade e do número de células fluorescentes, as pré-tratadas com soro de coelho não apresentaram inibição da fluorescência e as coradas com o conjugado não específico (*Brucella*) não ocorreu à reação de fluorescência. Segundo Liu e Coffin (1957) quando uma amostra infectada é corada com um conjugado heterólogo não ocorre reação específica e um pré-tratamento das lâminas com soro homólogo inibiria a reação de fluorescência.

- Aplicação de IFD no diagnóstico de cinomose

A técnica de imunofluorescência aplicada ao diagnóstico de cinomose canina é utilizada desde o primórdio da descoberta do vírus de cinomose, e tem sido a técnica de escolha para o diagnóstico laboratorial da enfermidade (Queiroz da Silva et al., 1999; Queiroz da Silva et al., 2004).

Várias amostras clínicas podem ser utilizadas na IFD, como esfregaço nasal, conjuntival, sanguíneo e impressão de genital. No sangue o vírus pode ser revelado a partir do terceiro, quarto dia PI indo até o 17º dia, sendo detectados dois dias antes do pico febril. Em esfregaço conjuntival o vírus pode ser observado a partir do nono dia PI, sendo que neste substrato a detecção depende do quadro febril ou se o animal esta na fase aguda ou crônica. Mas os esfregaços conjuntivais tendem a ser positivos intermitentes, enquanto o sangue é consistentemente positivo. Células da mucosa genital foram positivas no quinto dia (infecção experimental via intracranial e intravenosa) e do sétimo ao 10º dia (oronasal) (Liu e Coffin, 1957; Coffin e Liu, 1957; Motohashi et al., 1969; Józwick e Frymus, 2005).

O VCC desaparece dos tecidos epiteliais três semanas depois da infecção, mas foi encontrado em células genitais no 21º dia PI em cães com sintomas nervosos (Fairchild et al., 1967). O vírus pode ser persistente (3 a 6 semanas) nas células do SNC e nas células epiteliais dos coxins (Appel, 1969).

O vírus em tecido epitelial é mais freqüentemente detectado dentro das três primeiras semanas da doença clínica, e menos detectável em três a oito semanas (Fairchild et al., 1971).

A fluorescência observada apresentava-se de forma granular ou ocupava metade do citoplasma, e cerca de 1% ou menos continham antígenos virais detectáveis, mas foram suficientes para determinar o diagnóstico positivo (Liu e Coffin, 1957). Os esfregaços corados por imunofluorescência apresentavam muitas células epiteliais positivas e demonstraram ser mais fácil e específico que as lâminas coradas com corantes convencionais, mas somente em animais na fase aguda da doença (Coffin e Liu, 1957).

Em relação à técnica de leitura de imunofluorescência, Fairchild et al. (1971), estabeleceram que as lâminas tornariam satisfatórias para o diagnóstico se tivessem 50 ou mais células epiteliais e demonstraram a especificidade da reação com a introdução de um controle negativo e positivo, além de determinar que o examinador das lâminas não tivesse conhecimento do diagnóstico clínico. Eles encontraram vários espécimes com número de células insatisfatório, principalmente o conjuntival, as quais foram descartadas.

2.4.2 Métodos Indiretos

Dentre os testes sorológicos empregados no diagnóstico da cinomose estão os ensaios imunoenzimático (ELISA), fixação de complemento, soroneutralização, imunoperoxidase, imunofluorescência indireta e imunocromatografia (Appel, 1969; Noon et al., 1980; Gemma et al., 1996; Olson et al., 1999; Mesling et al., 1999; Rikula et al., 2000; Masuda et al., 2006; An et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Amostras clínicas de 40 cães (21 machos e 19 fêmeas) foram coletadas em clínicas

veterinárias, canis particulares e no hospital veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais em Belo Horizonte, dos quais 32 apresentando sintomatologia compatível com cinomose, com sinais sistêmicos e neurológicos, e oito cães sem suspeita clínica de cinomose, com idades de 45 dias a oito anos (anexo1). O quadro clínico foi correlacionado ao estado de vacinação.

Antes da coleta de material cada animal foi avaliado e seus dados clínicos preenchidos em uma ficha (anexo 2). Os espécimes coletados foram amostras do epitélio nasal e conjuntival, impressão da mucosa genital e sangue total. Após a coleta os espécimes foram preservados em gelo até serem encaminhadas ao laboratório para o processamento.

Para a técnica de imunofluorescência direta, as células epiteliais nasais e conjuntival foram obtidas através da introdução e rotação de uma zaragatoa estéril na cavidade nasal e no terço médio do saco conjuntival, respectivamente. As amostras clínicas foram coletadas através de movimentos rotatórios em sentido horário da zaragatoa e imediatamente transferidas para lâmina de vidro com movimento em sentido contrário para dispersão das células. As células do epitélio genital foram obtidas pela impressão da lâmina na mucosa genital. As lâminas foram secas ao ar, fixadas em acetona por 30 min a -20°C e em seguida armazenadas a -80 até serem processadas.

O sangue total foi adquirido por venopunção da veia braquial ou jugular utilizando agulha individual e tubo a vácuo (sem e com anticoagulante (EDTA)). O soro foi obtido após centrifugação a 2500 x g por 10 min. e armazenado a -20°C.

3.2 Imunofluorescência direta

3.2.1 Cultivo de células de rim de macaco verde (VERO)

Células da linhagem VERO (ATCC, CLL-81, USA) foram cultivadas em meio essencial

mínimo (MEM –Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.(A)), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A), 0,5% de anfotericina B (50µg) e 1% de penicilina e estreptomicina (200UI e 200µg, respectivamente) em garrafas de 75 e 150cm². As células foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C.

3.2.2 Cultivo do vírus da cinomose canina (VCC) em célula VERO

A amostra de VCC Lederle (ATCC VR-128TM) com título de 2 x 10^{5,5} TCID₅₀/mL foi cultivada em célula Vero em garrafas de 150, 300, 690 e 890cm² de área de cultivo com uma concentração de 50.000 células/cm². A monocamada, com 70 a 90% de confluência, recebeu 5 a 15 mL do inóculo diluído em MEM contendo 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina na proporção de 1:3. Seguida uma hora de adsorção em estufa com 5% de CO₂ a 37°C sendo homogeneizado a cada 15 min., o inóculo foi retirado e acrescentado MEM com 3% de SFB e mantido em estufa a 37°C por três dias. Após o aparecimento do efeito citopático (ECP) característico, com a formação de sincícios e destruição de aproximadamente 75% da monocamada, seguiu-se três ciclos de congelamento e descongelamento. O sobrenadante foi alíquotado em criotubos de 1,0 mL, titulado e armazenado a -80°C.

3.2.3 Titulação do vírus da cinomose

A suspensão viral foi titulada em microplacas com 96 poços. Foram feitas nove diluições seriadas decimais (10⁻¹ a 10⁻⁹) do vírus em MEM sem SFB e distribuídas, em octoduplicatas de cada diluição (50 µL), a uma monocamada previamente preparada com uma concentração de 50.000 cel/cm² (16.000 cel/poço). Três colunas foram reservadas para controle de célula. Adicionou-se 50µL MEM com 5% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina. Após cinco dias de cultivo em estufa de CO₂ a 37°C a leitura foi realizada avaliando o ECP,

formação de sincício, arredondamento celular e destruição da monocamada. O título foi obtido ($2 \times 10^6,5$ TCID₅₀/mL) segundo Reed e Muench (1938).

3.2.4 Produção de antígeno semi-purificado do vírus de cinomose canina

A suspensão viral de VCC foi clarificada por centrifugação a $5000 \times g$ por 20 min a 4°C, para remover os restos celulares. O sobrenadante foi coletado e o sedimento celular desprezado. A suspensão contendo partículas virais foi concentrada e semi-purificada por ultrafiltração em Amicon 8400 (Stirred ultrafiltration cell, Millipore, Ontario-CA) usando membrana ultracell regenerada de celulose, 30 kDa, 76 mm (Millipore, Ontario-CA). Cerca de 500 mL foi concentrado 50 vezes sob pressão constante de nitrogênio (30 psi) e velocidade lenta. Este foi dialisado em tubos de diálises de 15 mm de diâmetro (Dialys tubing - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S. A) em dois litros de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4) durante 24 hs, efetuando-se, após 12hs, uma troca de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4). Posteriormente a diálise, o antígeno foi alíquotado e armazenado a -80°C.

3.2.5 Dosagem protéica e Titulação do antígeno de cinomose semi-purificado

A concentração de proteína do antígeno viral foi determinada pelo método de Lowry (Harris, 1978).

A titulação foi obtida por IDGA com 1% de Agar noble em tampão borato (NaOH 0,05, H₃BO₃, pH 8,6) através de diluições seriadas na base dois e tendo como padrão positivo um soro hiperimune de cinomose (Cinoglobulin, Biovet)

3.2.6 Produção de soro hiperimune de cinomose canina

O soro hiperimune foi obtido de um ovino macho, mestiço, de oito meses de idade. Primeiro, inoculou-se por via subcutânea 100µg/mL de antígeno (item 3.2.4) da VCC inativado com 0,1% de formaldeído, diluído

em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4) e emulsificado, proporcionalmente, ao adjuvante completo de Freund (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A). Aplicações seriadas, pela mesma via, com adjuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) (Sigma) foram realizadas após 14, 21 e 28 dias. Coletou-se sangue antes de cada imunização para titulação do soro com a técnica de IDGA. A sangria foi realizada após quatro inoculações. O nível de anticorpo foi determinado por soroneutralização através da técnica de microtitulação (Appel e Robson, 1973). O título foi expresso como inverso da maior diluição que contém a DE50 (Dose efetiva 50%).

3.2.7 Precipitação de IgG anti-VCC

Para obtenção de IgG anti-VCC foi utilizado o protocolo segundo McKinney e Parkinson (1987). O anti-soro VCC produzido em ovino foi precipitado pela técnica de sulfato de amônio e ácido caprílico. O soro (35 mL) foi inativado a 56°C por 20 min, depois diluído 1:5 em tampão acetato de sódio (60mM) e o pH ajustado para 4,5. O ácido caprílico (25µl/mL de soro) foi adicionado lentamente, em seguida deixado sob agitação por 30 min. A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g$ por 30 min, e o sobrenadante filtrado e diluído em 1:10 de PBS 10x EDTA 100mM (1 PBS 10X:9 sobrenadante). O pH foi ajustado até 7,4 com NaOH 1M e a solução de sulfato de amônia com 45% de saturação (v/v) foi adicionada lentamente sob agitação, deixando agitar por 30 min, e centrifugou a $5000 \times g$ por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4) na proporção de 1:10 do volume inicial de soro (3,5 mL). A suspensão de imunoglobulina foi dialisada com 100 vezes o volume de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4) por 24 h, efetuando uma troca de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7,4) com 12 h. A quantificação protéica foi determinada pelo método de Lowry (Harris, 1978). O nível de anticorpo foi avaliado por soroneutralização através da técnica de microtitulação (Appel e Robson, 1973).

3.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada para analisar o grau de pureza da IgG, por meio do perfil eletroforético. O método utilizado foi eletroforese em placa vertical de mini gel de poliacrilamida (Mini-Protean®II/Bio-Rad) contendo SDS, com sistema descontínuo de pH, segundo descrito por Laemmli (1970). O gel de separação usado para a análise da amostra foi de 7,5% e o de concentração 4%, que foi confeccionado com bis-acrilamida 40%, Tris HCl (1,0M, pH 6, 8, SDS 10% p/v, persulfato de amônio 10% p/v, 30 µl de TEMED). A corrida foi realizada sob as seguintes condições: 60 min em TBE (Tris 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,05%, pH 8,3) a 150V e 40mA. O padrão de peso molecular foi BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen, USA).

A IgG anti-VCC foi diluída 1/10, 1/50, 1/100, sendo incluídos soro e IgG de carneiro para facilitar a identificação da banda específica. As amostras foram desnaturadas e solubilizada pela adição de tampão de amostra (Tris-HCL 0,5M, pH 6,8; 10% SDS; 1% de glicerol, 0,05% de azul de bromofenol), com e sem 2-mercaptoetanol, depois levada a banho-maria por 10 min. O gel foi corado em azul de comassie por 20 min e descorado por duas horas com solução descorante (metanol 10%, ácido acético 7%, água destilada 1000 mL qsp.), sob agitação.

3.2.9 Conjugação e purificação IgG anti-VCC em coluna de cromatografia

A IgG anti-vcc foi conjugada em coluna de cromatografia baseado na técnica de Hudson e Hay (1989), com algumas adaptações. A concentração protéica da IgG anti-VCC foi ajustada para 20 mg/mL com tampão carbonato (0,5 M pH 9,5) e foi conjugada com 0,05 mg de isotiocianato de fluoresceína (ITFC) para cada 1mg de proteína. O ITFC foi dissolvido em tampão-bicarbonato (0,5 M pH 9,5) resfriado na proporção de 1/5 do volume da IgG anti-VCC. A amostra foi colocada em frasco

âmbar e o ITFC foi adicionado gota a gota sob agitação e homogeneizando por 10 minutos e depois mantido sob agitação por 18 h a 4°C. A proteína conjugada foi separada do fluorocromo livre através de purificação em coluna de cromatografia equilibrada com Sephadex G-25 (Pharmacia Biotech, SP, Brasil). O conjugado foi alíquotado, adicionado um crioprotetor (glicerol) na proporção 1/10 e estocado a -20°C.

3.2.10 Titulação do conjugado IgG anti-VCC ITFC

Para determinação do título do conjugado foi necessária uma padronização para obtenção de lâminas para controle positivo e negativo. O conjugado foi testado nas diluições 1/20, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640. O vírus da cinomose canina Lederle (2 x 105,5TCID/mL) foi cultivado em célula Vero, considerando-se o ciclo de replicação em cultivo celular de 14 a 30 horas, segundo Lamb e Parks (2006). Procedeu-se a titulação seguindo o protocolo de imunofluorescência (tópico E).

a) Padronização de controles com cultivo sob lamínulas em placa de 24 poços

- Preparo da monocamada e cultivo viral

As lamínulas 11x22 mm (Thomas, Red lobel-USA) foram cortadas ao meio, previamente imersas em álcool 70% e autoclavadas, em seguidas colocadas na superfície de três placas de 24 poços. Adicionou-se a suspensão celular de Vero na concentração de 50.000 cel/cm² (95.000 cel/poço em 300 µl) e meio (MEM, Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A) suplementado com 5% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina. Após 24 horas as monocamadas foram lavadas duas vezes com PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4), e adicionado 200 µL do vírus diluído 1:3 (M.O.I = 4,42) em MEM sem soro fetal bovino e com 0,5% anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina. Metade da placa foi de controles positivos e a outra de

negativos, distribuiu-se 200µL de suspensão viral e MEM (com antibiótico), respectivamente. Após uma hora de adsorção em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, sendo homogeneizado a cada 15 min, o inóculo foi retirado e acrescentou-se 2 mL de MEM com 3% de SFB, depois a placa foi cultivada em estufa sob 5% de CO₂ a 37°C. As placas foram fixadas (50% acetona e 50% de metanol) com 18, 24 e 30 horas lavadas com PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4), secadas e congeladas a -20°C.

- Imunofluorescência direta (IFD) para titulação de conjugado

As placas foram descongeladas e secas em estufa a 37° por 5 minutos e procedeu-se a IFD com as lamínulas dentro destas. O conjugado foi diluído (30µL) com 0,002% de azul Evans em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) e distribuído sobre a lamínula dos respectivos poços e homogeneizado. Cada diluição foi realizada em duplicata. As placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 45 min., depois imersas com PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) por 10 min. Cada poço foi lavado duas vezes com água ultra pura por 1 min. e secas em estufa a 37°C por 10 min. As lamínulas, positiva e negativa, foram retiradas dos poços, com auxílio de uma agulha e pinça, depois depositadas na lâmina com glicerina tamponada, uma lamínula 11 x 22 mm foi colocada sobre estas.

b) Padronização de controles em citocentrífuga

O VCC foi inoculado (M.O. I de 1,68) em célula Vero na concentração de 50.000 cel./cm² (12,5 x10⁵ células em 1 mL) em garrafas de 25 cm² e cultivado por 18 horas, paralelamente com um controle negativo. As garrafas foram tripsinizadas e uma alíquota (25 µL de suspensão: 225 de azul de tripan 0,03%) foi retirada para determinar concentração celular em câmara de Neubauer (10,25 x 10⁵ cels/mL). Em microtubos separados, estabeleceram-se concentrações celulares de 80.000,

100.000, 150.000 e 200.000 células por mL, usando MEM como diluente. Volumes de 50, 100, 150 e 200µL de cada concentração foram distribuídos nos suportes das lâminas da citocentrífuga (Citospin 248, Fanen) e centrifugados a 1000 RPM 50 seg. Depois de secas, foram fixadas em acetona 30 min a -20° C e armazenadas a -20°C. Cada Lâmina foi corada pela coloração rápida panótico (Laborclin) para avaliar a concentração e distribuição celular.

c) Padronização de controles com cultivo sob lâmina em placas de Petri

Cinco lâminas de vidro, previamente imersas em álcool e autoclavadas, foram distribuídas em placas de petri de polipropileno estéreis (diâmetro: 14 cm, área: 153,86cm²), uma placa para cada controle. Uma concentração de 50.000 células/cm² (76,93x 10⁵ células) foi distribuída sobre as lâminas para um volume final de 20 mL de meio (MEM, Sigma) suplementado com 5% de SFB, 0,5% de anfotericina B e 1% penicilina-estreptomicina e mantidas até 24 horas em estufa 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4), seguindo-se da adsorção do VCC (0,82 M.O.I) diluído 1:4 (4 a 5 mL/ placa) por uma hora, sendo homogeneizado a cada 15 min. O inóculo foi retirado e acrescentou-se 20 mL de MEM com 3% de SFB e incubado em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após 18 a 20 horas, o meio foi retirado e a monocamada foi lavada com PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4). As lâminas foram secas no fluxo laminar e fixado em acetona por 30 min a -20°C.

d) Padronização de controles por sedimentação celular

O vírus com multiplicidade de infecção de 1,68 foi cultivado em célula Vero na concentração de 50.000 cel./cm² (12,5 x10⁵ células em 1 mL) em garrafas de 25 cm² por 18 a 20 horas, paralelamente com um controle negativo. As monocamadas foram manipuladas por duas técnicas:

Técnica 1: as monocamadas foram tripsinizadas com 2 mL de STV e uma alíquota (25 µL de suspensão: 225 de azul de tripan 0,03%) foi retirada para determinar concentração celular em câmara de Neubauer (1,25 x10⁵ seu/mL). A suspensão foi centrifugada a 2000 RPM por 10 min, o sobrenadante descartado e lavado duas vezes com 1 mL de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4). O centrifugado foi ressuspendido em 500µl de PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) e 500µL MEM sem SFB.

Técnica 2: a monocamada foi tripsinizada com 1 mL STV e adicionado 1 mL de meio com 1,5% de SFB, efetuada a contagem celular e estabelecido uma concentração de 150.000/mL.

A suspensão celular das técnicas 1 e 2 foi distribuída em lâminas de imunofluorescência (lâminas marcadas com doze poços) e de vidro comum (lâminas não marcadas). As lâminas para uso na titulação do conjugado foram confeccionadas separadamente em lâminas de imunofluorescência com 20 µL de suspensão celular infectada (positiva) e não infectada (negativa) (Anexo 4 - Imagem 8 e 9).

Nas lâminas referentes aos controles de reação (positiva e negativa) foram distribuídos 20 µL de suspensão celular, horizontalmente, nos poços superiores das lâminas controle negativo e inferior o positivo. Nas lâminas de vidro comum também foram utilizadas pra confecção de controles, adicionando 20 a 40 µL em duplicatas nas lâminas. Em seguidas as lâminas foram mantidas em câmara úmida a 37°C com 5% de CO₂ por 1 h e 30 min., 4 e 21 horas. Decorrido o tempo o meio foi aspirado, o sedimento imediatamente seco e as lâminas foram fixadas em acetona por 30 min., -20°C e armazenadas a -20°C. Cada lâmina foi corada com May Grunwald-Gimsa para averiguar a celularidade.

e) Imunofluorescência direta para titulação de conjugado

As lâminas foram descongeladas, secas e delimitadas com uma tampa de agulha de

seringa e esmalte (10 poços para lâminas de placa de Petri e dois poços para de sedimentação). Duplicatas de 15 µL do conjugado diluído em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) contendo 0,002% de azul de Evans foram distribuídas nos respectivos poços (controle negativo e positivo). Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 45 min em câmara úmida, e lavadas por imersão em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) por 10 min e duas vezes com água por 1 min. Após secagem em estufa 37°C por 5 min as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH entre 8,0 a 8,5) e lamínula. A leitura foi realizada em microscópio Olympus com sistema de epiluminação em aumento de 400x e 1000x. O título foi estabelecido como inverso da maior diluição do conjugado que diferenciou o positivo do negativo.

3.2.11 Imunofluorescência direta (IFD)

a) Técnica

As lâminas de impressão genital, zaragatoa nasal e ocular foram descongeladas, secas a temperatura ambiente e demarcada com círculos (3 a 5 unidades) de dois cm de diâmetro sobre toda a lâmina, e coradas com 60µL conjugado diluído 1:40 em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) contendo 0,002% do corante azul de Evans, previamente centrifugado a 9300 x g por 1 min. Posteriormente, foram incubadas a 37°C por 45 min, em câmara úmida, e lavadas por imersão em PBS (NaCl 0,015M, PO₄ 0,01M, pH 7.4) por 10 min e duas vezes com água por 1 min. Após secagem em estufa as lâminas foram montadas com glicerina tamponada (pH entre 8,0 a 8,5) e lamínula, depois examinadas e fotografadas em microscópio óptico binocular com sistema de epiluminação para imunofluorescência (microscópio Olympus, modelo BH2).

b) Critérios para leitura das lâminas de IFD

Para leituras das lâminas estabeleceu-se um número mínimo de 40 células por lâmina, considerando no mínimo duas células positivas (5%) e duas lâminas de

cada espécime. A determinação de resultados positivos e negativos foi baseada em critérios estabelecidos (quadro 1) e considerando como sinal de 'fluorescência' a coloração amarela esverdeada brilhante. Em cada lâmina determinou-se a quantidade de células positivas e identificou a concentração celular. Em cada reação foi colocado um controle positivo e negativo, para determinar a viabilidade do conjugado.

2.3.12 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o teste de qui-quadrado de McNemar para verificar a independência entre dois espécimes, o teste Q de Cochran para avaliar a independência entre os três espécimes, o coeficiente Kappa para determinar a intensidade da concordância e o cálculo dos valores de especificidade e sensibilidade diagnóstica relativa (MacKinnon, 2000; Sim e Whight, 2005).

Quadro 1. Características de resultados positivos e negativos de IFD de cinomose canina

Negativa	Positiva
Células avermelhadas	Fluorescência intranuclear
Células de cor verde discreta (opaco)	Fluorescência intracitoplasmática
Grumos de células com aparente fluorescência (discreta)	Grânulos fluorescentes no citoplasma
Células fantasmas amareladas discretas (células irregulares não delimitadas pela membrana citoplasmática).	Corpo oval fluorescente intranuclear
Precipitado de corantes mimetizando células (geralmente são brilhantes e mudam de foco ao movimentar o micrometro).	Membrana citoplasmática evidente com fluorescência
Ausência de fluorescência	Corpos (massas) fluorescentes múltiplos e esverdeados brilhante no citoplasma.
	Fluorescência granular
	Célula fluorescente brilhante
	Grumos de células fluorescentes brilhantes

Fonte: Adaptado de Liu e Coffin (1957).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Sinais clínicos

Os sinais clínicos de cinomose apresentados pelos 32 animais estão apresentados no Anexo 1. Estes foram classificados segundo Coffin e Liu (1957) em sinais sistêmicos, sistêmicos e neurológicos e neurológicos. O quadro sistêmico (56,3%) foi o mais freqüente entre os animais testados; seguido do neurológico e sistêmico concomitantemente (40,6%); e neurológico (3,1%). Os animais, provavelmente, estavam na fase aguda da infecção onde os sinais sistêmicos são mais sobressalentes, como observados por Greene e Appel (2006); Appel et al. (1982); Schobesberger et al., (2005). Esta fase aguda dura de três a seis semanas (KroKowka et al., 1980). Os sinais sistêmicos aparentam ter maior relevância na obtenção dos resultados positivos de CC, mesmo em outras técnicas diagnósticas, como observado por Gebara et al. (2004a) que obteve maior positividade (51,2%) em cães com este quadro clínico.

Os sinais clínicos sistêmicos apresentados foram hipertermia; sinais respiratórios (broncopneumonia tosse, dispnéia, estertor pulmonar, secreção nasal e descarga nasal); ocular (secreção ocular, conjuntivite alopecia periorbital); gastrintestinais (vômito, diarreia e inapetência) e cutâneos (alopecia, hiperqueratose, pústula e pápula). Estes sintomas são resultados da localização do vírus no decorrer da infecção e são exacerbados pela infecção bacteriana (Greene e Appel, 2006). Em alguns animais evidenciou-se a atuação de infecções secundárias, tais como, descarga nasal mucopurulenta, broncopneumonia, pústulas, pápula, vômito e tosse. Um dos animais avaliados apresentou hipoplasia dentária, e segundo Appel e Summers (1999) e Greene e Appel (2006), este sinal é uma característica típica de infecções por VCC, mas o aparecimento desta lesão não é obrigatório em todos os animais infectados.

Quatorze animais avaliados apresentaram sinais neurológicos, sendo que o sinal mais freqüente foi a mioclonia (6 casos), seguido de incoordenação motora (5 casos), paralisia de membros (4 casos), convulsão (3 casos), ataxia, inclinação e tremores de cabeça (2 casos) e andar em círculo, visto em um único animal. Os sinais nervosos podem ser únicos ou estarem acompanhados de outros sinais, sendo que o aparecimento de manifestações nervosas leva a um quadro mais severo da doença com um prognóstico mais reservado. Estes achados em animais naturalmente infectados foram encontrados por diversos autores (Amude et al., 2007; Saito et al., 2006; Gebara et al., 2004a; Koutinas et al., 2002). A mioclonia segundo Koutinas e coladores (2002), é considerada um achado relevante na cinomose canina, mas pode ser encontrada em outras desordens do SNC. Alguns autores encontraram elevada associação de mioclonia com CC, podendo ser utilizado para o diagnóstico presuntivo desta infecção (Saito et al., 2006; Koutinas et al., 2002).

As manifestações neurológicas, segundo Greene e Appel (2006), podem coincidir com a infecção sistêmica, o que foi visto em treze dos quatorze animais avaliados, indicando que estes animais provavelmente estavam na fase aguda da doença, ou podem aparecer de uma a três semanas após os sinais sistêmicos ou ainda meses ou anos depois da infecção primária, desenvolvendo uma meningo-encefalite crônica (Rima et al., 1987). Os sinais nervosos, provavelmente, foram conseqüentes de uma encefalite aguda, uma vez que foram mais frequentemente observados em associação aos sinais clínicos sistêmicos (Gebara et al., 2004b).

A duração da doença e o curso dos sinais nervosos dependem da amostra viral, pois algumas são mais neurotrópicas. As amostras neurovirulentas são mais eficientes em mediar à infecção em neurônios, pois a proteína viral H (hemaglutinina) tem maior afinidade para os receptores das células nervosas (Bonami et al., 2007). Dentre as amostras neurotrópicas

incluem as estirpes de VCC virulentas A75/17 e Snyder Hill e a vacinal Rokborn, que apesar de atenuada em cultivo celular, tem uma residual virulência e pode causar uma encefalite pós-vacinal (Stettle et al., 1997).

Adicionalmente, o surgimento destes sinais depende da resposta imunológica, onde animais com títulos de anticorpos baixos podem desenvolver o quadro neurológico da doença, de uma forma repentina (Ho e Babiuk 1979a, Ho e Babiuk 1979b). Na ausência de uma resposta imune o vírus infecta o sistema nervoso, podendo persistir nas células epiteliais e nervosas, conseqüentemente desenvolvendo uma encefalite tardia e hiperqueratose dos coxins plantares (Appel, 1969; KroKowka et al., 1980; Rudd et al., 2006).

4.2 Imunofluorescência direta para titulação de conjugado IgG anti-VCC ITFC

4.2.1 Dosagem protéica e titulação do soro hiperimune, IgG anti-VCC, antígeno VCC.

Os títulos obtidos na imundifusão (IDGA) em gel de agar do soro hiperimune, IgG anti-VCC e antígeno-VCC foram 4, 8 e 16, respectivamente. Pela soroneutralização obteve-se títulos maiores que 2.560 no soro hiperimune e de 20.480 (DE50) na IgG anti-VCC.

A concentração de proteína do conjugado anti-VCC foi 2.875,8µg/mL e do antígeno VCC de 39.915,10µg/mL.

4.2.2 Padronização do método de obtenção de lâminas controles para IFD e titulação de conjugado IgG anti-VCC ITFC

O tempo ideal para cultivo do vírus utilizando as multiplicidades de infecção de 0,82; 1,68 e 4,42 foram de 18 horas, pois com 24 e 30 horas as células já estão com efeito citopático (ECP), tais como, lise celular evidenciada pelas células no sobrenadante e excesso de cromógeno extracelular visualizado na IFD. De acordo

com Lan et al. (2006) com 24 horas de cultivo viral observa-se 50% de ECP, e aumenta progressivamente. O período após 24 horas coincide com o processo de brotamento do vírus através da membrana hospedeira e posterior degeneração celular nas 72 horas seguintes (Cornwell et al., 1971), com a presença de cariopcnose ou cariorrexia nuclear e apoptose celular (Yamaguchi et al, 2005).

As lâminas preparadas a partir da suspensão celular com concentração de 150.000 células e volume de 200µl apresentaram ótima distribuição e concentração celular, com poucos grumos celulares e delimitação do núcleo e citoplasma (Anexo 4 - Figura 7). Evans et al. (1991) também usaram esta concentração para confecção de lâminas com volume de 400µl, porém em lâmina para cultivo celular contendo oito poços. Tessler (1984), ao utilizar um sistema de cultivo idêntico (Lab-Tek, Napaerville, Illinois) obteve bons resultados para titulação de conjugado, porém este método é mais oneroso.

A melhor técnica de confecção de lâminas para controles foi a de sedimentação celular de 4 horas, pois as células estavam aderidas, visíveis e bem distribuídas (Anexo 4 - Figuras 8, 9 e 10). Em segundo plano o cultivo em placa de Petri, entretanto a contaminação da cultura celular nesta última foi um acontecimento freqüente (Anexo 4 - Figuras 11 e 12).

O cultivo sob lamínula em placas de 24 poços permitiu a triagem do conjugado em diversas diluições (1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 e 1/640), sendo obtidos resultados positivos até a diluição 1/80, assim, as diluições 1/160 a 1/640 foram retiradas da titulação do conjugado.

As lâminas com cultivo em placa de Petri, citocentrifugação e sedimentação foram utilizadas para fazer a titulação do conjugado, simultaneamente. As diluições avaliadas foram 1/20, 1/40, 1/50, 1/60, 1/70 e 1/80. As lâminas confeccionadas por sedimentação durante 4 horas ofereceram melhores resultados e demonstraram ter

melhor aplicabilidade para titulação de conjugado com a técnica de imunofluorescência direta. Estas expressaram uma fluorescência de intensidade gradativa da primeira à última diluição (Anexo 5 – Figuras 13 a 18). As lâminas de placa de Petri e citocentrífuga não apresentaram reação nas diluições de 1/70 e 1/80.

A diluição de 1/40 apresentou melhor balanço de fluorescência nas lâminas entre os controles, e a intensidade da reação foi muito aproximada da diluição 1/50, podendo ser utilizadas na técnica de IFD (Anexo 5 – Figuras 14, 15). O título 40 foi o selecionado para ser usado com as lâminas de amostras clínicas, pois algumas lâminas continham poucas células e maior intensidade de fluorescência estabelecendo um melhor ponto de corte. Esta mesma situação também foi encontrada por Gittzus e Rubin (1977), que selecionaram a menor diluição de conjugado. Appel (1966) obteve alta especificidade de fluorescência com a diluição do conjugado de 1/40.

Os controles negativos das respectivas diluições das lâminas de citocentrifugação e de sedimentação não apresentaram reação de fluorescência. Entretanto, duas diluições dos controles negativos das lâminas da placa petri demonstraram uma reação inespecífica, as quais demonstraram uma discreta fluorescência.

A inespecificidade, segundo Goldstein et al. (1961), está relacionada com a concentração e o grau de pureza do isotionato de fluoresceína, e ainda a presença de outros componentes, como a proteínas do soro no conjugado (Gittzus e Rubin, 1977), principalmente, oriundas do meio de culturas celulares (Mochizuki, 2005). Os restos de citoesqueleto celular contido no antígeno não purificado de VCC que foi utilizado para produção do soro hiperimune, provavelmente, podem ter produzido anticorpo anti-citoesqueleto e contribuído para inespecificidade do conjugado. Um tratamento prévio do conjugado, antes de aferir o título, com células VERO não infectada reduziria este problema. Para minimizar o background por

excesso de corante, realizou-se uma centrifugação no conjugado antes de sua utilização.

Um pré-tratamento das lâminas com um soro homólogo reduziria a inespecificidade (Goldstein et al, 1961; Liu e Coffin, 1957, Cello et al., 1959). Adicionalmente, avaliar a reação do conjugado com lâminas contendo tecidos de animais (Liu e Coffin, 1957; Fairchild et al, 1967, Motohashi et al., 1969), esfregaços sanguíneos (Cello et al., 1959) e culturas de células (Blixenkrone-Moller et al., 1993) infectadas e não infectadas é importante para determinar a especificidade.

4.3 Técnica de imunofluorescência direta e diagnóstico da cinomose canina

4.3.1 Leituras das lâminas de IFD

As lâminas de IFD apresentaram concentração celular entre 10 e 250 células, sendo que as lâminas de genital apresentaram a maior concentração celular (média de 121 células por lâmina), enquanto as lâminas de amostra conjuntival apresentaram a menor densidade (média de 37 células por lâmina). Nas lâminas positivas foram observadas de uma a quinze células com fluorescência. As características mais freqüentes de positividade foram células fluorescentes brilhantes individuais e em grumo, membrana citoplasmática com evidente fluorescência intracitoplasmática e intranuclear. E de negatividade foram células avermelhadas, células em cor verde discreta, grumos celulares com aparente fluorescência, ausência de fluorescência e precipitado de corante mimetizando células (Anexo 3 – Figuras 1 a 6).

A técnica de leitura das lâminas coincidiu com a estabelecida por Fairchild et al. (1971), entretanto, quando as lâminas apresentavam número de células inferiores a 40 considerou-se o total de células de ambas as duplicatas do espécime. O somatório das células foi estabelecido porque algumas lâminas, principalmente, de esfregaço conjuntival, apresentavam menor densidade celular, este achado foi relatado pelos mesmos autores.

4.3.2 Comparação entre IFD e Sinais Clínicos Compatíveis com Cinomose Canina

Dos 32 animais com sinais clínicos compatíveis com a cinomose canina, 30 foram positivos e dois apresentaram-se negativos na IFD. Todos os animais sem sinais clínicos compatíveis com cinomose foram negativos na IFD (quadro 2).

O índice de kappa de concordância entre sinais clínicos e a IFD foi alto, como observada pela concordância quase perfeita no valor de Kappa (0,85). A sensibilidade e especificidade diagnóstica relativa aos sinais clínicos foram de 93,75 e 100%, respectivamente.

Enquanto neste trabalho encontrou-se forte associação com sinais clínicos e resultados

positivos de IFD, outros autores como Fairchild et al. (1971) observaram uma relação moderada, o que pode estar relacionado ao tratamento dos animais que poderia ter mascarado os sinais clínicos ou a falta de observação, o que levaria ao não registro de apresentação de sinais.

Uma forte apresentação entre sinais clínicos e positividade detectada pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase e a histopatologia encontrados por autores como Gebara et al. (2004a), Negrão et al. (2007) e Koutinas et al. (2002), reforça os achados desse trabalho em que os sinais clínicos estão fortemente associados aos resultados positivos pela IFD.

Quadro 2. Resultados do teste de imunofluorescência direta de animais com e sem sinais de cinomose canina

N°	Animal	Imunofluorescência direta		
		Genital	S. ocular	S. nasal
Com Sinais clínicos				
1	lingüiça	pos	não tem	não tem
2	Johnny	pos	pos	pos
3	pingo	pos	pos	pos
4	sansão	neg	pos	neg
5	dulce maria	pos	neg	neg
6	flesh	pos	neg	neg
7	cão 1	pos	neg	pos
8	magrela	pos	neg	neg
9	costelinha	pos	neg	pos
10	nina	pos	neg	pos
11	sophia	pos	pos	pos
12	lobão	pos	neg	neg
13	kith	pos	pos	pos
14	nina (sf)	pos	pos	pos
15	flor	pos	neg	neg
16	jimy	pos	neg	pos
17	luly	pos	pos	pos
18	teka	pos	neg	pos
19	rotty	neg	Neg	neg
20	titica	pos	Neg	neg
21	freedon	neg	Neg	pos
22	fidel	pos	Pos	pos
23	preta gil	pos	Pos	pos
24	hill	pos	Pos	pos
25	grall	pos	Pos	pos
26	harpia	neg	Neg	neg
27	gávia	pos	Neg	pos
28	aslan	pos	Pos	pos
29	fúria	pos	Pos	pos
30	srd	pos	Pos	pos
31	cocker	pos	Pos	pos
32	teka hovet	pos	Pos	neg
Sem sinais clínicos				
33	pity jr	neg	Neg	neg
34	xereta	neg	Neg	neg
35	zulu	neg	Neg	neg
36	urcos	neg	Neg	neg
37	francesca	neg	Neg	neg
38	isis	neg	Neg	neg
39	tess	neg	Neg	neg
40	pepita	neg	Neg	neg

Os animais com suspeitas clínicas de CC foram divididos em quatro grupos de acordo com o histórico de vacinação: 1. Sem informação de vacinação, 13 (40,6) animais; 2. Não vacinados, três animais (9,4%); 3. Animais com um mês de vacinação, nove (28,1%); 4. Animais com 2 meses a 1 ano de vacinação, quatro (15,6%). Os animais sem suspeitas clínicas de CC foram vacinados há um ano atrás. Os resultados falsos positivos podem ocorrer apenas no grupo de animais com um mês de vacinação. Os animais não vacinados, os animais vacinados com 2 meses a um ano e com mais de um ano antes da coleta, provavelmente não teve interferência de vírus vacinal no resultado da IFD. Isso porque foi demonstrado por Józwick e Frymus (2005) que animais vacinados com vacina atenuada até seis semanas antes da coleta os testes podem dar falsos positivos,

em decorrência da detecção do vírus vacinal.

Em relação ao espécime utilizado (impressão genital, nasal ou esfregaço conjuntival, tabela 1 e 2) observou-se por meio do teste Q de Cochran (valor Q igual a 534) que a possibilidade de acerto é diferente para todas as amostras, ou seja, os resultados positivos e negativos dos espécimes de nasal, ocular e genital não coincidem. Na tabela 2 estão sumariados os valores de McNemar. Em relação às amostras clínicas, a análise estatística demonstra que há diferenças entre positividade em relação aos espécimes analisados, onde a impressão de genital apresentou 87,5%, a impressão nasal 67,7% e o esfregaço conjuntival 51,6% de positivos, indicando que o material genital foi o que obteve os melhores resultados e o conjuntival o pior.

Tabela 1. Associação do quadro clínico e resultado das amostras em IFD

	<i>Genital</i>		<i>Ocular</i>		<i>Nasal</i>	
	+	-	+	-	+	-
Sistêmico	15	3	8	10	12	6
Neurológico	1	0	0	1	0	1
Neurológicos/Sistêmico	11	1	8	4	9	3

Tabela 2. Valores de teste de McNemar (Z) dos substratos estudados.

	Z*	P - valor	Significante	Conclusão
Genital x Nasal	3,13	0,077	Não	Iguais
Genital x Conjuntival	7,69	0,005	Sim	Diferentes
Nasal x Conjuntival	1,78	0,182	Não	Iguais

* para $\alpha = 0,05$ e $gl = 1$, $Z = 3,84$

A concordância de resultado positivo entre sinais e os espécimes no teste de IFD dos animais com sinais clínicos variaram de 50 a 87,5%, enquanto que a concordância de negativos foi igual para todos (100%). As lâminas de impressão genital mostraram-se uma elevada concordância ($Kappa=0,73$) (Tabela 3).

Uma maior positividade em impressões de genitais utilizando a IFD também foi observada por Fairchild et al. (1971).

Segundo Fairchild et al. (1967) a detecção de células infectadas pelo vírus de cinomose está relacionada com a rota de infecção, que identificaram experimentalmente células positivas através de IFD no epitélio genital e conjuntival no 5° dia quando a via foi intracranial ou intravenosa e no 7° a 10° dia pela via oronasal. De acordo com estes mesmos autores, o vírus pode desaparecer dos tecidos epiteliais três semanas depois da infecção, mas pode ser encontrado no

21º dia PI em célula genital de cães com sintomas nervosos; justificando assim a

maior frequência de detecção neste tecido.

Tabela 3. Concordância de resultados positivos e negativos entre sinais e os espécimes de genital (n=40), nasal (n=39) e ocular (n=39) dos animais com sinais clínicos no teste de imunofluorescência direta, resultado do índice de Kappa.

IFD	SINAIS		Kappa
	Concordância		
	Positivo	Negativo	
Genital	28 (87,5%)	8 (100%)	0,73
Ocular	16 (50%)	8 (100%)	0,30
Nasal	21 (65,6%)	8 (100%)	0,46

Negrão et al. (2007), avaliando amostras de cães com sinais compatíveis de cinomose, demonstraram que a urina é o melhor substrato para a pesquisa do vírus, o que de certa forma, corrobora com os dados vistos nesse trabalho, onde o esfregaço genital foi à amostra clínica que teve mais positividade para o vírus da cinomose na IFD. Mas, estes achados diferiram dos encontrados por Megid et al. (2000), que em 61 animais clinicamente suspeitos com cinomose e avaliados pela técnica de imunofluorescência direta, obtiveram maior positividade em conjuntiva ocular (20%), ocular e sangues (20%), seguidos pela positividade em conjuntiva ocular, genital e sangue associados (18%). Liu e Coffin (1957); Motohashi et al. (1969), também encontraram positividade mais satisfatoriamente em esfregaço de conjuntiva, principalmente, no nono dia pós-infecção experimental. Entretanto, Liu e Coffin (1957) observaram que os esfregaços conjuntivais tenderam a serem positivos intermitentes.

As amostras de impressão genital podem ser melhores para o diagnóstico da cinomose canina independente do quadro de sinais clínicos, mas os animais com quadro sistêmico apresentarão maior possibilidade de ser positivos na IFD.

5. CONCLUSÕES

- Impressão de lâminas do epitélio genital apresentou ser o espécime de escolha para o diagnóstico de cinomose canina em cães com sinais clínicos de cinomose canina por imunofluorescência direta.
- Os resultados de diagnóstico positivos para a cinomose canina pela técnica de IFD foram mais eficientes durante o quadro sistêmico da cinomose canina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMUDE, A. M; ALFIERI, A.A; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sci.*, v.82, n.3, p.416-22, 2007.
- AN, D.J.; KIM, T.Y.; SONG, D.S. et al. An immunochromatography assay for rapid ante mortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J. Virol. Methods.*, v.47, n.2, p. 244-249, 2008.

- APPEL, M. J.; SHEK, W.R.; SUMMERS, B.A. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect immune*; v.37, n.2, p.592-600, 1982.
- APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.*, v.30, n.7, p.1167-1182, 1969.
- APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status, 1999. Disponível em: <http://www.ivos.org/> Acesso em: 13 de março 2008.
- APPEL, M.; ROBSON, D.S. A microneutralization test for canine distemper virus. *Am. J. Vet. Res.*, v.34, n.11, p.1459-63, 1973.
- BATHEN-NOETHEN, A.; STEIN, V.M.; PUFF, C. et al. Magnetic resonance imaging findings in acute canine distemper virus infection. *J. Small. Anim. Prac.*, v.49, n.9, p.460-7, 2008.
- BONAMI, F.; RUDD, P. A.; MESSLING, V. V. Disease duration determinants canine distemper virus neurovirulence. *J. Virol.*, v.81, n.21, p.12066-12070, 2007.
- CELLO, R. M.; MOULTOU, J. E.; MACFARLAND, S. The occurrence of inclusion bodies in the circulation neutrophils of dogs with canine distemper. *Cornell vet.*, v.49, n.1, p.127-146, 1959.
- COFFIN, D. L.; LIU, C. Studies on canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody: II. The pathology and diagnosis of the naturally occurring disease in dogs and the antigenic nature of the inclusion body. *Virology*, v.3, n.1, p.132-145, 1957.
- CORNWELL, H. J.; LAIRD, H. M; WRIGHT, N.G et al. Ultrastructural features of canine distemper virus infection in a dog kidney cell line. *J. Gen. Virol.*, v.12, n.3, p.281-92,1971.
- DOMIÁN, M.; MORALES, E.; SALAS, G. et al. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. *J. comp. path.*, v.133, n.4, p.289-93, 2005.
- ELIA, G.; DECARO, N.; MERTELLA, V. et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.*, v.136, n.1-2, p.171-176, 2006.
- EVANS, M. B.; THOMAS, O. B.; HOWARD, T. H et al. Comparison of in vitro replication and cytopathology caused strains of canine distemper virus of vaccinia and field origin. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.3, n.2, p.127-132, 1991.
- FAIRCHILD, G. A.; WYMAN, M.; DONOVEN, E. F. Fluorescent antibody technique as a diagnostic test for canine distemper infection: detection of viral antigen in epithelial tissues of experimentally infected dogs. *Am. J. Vet. Rev.*, v.28, n.124, p.761-768, 1967.
- FAIRCHILD, G.A.; STEINBERG, S.A.; COHEN, D. The fluorescent antibody test as a diagnostic test for canine distemper in naturally infected dogs. *Cornell. Vet.*, v.61, n.2, p.214-233, 1971.
- GEBARA, C. M. S.; WOSTACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J. et al. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004b.
- GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J. et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, v.56, n.4, p. 480-487, 2004a.

- GEMMA, T.; IWATSUKI, K.; SHIN, Y. et al. Serological of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *J. Vet. Med. Sci.*, v.58, n. 8, p. 791-794, 1996.
- GITZUS, G. J.; RUBIN, J. S.; Clinical Evaluation of Commercial Conjugates for Direct: Immunofluorescent of Herpes Simplex Virus. *J. Clin. Microbiol.*, v.6, n.6, p.574-577, Dec 1977.
- GOLDSTEIN, G.; SLIZYS, S.I.; CHASE, W. M. Studies on fluorescent antibody staining: I. Non-specific fluorescence with fluorescein-coupled sheep anti-rabbit globulins. *J. Exp. Med.*, v.114, n.6, p.89-110, 1961.
- GREENE, C. E.; APPEL, M J. Canine distemper. In: *Infectious Diseases of the dog and cat*, 3.ed. Philadelphia: Saunders Company, 2006. Chapter 3, p. 26-41.
- GRÖNE, A.; DOHERR, M. G.; ZURBRIGGEN, A. Canine Distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Vet dermatology*, v.15, n.3, p.159-167, 2004.
- HAINES, D. M.; MARTIN, K. M.; RONALD, A. S. et al. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: a method for ante mortem diagnosis of infection, *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.11, v.5, p.369-399, 1999.
- HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus – A morbillivirus in search of new host. *Trends Microbiol*, v.5, n.3, p.124-125, 1997.
- HARRIS, D. A. Spectrophotometric assays. In: BASHFORD, C.L.; HARRIS, D.A. *Spectrophotometry & spectrofluorimetry. A practical approach*. 2.ed. Washington, DC, USA: Oxford University Press, 1987. p.49–90.
- HO, C.K.; BABIUK, L.A. Immune mechanism against canine distemper: I. Identification of K cell against canine distemper virus infected target cells in vitro. *Immunology*, v.37, n.1, p.231-9, 1979a.
- HO, C.K.; BABIUK, L.A. Immune mechanisms against canine distemper. II. Role of antibody in antigen modulation and prevention of intercellular and extracellular spread of canine distemper virus. *Immunology*, v.38, n.4, p.765-72, 1979 b.
- JÓŻWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and Nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet. Res. Commun.*, v.29, n.4, p.347-359, 2005.
- KARZON DT, BUSSELL RH. Cytopathic effect of canine distemper virus in tissue culture *Scienc*, v.130, p.1708-9, 1959.
- KIM, D.; JEOUNG, S. Y.; AHN, S. J. et al. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, v.68, n.8, p.877-879, 2006.
- KIM, Y. H.; CHO, K. W.; YOUN, H. Y. et al. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.*, v. 2, n.1, p.59-63, 2001.
- KOUTINAS A. F; POLIZOPOULOU, Z. S.; BAUMGAERTNER, W. et al. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Comp. Pathol.* v.126, n.1, p.47-56, 2002.
- KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; BAUMGAERTNER, W. et al. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalitis. *J. comp. Path.*, v.126, p.47-56, 2002.
- KRAKOWKA, S.; HIGGINS J. R.; KOESTNER, A. Canine Distemper Virus: Review of Structural and Functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.*, v.41, n.2, p. 284-92, 1980.
- KRISTENSEN, B.; VANDELDELDE, M. Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin-embedded tissue. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, n.6, p.1017-1021, 1978.

- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p. 680-685, 1970.
- LAMB R. A; PATERSON, R. G.; JARDETZKY, T. S. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology*, v.344, n.1, p. 30-37, 2006.
- LAMB RA. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes – Review. *Virology*, v.197, n.1, p.1-11,1993.
- LAMB, R. A.; PARKS, G. D. Paramyxoviridae: The viruses and their Replication. In: KNIPE, D. M; HOWLEY, P.M, *Filds' Virology*. 5.ed. Philadelphia, PA-USA: Wolters Kluwer, 2007. v.2, cap. 41, p. 1449-1469.
- LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; KAWABATA, A. et al, Stability of canine distemper virus (CDV) after 20 passages in Vero-DST cells expressing the receptor protein for CDV. *Vet Microbiol*. v.118, n.3-4, p. 177-188, 2006.
- LEDNICKY, J.A.; MEEHAN, T.P.; KINSEL, M. J. et al. Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *J. Virol. Methods*., v.118, n.2, p.147-57, 2004.
- LIU, C.; COFFIN, D.L. Studies on canine distemper infection by means of fluorescein-labeled antibody: I. the pathogenesis, pathology, end diagnosis of the disease in experimentally infected ferrets. *Virology*, v.3, n.1, p.115-131, 1957.
- MACKINNON, A. A spread sheet for the calculation of comprehensive statistic for the assessment of diagnostic test and inter-rater agreement. *Comput. Biol. Med.*, v.30, n.3, p.127-134, 2000.
- MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.*, v.38, n.4, p.787-97, 2008.
- MASUDA, M.; SATO, H.; KAMATA, H. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.29, n. 2-3, p. 157-65, 2006.
- McCULLOUGH, B.; KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. *Am. J. Pathol.*, v.74, n.1, p.155-166, 1974.
- McKINNEY, M. M; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluids. *J. Immunol. Methods*., v.96, n.2, p.271-275, 1987.
- MEGID, J.; NOZAKI, C. N.; FILHO, O. A. et al. Positividade à imunofluorescência direta (IFD) em diferente tecidos de cães clinicamente suspeitos de cinomose. XXI Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais, *Rev. Bras. Ciên. Vet.*, v.7, supl, p.114-115, 2000.
- MESSLING, V. V.; ZIMMER, G.; HERRLER, L. H. et al. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism e citopathogenicity. *J.Virology*., v.75, n.14, p. 6418-6427, 2001.
- MESSLING, V. V; HARDER, T. G, MOENNIG, V. et al. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against canine distemper Virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin Microbiol.*, v.37, n.4, p. 1049 -1056, 1999.
- MOCHIZUKI, M. Growth characteristics of canine pathogenic viruses in MDCK cells cultured in RPMI 1640 medium without animal protein. *Vaccine*, v.24, n.1, p.1744-8, 2005.

- MOTOHASHI, T.; NAKAGAWA, H.; OKADA, T. Fluorescent antibody technique in diagnosis of canine distemper. *Vet. Méd. Small. Anim. Clinician.*, v.64, n.12, p.1057-1060, 1969.
- NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A; ALFIERI, A. F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção *ante mortem* do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, v. 59, n.1, p.253-257, 2007.
- NOON, K. F.; ROGUL, M.; BINN, L. N. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. *Am J Vet Re.*, v.414, n.4, p. 605-609, 1980.
- OLSON, P.; FINNSDÓTTIR, H.; KLINGEBORN, B. et al. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. *Vet. Rec.*, v.141, n.25, p.654-655, 1997.
- QUEIROZ DA SILVA, L. H.; PEIXOTO, Z. M. P. et al. Emprego das técnicas de coloração de Sellers e imunofluorescência direta no diagnóstico diferencial da raiva e cinomose em amostras de origem canina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.21, n.6, p.232-236, 1999.
- QUEIROZ DA SILVA, L.H.; MORINISHI, C.K.; NUNES, C.M. Diagnóstico diferencial entre a raiva e a cinomose canina em amostras de cérebro de cães examinadas no período de 1998 a 2001 na região de Araçatuba, SP, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, v.71, n.3, p.317-321, 2004.
- RANKIN, A. M.; FISHER, L. E.; BUSSELL, R. H.. Cell Fusion by canine distemper virus-infected cells. *J. virology*, v.10, n.6, p. 1179-1183, 1972.
- REED, L. J. MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*, v.27, n.3, p. 493-497, 1938.
- RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Canine distemper virus neutralizing antibodies in vaccinated dogs. *Vet. Rec.*, v.147, n.21, p.598-603, 2000.
- RIMA B.K., BACZKO K., IMAGAWA D.T. Humoral immune response in dogs with old dog encephalitis and chronic distemper meningo-encephalitis. *Gen. Virol.*, v.68, n.6, p.1723-35, 1987.
- RUDD, P.A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J. Virol.*, v.80, n.19, p.9361-70, 2006.
- SAITO, T. B; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R et al. Detection of canine distemper by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis, *Res Vet Sci*, v.80 n.1, p.116-119, 2006.
- SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V; WIGG, M.D. *Introdução à virologia humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 243p.
- SCHOBESBERGER, M.; SUMMERFIELD, A.; DOHERR, M. G et al. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunol Immunopatho.*, v.104, n.1-2, p.33-44, 2005.
- SIM, J.; WRIGHT, C. C. The Kappa Statistic in Reliability Studies: Use, Interpretation, and Sample Size Requirements, *Phy. Ther.*, v.85, n.3, p.257-268, 2005.
- STETTLER, M.; BECK, K.; WAGNER et al. Determinant of persistence in canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.*, v.57, n.1, p.83-93, 1997.
- SUMMERS; B.A.; APPEL, M. J. Syncytia formation: an aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis. *J. Comp. Pathol.*, v.95, n.3, p.425-35, 1985.

SUMMERS, B. A; APPEL, M. J. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, v.20, n.6, p. 525-534, 1994.

TESSLER, J. Goat serums for fluorescent antibody conjugates to chlamydial antigens; *Can. J. Comp. Med.*, v. 48, n. 2, p. 228-229, 1984.

THE, H. T.; FELTKAMP, W. E. T. Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies: I Experiments on the Conditions of Conjugation. *Immunology*, v.18, n.6, p.865-873, 1970 a.

THE, H.T.; FELTKAMP, W.E.T.; Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies: II A Reproducible Method. *Immunology*, v.18, n.6, p.875-881, 1970 b.

YAMAGUCHI, R.; KOJIMOTO, A.; SAKAI, H. et al. Growth characteristics of canine distemper virus in a new cell line CCT cells originated from canine malignant histiocytosis. *J. Vet. Med. Sci.*, v.67, n.2, p. 203-6, 2005.

ANEXOS

Anexo 1. Relação de cães com e sem sinais clínicos de cinomose, idade, sexo, sinais, quadro clínico e vacinação.

	Idade	Sexo	Raça	Sinais	Quadro clínico	Vacinação/ Período
1	7 m	M	SRD	S. ocular, hiperqueratos (coxins e nasal), hipertermia, mioclonia (óbito)	Sistêmico/Nervoso	S.I.
2	10 a	M	Cocker Spaniel	S. ocular e nasal, hiperqueratose (coxins), hipertermia, apatia, estertor pulmonar.	Sistêmico	S.I.
3	7 a	M	SRD	Conjuntivite, estertor pulmonar, tosse seca, hiperqueratose coxins, convulsão, ataxia, mioclonia, tremor de cabeça, leucopenia	Sistêmico/Nervoso	S.I.
4	4 m	M	Rottweiler	Vômito, diarreia, hipertermia, pancitopenia	Sistêmico	Sim/ 1 mês
5	5 m	F	SRD	Vômito, diarreia, s. nasal (mucopurulenta) e ocular, tosse, conjuntivite, estertores pulmonar.	Sistêmico	S.I.
6	-	F	Poodle	Convulsão	Nervoso	S.I.
7	-	M	SRD	Conjuntivite, s. ocular	Sistêmico	S.I.
8	9 m	F	SRD	Secreção nasal, hipoplasia dentária	Sistêmico	S.I.
9	9 m	M	SRD	S. nasal e ocular, tosse, Broncopneumonia, conjuntivite, hiperqueratose periocular	Sistêmico	S.I.
10	-	F	SRD	Broncopneumonia, secreção nasal e ocular, pústula, hiperqueratose coxins, conjuntivite, tetraplegia, mioclonia	Sistêmico/ Nervoso	S.I
11	8 a	F	Daschound	Secreção ocular, rinotraqueíte, incoordenação motora, inapetência	Sistêmico/Nervoso	S.I
12	5 m	M	SRD	Diarreia, secreção ocular, conjuntivite, pápula, hiperqueratose (coxins, auricular, periocular), alopecia, enfraquecimento, leucocitose.	Sistêmico	Não
13	2 m	F	B. Hound	Diarreia, convulsão, anemia	Sistêmico/Nervoso	não
14	2 m	F	Lhasa-Apso	Diarreia, vômito, S. ocular, incoordenação motora, vocalização, excitação, anemia.	Sistêmico/Nervoso	não
15		F	SRD	Secreção nasal e ocular	Sistêmico	Sim/3 meses
16	3 a	M	Yorkshire	S. ocular, espargos, mioclonia, incoordenação, propcepção MAE	Sistêmico/Nervoso	Sim 1 ano
17	2,5 a	F	SRD	S. ocular, conjuntivite, incoordenação, inclinação de cabeça.	Sistêmico/Nervoso	Sim 2 anos
18	1,5 a	F	SRD	Vômito, hipertermia, dispnéia, conjuntivite, espirros.	Sistêmico	S.I
19	7 a	M	Rottweiler	Descarga nasal, tosse, broncopneumonia, conjuntivite, hiperqueratose coxins, tetraplegia, ataxia, hipotermia. (Óbito)	Sistêmico/Nervoso	Sim/5 meses
20	6 m	F	Basset Hound	Seborréia, alopecia periocular e ventre, cegueira unilateral, inclinação de cabeça, trombocitopenia, leucocitose, Leishmaniose.	Sistêmico/Nervoso	Sim/1 mês

continua

continuação

	Idade	Sexo	Raça	Sinais	Quadro clínico	Vacinação/ Período
21	6 m	M	P. alemão	Fezes pastosas, S. nasal e ocular, conjuntivite, pápulas, hipertermia	Sistêmico	Sim /20 dias
22	6 m	M	P.alemão	Secreção nasal e ocular, conjuntivite, hipertemia	Sistêmico	Sim /20 dias
23	3 m	F	Poodle	Secrecies ocular, alopecia periocular	Sistêmico	Sim /20 dias
24	5 m	M	P. alemão	Inapetência. (contato com animais doentes)	Sistêmico	Sim/ 1 mês
25	4 m	F	P. alemão	Secreção ocular, inapetência, emagrecimento	Sistêmico	Sim/ 1 mês
26	4 m	F	P. alemão	Secreção ocular, hipertermia, emagrecimento, inapetência.	Sistêmico	Sim 1 mês
27	4 m	F	P. alemão	Secreção ocular, pústula, hipertermia, inapetência	Sistêmico	Sim /20 dias
28	10 m	M	Pastor alemão	Secreção nasal e ocular, acúmulo material purulento no nariz, conjuntivite, hipertermia, emagrecimento.	Sistêmico	Sim/ 5 meses
29	7 m	M	P. alemão	Corrimento nasal, alopecia periocular	Sistêmico	Sim/ 2 meses
30	5 m	M	SRD	Secreção ocular e nasal (mulcopurulentas), conjuntivite, hiperqueratose, caquético, alopecia, paralisia, tremor cabeça, incoordenação, mioclonia	Sistêmico/nervoso	S.I
31	-	M	Cocker Spaniel	Secreção ocular, conjuntivite, pápula, hiperqueratose (coxins e focinho), enfraquecimento, tetraplegia, mioclonia	Sistêmico/nervoso	S.I
32	2 a	F	SRD	Conjuntivite, hiperqueratose coxins, enfraquecimento, paralisia MP, desidratação, prostração, Leishmaniose +	Sistêmico/Nervoso	Sim/ 6 meses
33	2 m	M	SRD	ausentes		Sim/ 1 ano
34	2 m	M	SRD	ausentes		Sim/ 1 ano
35	4 a	M	Labrador	ausentes		Sim/ 1 ano
36	3 a	M	Doberman	ausentes		Sim/ 1 ano
37	3, 8 a	F	Bull terrier	ausentes		Sim/ 1 ano
38	6 a	F	Doberman	ausentes		Sim/ 1 ano
39	5 a	F	Doberman	ausentes		Sim/ 1 ano
40	5 a	F	Doberman	ausentes		Sim 1 ano

* a: anos; m: meses; S.I.: sem informação.

Anexo 2. Ficha de avaliação clínica

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Raça: _____ Idade: _____ Sexo: _____ origem: _____
FC: _____ Prop: _____ tel: _____ n° _____

2. EXAME CLÍNICO

2.1 Gastrintestinal vômito () diarréia () outros: _____

2.2 Respiratório Secreção nasal: mucopurulento () catarral () tosse: seca () produtiva ()
Descarga nasal () dispnéia () acúmulo de material purulento no canto medial do olho
() bronquite () broncopneumonia () outros: _____

2.3 Oftalmológicos: Secreção lacrimal: serosa () catarral () conjuntivite () outros ()

2.4 Dermatológicos: Lesões de pele: pústula () pápula () hiperqueratose: p. auricular () Coxins () Focinho
() Alopecia: periocular () outros: _____

2.5 Sistemas Nervosos: Ataques convulsivos () enfraquecimento () paralisia dos membros () (A) (P)
Sintomas cerebelares: tremores de cabeça () hipertermia ()
Sintomas vestibulares: cabeça pendula () ataxia () nistagmo ()
Contrações musculares (mioclonia) (): (tiques), (espasmos)
mov. de pedalar () andar em círculo () Outros: _____

2.6 Funções vitais: temperatura: _____ FC: _____ FR: _____ sons respiratórios: _____

2. MATERIAL COLETADO

1. Sangue: Soro ()
3. Imprint (IFD): Nasal () ocular () prepucial / Vaginal ()

Tem algum exame realizado?

Última Vacinação:

Anexo 3. Fotografias de IFD de lâminas do epitélio nasal, conjuntival e genital de cães com suspeitas de cinomose canina



Figura 1. Lâmina de IFD de células do epitélio vaginal (400x), apresentando fluorescência intracitoplasmática e grumos células fluorescentes.

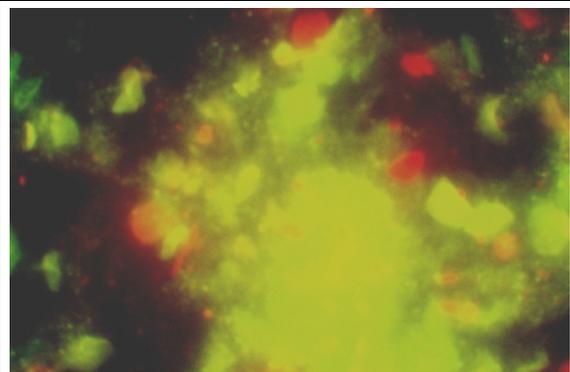


Figura 2. Lâmina de IFD de células do epitélio vaginal (200x), apresentando fluorescência intracitoplasmática e grumos de células fluorescentes.

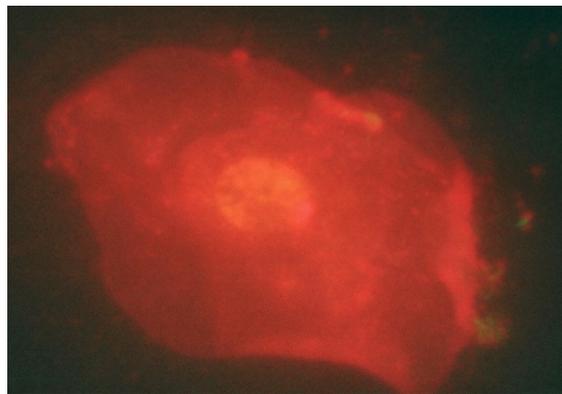


Figura 3. Lâmina de IFD de células do epitélio peniano (1000x), apresentando fluorescência intranuclear.

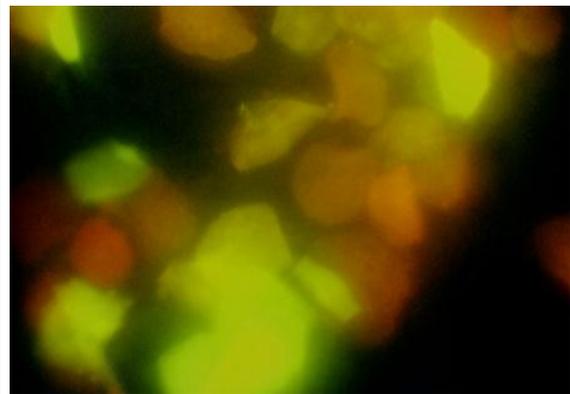


Figura 4. Lâmina do epitélio peniano (400x), apresentando células com citoplasma florescente.

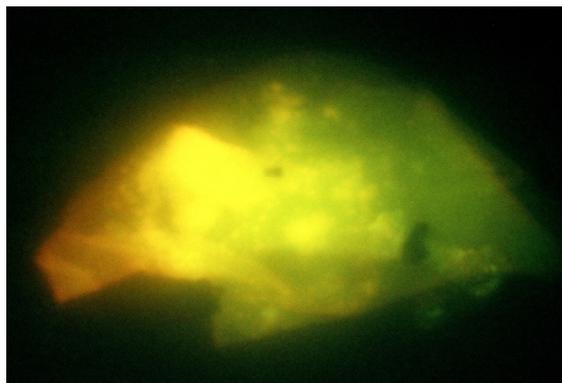


Figura 5. Lâmina de IFD de células da conjuntiva (1000x), apresentando fluorescência intracitoplasmática.

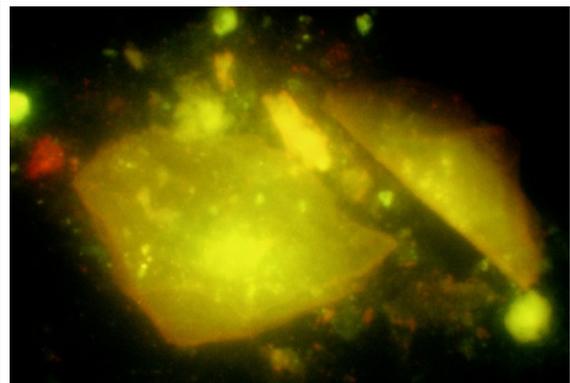


Figura 6. Lâmina de IFD de células do epitélio nasal (1000x), apresentando fluorescência intracitoplasmática e intranuclear, e grânulos fluorescentes no citoplasma.

Anexo 4. Fotografias de lâminas de células VERO infectada e não infectadas com VCC e corados com May Grunwald-Giemsa.

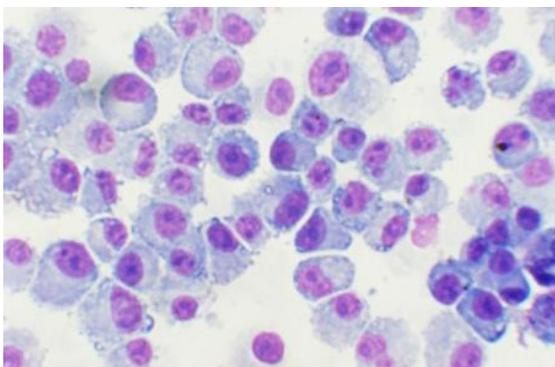


Figura 7. Lâmina preparada pela técnica de citocentrifugação (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 200 μ L, demonstrando aderência e ótima distribuição celular.

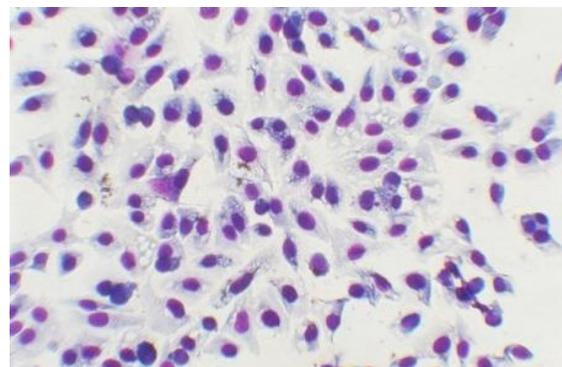


Figura 8. Lâmina preparada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (200x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 20 μ L (lâminas de IF), demonstrando monocamada homogênea.

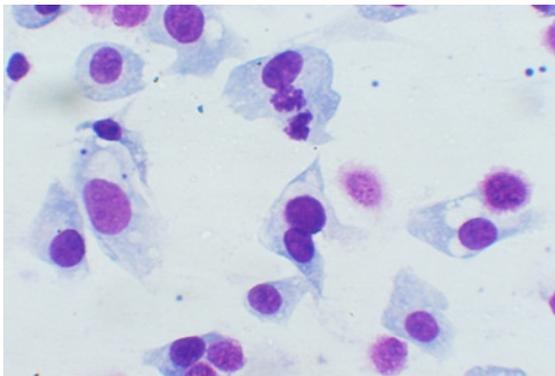


Figura 9. Lâmina confeccionada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 20 μ L (lâminas de IF). Células VERO aderidas, visualização do núcleo e citoplasma e figura de mitose evidente.

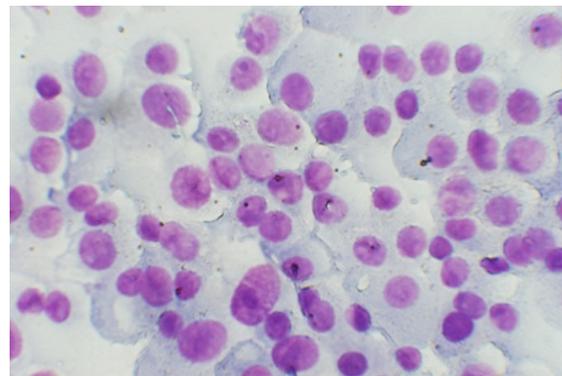


Figura 10. Lâmina confeccionada pela técnica de sedimentação celular por 4 horas (400x) a partir de concentração celular de 150.000 células e 40 μ L (lâmina comum). Células VERO aderidas, visualização do núcleo e citoplasma.

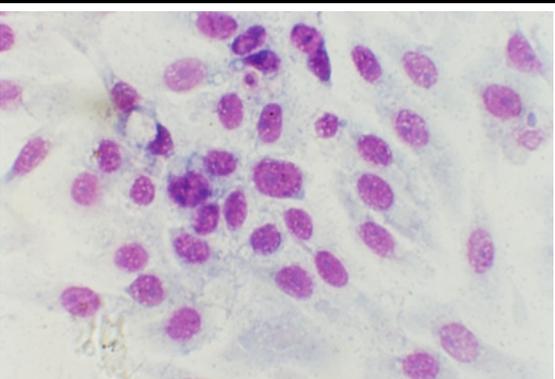


Figura 11. Lâmina confeccionada pela técnica de cultivo em placa de Petri (400x). Monocamada de células VERO e visualização do núcleo e citoplasma.

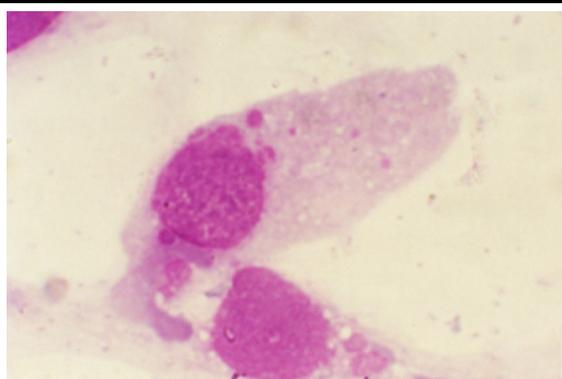


Figura 12. Lâmina confeccionada pela técnica de cultivo em placa de Petri (1000x). Células VERO infectada com VCC apresentando inclusões eosinofílicas no citoplasma.

Anexo 5. Fotografias da titulação do conjugado IgG anti-VCC IFTC pela técnica de IFD em lâminas de células VERO infectadas com VCC e confeccionadas pelo método de sedimentação celular 4 horas. (fotografadas em câmara digital Sony DSC).

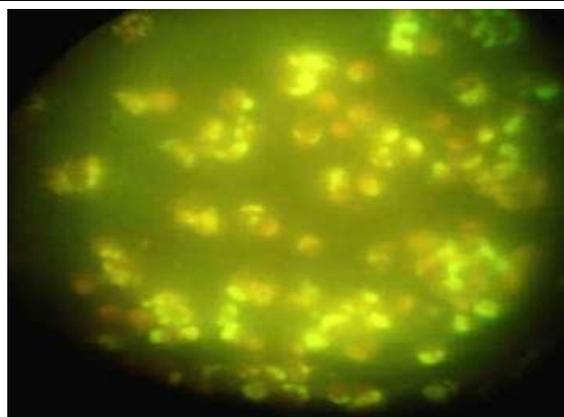


Figura 13. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (200x). Título 20 com expressiva fluorescência.

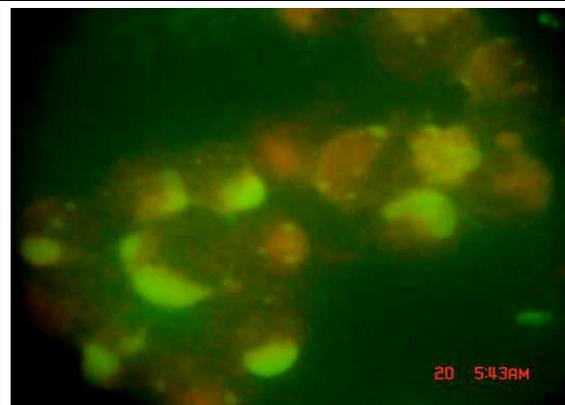


Figura 14. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 40 com ótimo balanço de fluorescência.

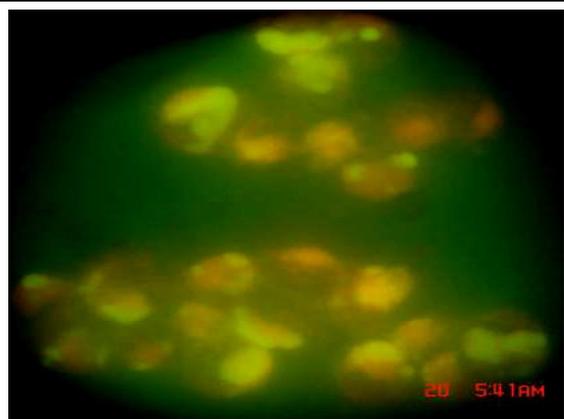


Figura 15. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 50 com boa fluorescência.

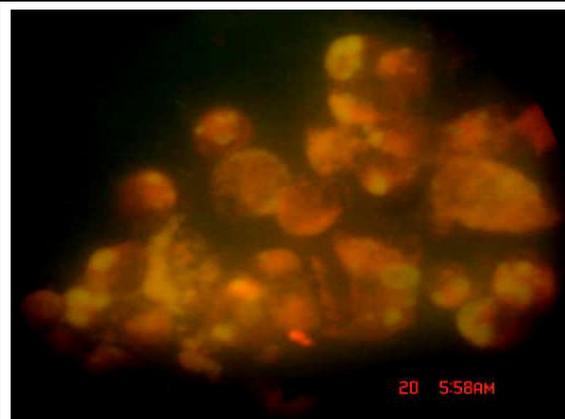


Figura 16. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 60 com reduzida fluorescência.



Figura 17. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 70 com discreta fluorescência



Figura 18. Lâmina de IFD para titulação de conjugado em célula VERO (400x). Título 80 com escassa fluorescência