



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FÁBIO JULIANO NEGRÃO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA
HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA**

Londrina
2004

FÁBIO JULIANO NEGRÃO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA
HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. área de concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Co-Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2004

FÁBIO JULIANO NEGRÃO

**AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA
HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. área de concentração: Sanidade Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do
Mar - CTTMAR
Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva – DMVP
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
(Orientadora)
Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva – DMVP
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2004.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências de fomento à pesquisa abaixo relacionadas:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**
- 2. ProPPG: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina**
- 3. CAPES: Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior**

AGRADECIMENTO

À Deus pelo dom da vida.

À minha família, meus pais João e Maria pelo incentivo e determinação, à Ana Letícia, pelo amor e apoio incondicional, a meus irmãos, João e Sílvio, minhas cunhadas Kátia e Dani pela ajuda, apoio e carinho.

Às famílias Rodrigues (Maria, Isaura, Carol, Claudinéia, Elza e Joaquim) e Oykawa (Líria, Lia e Maria Thiemi) pelo teto, amizade e apoio.

À Profa. orientadora Dra. Alice Fernandes Alfieri e co-orientador Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri pelo exemplo de competência e determinação; pela paciência, confiança e amizade.

Aos amigos, meus irmãos do coração, pela ajuda e pelo carinho: Sheila, Betinha, Flora, Dani Pilz, Kerlei, Dalíria, Maria, Dani Bergaimin, Melissa, Bira, Caco, Jú Dias, Renato, Danilo, Gleí e Michele.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz de Camargo, à Profa. Dra. Roberta Lemos Freire e à Profa. Marilda Carlos Vidotto, membros da Banca de Qualificação, pela valorosa contribuição.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros, à Profa. Dra. Roberta Lemos Freire e à Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri, pela presença e contribuição.

À Profa. Luciana Biazzone Nabut pela ajuda com material bibliográfico.

Ao Prof. Dr. Cássio Egidio Cavenaghi Prete, diretor do Centro de Ciências Agrárias e a Profa. Dra. Daisy Pontes Netto chefe do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

A todos os Professores do Programa de Mestrado em Ciência Animal, os secretários Nelson, Valdecir e Reinaldo pela colaboração, motivação e amizade.

Aos Professores Membros da Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação.

Aos Professores do Departamento de Sanidade Animal e Clínica Veterinária pela colaboração.

Aos Residentes e funcionários do HV pelo apoio, auxílio e paciência.

Aos Funcionários do DMVP pela dedicação e paciência.

Aos funcionários da Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação (CPG/UEL) pela atenção dispensada a todos os trâmites acadêmicos necessários para a conclusão dos trabalhos.

NEGRÃO, F. J. **Avaliação molecular parcial do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

RESUMO

Urina e leucócitos de 56 cães com diagnóstico clínico de cinomose foram avaliados comparativamente pela técnica de Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para o gene da hemaglutinina (Gene H) do vírus da cinomose canina, urina e leucócitos de 56 cães com diagnóstico clínico de cinomose. De acordo com a predominância dos sinais clínicos os cães foram distribuídos em três grupos (17=sistêmicos; 8=neuroológicos e 31=sistêmicos e neuroológicos). A amplificação do segmento de 721 pares de base foi possível em 45/56 cães. Em 34/45 cães o CDV foi detectado tanto em urina e quanto em leucócito. Em 11/45 cães somente um tipo de material biológico foi positivo (urina 1/45 e leucócito 10/45). A variedade de sinais clínicos da cinomose canina e a escolha do material pode gerar resultados falso negativos, principalmente em cães com sinais clínicos somente sistêmicos, grupo A onde 7/17 animais foram negativos quando comparados com 1/8 do grupo B e 3/31 do grupo C, é aconselhado o uso de no mínimo duas amostras biológicas para detectar o CDV. Em outro estudo 27 cães positivos e 5 cães negativos pela técnica de RT-PCR para o gene da nucleoproteína do CDV (Gene N) foram distribuídos em quatro grupos (A= sinais clínicos sistêmicos; B= sinais clínicos neuroológicos 8; sinais clínicos sistêmicos e neuroológicos 9 e D= controle 5 cães). Para o ensaio de polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição as enzimas *Hinf* I e *Rsa* I foram selecionadas para determinar o perfil de restrição do produto amplificado de 721 pb do gene H diretamente das amostras biológicas e das estirpes padrão Onderstepoort, Rockborn e Snyder Hill do CDV. Todos os produtos da RT-PCR geraram com a enzima *Hinf* I dois fragmentos visualizados com 320 e 250 pb. Com a enzima *Rsa* I todas as amostras de campo geraram dois fragmentos visualizados de 320 e 230 pb. A estirpe Onderstepoort após a digestão com a enzima *Rsa* I foi cortado em 363 pb e 327 pb. O perfil de restrição das estirpes Rockborn e Snyder Hill foi o mesmo com dois fragmentos de 363 e 358 pb, confirmando a análise computacional. A estirpe Rockborn não apresenta a seqüência do gene H depositada em banco de dados público. Os produtos da RT-PCR e da RFLP foram determinados por eletroforese em gel de agarose corado a 2% com brometo de etídio e os fragmentos de menor peso molecular não puderam ser visualizados. A relação molecular demonstrada pela RFLP sugere que as amostras do CDV circulantes na região norte do Paraná seja diferente das estirpes padrão do CDV e essas diferenças no perfil de restrição podem caracterizar diferenças moleculares.

Palavras-chave: Cinomose canina. Gene H. Material biológico. RT-PCR. RFLP.

NEGRÃO, F. J. **Partial molecular evaluation of canine distemper virus hemagglutinin gene.** 2004. 100p. Dissertation (Master`s degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ABSTRACT

Urine and leucocytes from 56 dogs with canine distemper clinical diagnosis were evaluated by use in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to canine distemper virus (CDV) hemagglutinin gene. In accordance with clinical signs the dogs was disposed in three groups (A/systemic=17; B/neurological=8; C/systemic and neurological=31) the partial amplification from 721 base pare was possible 45 of 56 dogs. In 34 of 56 dogs the CDV was detected such in urine as in leucocytes. In 11 of 45 dogs only one biological sample was positive (urine=1 dog; leucocytes=10 dogs). It is advisable at least two biological sample to detect the CDV. The variability of canine distemper sings and the material choice may be to generate false-negative results principally en dogs with only systemic clinical sings (A group) where in 7 of 17 dogs was negative when compared with 1/8 B group and 3/31 C group, it is advisable at least two biological sample to detect the CDV. In other experiment 27 dogs positive and 5 negative by RT-PCR to CDV nucleoprotein gene were disposed in four groups in accordance with clinical sings (systemic=10 dogs; neurological=8 dogs; systemic and neurological= 9; control=5). To restriction fragment length polymorphism assay (RFLP) the enzymes *Hinf* I and *Rsa* I were selected to determine the RFLP pattern from 721 base pare (bp) fragment of haemagglutinin gene was amplified by using directly biological sample and the laboratory CDV strain Onderstepoort, Rockborn and Snyder Hill. Everyone PCR products after digestion with *Hinf* I were cut in two seeing fragment of 320 and 230 bp. The wild-type CDV PCR products later than digestion with *Rsa* I were cut into two seeing fragment around 360 and 230 bp that differ from the laboratory CDV strain. The Onderstepoort PCR product after than digest with *Rsa* I was cut in 363 and 327 bp. The RFLP pattern with *Rsa* I from Snyder Hill and Rockborn were the same two fragments with 363 and 358 bp. The Rockborn strain don't have the genome in public database, but the computational analysis using public nucleotide sequence database and this study show the same RFLP pattern for Onderstepoort and Snyder Hill. The PCR and RFLP products were detected by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide staining and the little fragments don't be seeing. The molecular relationships showed in RFLP analysis suggest that wild-type current in north Paraná are unlike from laboratory CDV strains, and this different RFLP pattern may be characterize molecular distinction.

Keywords: Canine distemper. H gene. Biological sample. RT-PCR. RFLP.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TRABALHO 1 – Avaliação molecular parcial do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina detectado em cães naturalmente infectados (PAPER)

Quadro 1 – Distribuição dos grupos de cães utilizados para a caracterização parcial do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina de acordo com a forma clínica da infecção, Londrina –PR, 2003.....58

TRABALHO 2 – Avaliação comparativa da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção do vírus da cinomose canina (SHORT COMMUNICATION)

Tabela 1 – Resultado da RT-PCR para o gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina distribuído de acordo com a forma clínica da doença, em cães naturalmente infectados, Londrina-PR, 2003.....80

Quadro 1 – Resultado da Técnica de RT-PCR para o gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina em urina e leucócitos distribuídos de acordo com a forma clínica da doença em cães naturalmente infectados, Londrina-PR, 200381

LISTA DE FIGURAS

TRABALHO 1 – Avaliação molecular parcial do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina detectado em cães naturalmente infectados (PAPER)

- Figura 1** – Resultado da RT-PCR com os *primers* NAW1 e NAW2, frente a outros vírus de importância para a espécie canina; a estirpe Rockborn e urina e leucócitos de cães controle68
- Figura 2** – Identificação do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina, frente as diferentes amostras biológicas.....68
- Figura 3** – Resultado da técnica e RT-PCR utilizando os *primers* NAW1/NAW2 e CDV1/CDV2, frente a urina e leucócitos como amostras biológicas.....69
- Figura 4** – Perfil de restrição de produtos de RT-PCR do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina utilizando as enzimas *Hinf* I e a enzima *Rsa* I.....69

TRABALHO 2 – Avaliação comparativa da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção do vírus da cinomose canina (SHORT COMMUNICATION)

- Figura 1** – Identificação do gene da hemaglutinina e da nucleoproteína do vírus da cinomose canina, frente a urina e leucócitos como amostra biológica84
- Figura 2** – Identificação do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina em urina e leucócitos de cães naturalmente infectados.....84

LISTA DE ABREVIÇÕES

CDV	Vírus da cinomose canina (<i>Canine Distemper Virus</i>)
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
IFI	Imunofluorescência Indireta
Kb	Kilo base (1000 pares de bases)
pb	Pares de base
A	Adenina
C	Citosina
T	Timina
G	Guanina
Y	Base degenerada corespondente as bases C ou G
Kg	Kilograma
L	Litro
mA	Miliamperes
mg	Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
n.	Número
ng	Nanograma
°C	Graus Celsius
®	Marca Registrada
p.	Página
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia pela polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
RFLP	Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Length Fragment Polymorphism Assay</i>)
RNA	Ácido Ribonucléico
RT	Transcrição reversa ou transcriptase reversa (<i>Reverse Transcriptase</i>)
PI	Pós-infecção
pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
SNC	Sistema nervoso central
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i> ou enzima polimerase
TE	Solução de Tris – EDTA
TEB	Solução de Tris – EDTA – Ácido Bórico
U	Unidade
V	Volts
v.	Volume
h	horas

SUMÁRIO

1 CINOMOSE CANINA	12
1.1 INTRODUÇÃO	12
2 ETIOLOGIA	14
2.1 ORGANIZAÇÃO VIRAL.....	14
2.2 REPLICAÇÃO VIRAL	15
2.3 ADAPTAÇÃO A UMA NOVA ESPÉCIE	16
2.4 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS E MOLECULARES	16
3 EPIDEMIOLOGIA	19
4 PATOGENIA	21
5 IMUNOLOGIA	24
6 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA	26
6.1 SINAIS CLÍNICOS SISTÊMICOS	26
6.2 SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA NEUROLÓGICA.....	27
7 DIAGNOSTICO	29
7.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO	29
7.1.1 Provas complementares.....	30
7.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	31
7.2.1 Exame histopatológico	31
7.2.2 Diagnóstico etiológico.....	33
8 TERAPIA E CONTROLE AMBIENTAL	36
9 CONSIDERAÇÕES EM SAÚDE PUBLICA	38
REFERÊNCIAS	40

2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL.....	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	51
3.1 AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA DETECTADO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS (PAPER)	52
Resumo	52
Abstract	53
Introdução	54
Material e Métodos.....	56
Resultados e Discussão.....	62
Referências	70
3.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA URINA E DE LEUCÓCITOS COMO AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA (SHORT COMMUNICATION)	73
Resumo	73
Abstract	74
Comunicação	75
Referências	85
4 CONCLUSÕES	87
ANEXOS	88
ANEXO A – Lista de Reagentes.....	89
ANEXO B – Preparo de Soluções	90
ANEXO C – Diluição dos primers.....	93
ANEXO D – Número de acesso das seqüências do CDV (GenBank).....	95
ANEXO E – Protocolos de Técnicas	96

1 CINOMOSE CANINA

1.1 INTRODUÇÃO

A partir do primeiro estudo descritivo realizado em 1771, na Europa (FANKHAUSER, 1982), até o surgimento das primeiras vacinas nos anos de 1950 e 1960, a cinomose canina foi considerada uma doença viral incontrolável (FENNER *et al.*, 1993; TIPOLD, 1995). Dentre os cães não vacinados é a doença infecciosa com maior taxa de mortalidade e representa até 15,3% de todas as doenças inflamatórias do sistema nervoso central (GREENE; APPEL, 1998). No Brasil a cinomose pode representar em torno de 6% de todas as ocorrências atendidas em clínicas veterinárias e ser responsável por 11% das mortes de cães (GOUVEIA *et al.*, 1987; HEADLEY; GRAÇA, 2000).

Nos últimos anos, há relatos de doença pelo vírus da cinomose canina (*canine distemper vírus –CDV–*) em outras espécies de carnívoros (APPEL *et al.*, 1994; CARPENTER *et al.*, 1998), resultado na mudança de características do CDV, o qual apresentava uma gama restrita de hospedeiros (WILD *et al.*, 1995). A capacidade do CDV em infectar primatas não humanos e o envolvimento em doenças humanas como esclerose múltipla e doença de Paget é controverso (APPEL; SUMMERS, 1999). Entretanto, é consenso que o CDV deve ser investigado quanto ao seu papel frente a essas afirmações (YOSHIKAWA, *et al.*, 1989; CARTWRIGHT *et al.*, 1993; GORDON *et al.*, 1993; VANDEVELDE; ZUBLIGGEN, 1995).

Surtos de cinomose vêm sendo relatados em todos os continentes, em cães vacinados e não vacinados (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; APPEL *et al.*, 1994; MORREL, 1994; MOCHIZUKI *et al.*, 1999), a negligência dos proprietários em relação à vacinação e ou reforço vacinal; a influência de anticorpos passivos no momento da vacina e a possibilidade de falha vacinal por mutação de escape, são responsabilizados pelo aparecimento destes surtos (HAAS *et al.*, 1997).

Dados imunológicos e a comparação entre as seqüências do genoma viral das estirpes isoladas do CDV demonstram que a maior glicoproteína de membrana, a hemaglutinina (H), é a mais variável das proteínas do CDV e

portanto, o melhor local para pesquisa e monitoramento das mudanças genéticas no CDV (ÖRVELL *et al.*, 1990; BOLT *et al.*, 1997; HAAS, *et al.*, 1997; MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

2 ETIOLOGIA

A etiologia viral da cinomose canina foi demonstrada em 1905, por Carré, por meio de inoculação experimental, sendo confirmada em 1923 por Putoni. Porém, os avanços foram desencadeados pelos experimentos de Dunkin e Laidlaw (1926a, 1926b) que demonstram a suscetibilidade do Ferret (*Mustela putorun furo*) ao vírus da cinomose constituindo assim a base para o desenvolvimento de soros hiperimune e vacinas (FANKHAUSER, 1982).

O CDV pertence a família *Paramyxoviridae* e ao gênero *Morbillivirus* (FENNER, 1993), gênero que inclui o vírus do sarampo do homem (*measles virus* –MV–); *phocine distemper virus* (PVD); o vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV) e o *rinderpest vírus* (RPV). Considerado exótico no Brasil, o RPV é confinado à ordem dos mamíferos herbívoros *Artiodactyla* (bovinos, antílopes, girafas, suínos e cervos) e representa o arquétipo viral do gênero *Morbillivirus*. Há afirmações que o CDV e o MV surgiram da adaptação do RPV a novos hospedeiros (NORRBY *et al.*, 1985; WILD *et al.*, 1995; BOLT *et al.* 1997).

Apesar de existirem diferenças de patogenicidade e antigenicidade entre as estirpes do CDV isoladas, os vírus são de um único sorotipo (APPEL; SUMMERS, 1999), sendo o cão doméstico considerado o reservatório do vírus (GREENE; APPEL, 1998).

2.1 ORGANIZAÇÃO VIRAL

O virion é envelopado, pleomórfico e relativamente grande, variando de 150 a 250 nm (PRINGLE, 1999). O genoma viral consiste de uma fita RNA de polaridade negativa, não segmentada, com 16.000 a 20.000 pb de extensão, protegida pelo nucleocapsídeo formado pela proteína N, associada as proteínas L e P (DIALLO, 1990; BARBEM *et al.*, 1999). As proteínas N, P e L formam o complexo ribonucleoproteico (RNP) que atua na transcrição e replicação viral (SHIDHU *et al.*, 1995).

O capsídeo apresenta simetria helicoidal e é circundado por um envelope lipoprotéico derivado da membrana da célula hospedeira (GREENE; APPEL, 1998). As projeções peploméricas glicoproteicas são formadas por proteínas integrais denominadas de hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F) que se projetam na face externa. Na parte interna do envelope está a proteína Membrana-associada ou Matriz (M) é a responsável pela interação entre as proteínas H e F e o RNP do vírus (APPEL, 1987; DIALLO, 1990; SHIDHU *et al.*, 1995).

O genoma viral possui seis janelas de abertura de leitura (*open reading frame* –ORF–). A organização genômica a partir da extremidade 3' é constituída pelo gene da proteína do nucleocapsídeo (N), o gene da fosfoproteína (P), o gene da proteína da matriz (M), o gene da proteína de fusão (F), o gene da proteína hemaglutinina (H) e o gene da grande proteína (Large–L–), a qual está próxima a extremidade 5' do genoma, todos os genes intercalados por regiões de não codificação protéica (CURRAN *et al.*, 1992).

2.2 REPLICAÇÃO VIRAL

A replicação inicia-se com a entrada do vírus na célula susceptível, que pode ocorrer de duas formas distintas: por um processo alternativo de endocitose, englobamento das partículas virais pelos fagossomas que no citoplasma funde-se ao lisossoma formando o fagolisossoma que por diferença de pH (pH ácido) libera o nucleocapsídeo viral no citoplasma celular (WILD *et al.*, 1995) ou pela adsorção, onde a proteína H media a ligação a um receptor celular e com a participação da proteína F, na forma de F₀ que clivada em F₁ e F₂ promove a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira, liberando o nucleocápsideo para o citoplasma (LAMB; KOLAKOVSKY, 2001).

Após a entrada na célula ocorre o desnudamento do genoma viral, o RNA livre é transcrito por seis unidades de polimerase viral (KOLAKOVSKI *et al.*, 1998) no citoplasma em RNAm, que servirá como molde para a tradução dos genes em proteínas virais e molde para a replicação da fita negativa do genoma, no decorrer do processo as fitas da progênie viral são empacotadas no capsídeo protéico (LAMB; KOLAKOVSKY, 2001).

Durante o último estágio da replicação viral as proteínas do envelope migram para a membrana da célula hospedeira, os nucleocapsídeos agrupam-se próximo a membrana celular e são liberados da célula pelo processo de brotamento, adquirindo um envoltório lipoprotéico, derivado da membrana da célula hospedeira onde estão presentes as proteínas H e F. A proteína M desempenha uma importante função na liberação do vírus maduro (LAMB; KOLAKOFSKY, 2001). A Nucleoproteína (N) é o antígeno viral produzido em maior concentração durante a replicação viral devido a polaridade transcricional (BARBEM *et al.*, 1999).

2.3 ADAPTAÇÃO A UMA NOVA ESPÉCIE

A adaptação do vírus a uma nova espécie, provavelmente, envolve a habilidade em reconhecer e usar um tipo diferente de receptor celular para a ligação e entrada na célula hospedeira. A clonagem e o sequenciamento do CDV, MV e RPV tem possibilitado a análise comparativa evolutiva. Esta análise determina que a glicoproteína responsável pela ligação, proteína H é a menos conservada, com somente 34% de homologia entre o MV e o CDV e responsável pelo uso de um receptor celular diferente com a evolução destes vírus nas diferentes espécies animais (WILD *et al.*, 1995).

2.4 CARACTERÍSTICAS ANTIGÊNICAS E MOLECULARES

A análise de estirpes vacinais e selvagens dos vírus CDV, RPV e MV, utilizando ensaios de radioimunoprecipitação e imunofluorescência com anticorpos monoclonais heterólogos para representar a relação frente as proteínas virais (N, L, M, H, F e P), demonstrou que os epítopos das proteínas N e F apresentam um alto grau de homologia, as proteínas P e M, apresentam homologia parcial e a proteína H apresenta baixo grau de homologia (SHESBERADARAN *et al.*, 1986; BOLT *et al.*, 1997).

Nas estirpes do CDV avaliadas a maior variação ocorre na proteína H e as proteínas F e P são pouco afetadas (BOLT *et al.*, 1997). Reatividade cruzada e reações tipo específica são obtidas com as proteínas virais internas (M, P e N) (SHESBERADARAN *et al.*, 1986). As proteínas H e F induzem a formação de anticorpos neutralizantes, sendo os anticorpos anti-F mais eficientes na proteção pela sua maior homologia (DIALLO, 1990).

O seqüenciamento do genoma do CDV demonstra um grau de homologia de 53% no gene que codifica a proteína H e 77% no segmento do gene que codifica a proteína N. O gene que codifica a proteína M tem 67% de homologia para a seqüência de nucleotídeos e 76% de homologia para a seqüência de aminoácidos quando comparada a outros Morbilivírus (ROZENBLATT *et al.*, 1985; BELLINI *et al.*, 1986; LÖFFLER *et al.*, 1997).

O CDV para fins didáticos tem sido classificado em dois grupos distintos, para a análise da diversidade genética. Um grupo é denominado de CDV antigo (*Old CDV*) e inclui as estirpes padrão e vacinais isoladas nas décadas de 50 e 60 (Onderstepoort, Lamberle, Convac, Rockborn, Snyder Hill) e utilizadas nas vacinas até hoje. O outro grupo é denominado de novo CDV (*new CDV*) e inclui as estirpes isoladas na Europa, na América do Norte e na Ásia (MOSHIZUKI, 1999).

Uma nova classificação é proposta a partir da análise dos nucleotídeos do gene H do CDV, correlacionando a origem das estirpes isoladas recentemente e as diferentes áreas geográficas. As estirpes selvagens e vacinais demonstram pronunciada diferença entre os nucleotídeos e a forma da proteína H, dividindo as estirpes em genogrupos distintos, mas não agrupados por espécies e sim por regiões geográficas (BOLT, *et al.*, 1997). A análise filogenética do gene H das estirpes virais isoladas em cães na Alemanha (HAAS *et al.*, 1997) e em carnívoros na África (CARPENTER *et al.*, 1998), revelou que estas estirpes são distintas geograficamente e as linhagens ou genogrupos não estão exclusivamente agrupadas com a espécie hospedeira (HARDER *et al.*, 1996; BOLT *et al.*, 1997; CARPENTER *et al.*, 1998).

As estirpes do CDV isoladas apresentam patogenicidade distinta e homologia de 99% entre as bases do gene N e assim consideradas antigenicamente idênticas. O gene N contém 1683 nucleotídeos e o grau de homologia das estirpes selvagens com a estirpe vacinal Onderstepoort é de 93,2%. Entre essas estirpes a seqüência de aminoácidos (523 aa) tem 95,2% de homologia (YOSHIDA *et al.*, 1988).

A estirpe selvagem A75/17 é capaz de produzir infecção persistente em vivo e apresenta alterações no gene N e no gene M, essas alterações determinam mudanças na proteína deduzida e afetam o processo de brotamento e podem exercer um papel na persistência, essa mutação não ocorre em outras estirpes virais como a estirpe Snyder Hill que é neurotrópica, virulenta e incapaz de causar infecção persistente (STETTLER *et al.*, 1997).

A análise do gene H, descrita na Alemanha, sugerem que a diferença entre a seqüência das estirpes selvagens circulantes, comparadas com as estirpes vacinais, ocorreu naturalmente no campo, após 60 anos ou após os progenitores virais terem circulado antes de serem isolados e atenuados (HAAS *et al.*, 1997).

É pouco provável que a adaptação ao cultivo celular tenha causado as mudanças radicais na seqüência do vírus desde seu isolamento. No caso do RPV a análise molecular da estirpe vacinal, após múltiplas passagens em cultura de célula, apresentou mais de 99% de semelhança com vírus inicialmente isolado (BARRON; BARRET, 1995). A seqüência de aminoácidos da Hemaglutinina do RPV selvagem isolado difere em 10-12 % da seqüência da Hemaglutinina das estirpes vacinais. Variação semelhante as encontradas no CDV e no MV quando comparadas as estirpes selvagens com as vacinais (TAMIN *et al.*, 1994; HAAS, *et al.*, 1997; MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

A proteína H tem a sua maior região hidrofóbica perto do N-terminal, supostamente, serve para ancorar a proteína na membrana viral. As regiões hidrofóbicas são inteiramente conservadas (DIALLO, 1990). Mudanças no processamento antigênico da proteína H, provavelmente, são determinados pela cisteína, um importante aminoácido estrutural, com um papel maior na conformação da estrutura protéica (HU; NOORBY, 1994).

Entretanto, em todas as estirpes do CDV os resíduos de cisteína estão completamente conservados. Sítios de Glicosilação ou resíduos de asparaginina, podem alterar o peso molecular da proteína e interferir na propagação viral, entre as estirpes isoladas não há indício de diferença do comportamento viral, pois as alterações nos Sítios de Glicosilação são ocasionais e sugerem uma co-circulação de estirpes virais (MOSHIZUKI *et al.*, 1999; VON MESLING *et al.*, 2001).

3 EPIDEMIOLOGIA

A disseminação da doença é feita principalmente por aerossóis, também, ocorrendo transmissão transplacentária. Na fase de viremia, o CDV está presente em alto título nas secreções e excreções, independente da presença ou ausência de sinais clínicos. A excreção viral inicia-se, aproximadamente, sete dias pós-infecção (PI), podendo persistir por até 60 a 90 dias. O CDV é extremamente sensível, não persistindo no canil após a remoção do cão infectado, a viabilidade da partícula viral a 20°C em suspensão de tecido e exudatos, é de no máximo 3 horas (GREENE; APPEL, 1998).

Os cães com infecção assintomática representam uma importante fonte de disseminação da doença (GREENE; APPEL, 1998; APPEL; SUMMERS, 1999). Os filhotes ao perderem a imunidade passiva e os animais que não são imunizados, periodicamente, são os principais responsáveis pela manutenção do vírus no ambiente (APPEL; SUMMERS, 1999).

Além dos membros da família *Canidae* (cão, coiote, lobo, chacal, raposa e dingo), o CDV tem como susceptíveis: as famílias *Mustelidae* (furão, ferret e marta), *Procionidae* (jupará, quati, guaxinim e panda), *Ailuridae* (panda vermelho), *Viveridae* (gato de alcália), *Hyaenidae* (hiena), *Protelidae* (protelo-mamífero semelhante à hiena), alguns membros da família *Ursidae*, *Tayassuidae* (Javalis-pecari de coleira, *Tayassu tajacu*), *Felidae* (leões, tigres e onças) e mamíferos marinhos de várias famílias (baleias, golfinhos, botos, leões marinhos e focas) (APPEL; SUMMERS, 1995; ANDERSON, 1995; DOMINGO *et al.*, 1995).

Em Santa Maria, Rio Grande do Sul um levantamento epidemiológico dos anos de 1985 a 1997 demonstra que 11,5 % (250/2136) dos animais apresentavam lesões histológicas compatíveis com cinomose (HEADLEY; GRAÇA, 2000). E, no período de janeiro de 1981 a agosto de 1983, nos animais atendidos no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), observou-se uma prevalência de 6,1% de cinomose canina entre todos os casos atendidos no HV, com maior frequência em animais situados na faixa etária entre 2,1 a 12 meses, e que 22,3% dos animais com cinomose tinham recebido uma ou mais doses de vacina (GOUVEIA *et al.*, 1987).

O CDV é enzoótico mundialmente, ocorrendo epizootias em áreas onde a doença inexistia por muitos anos e onde há população altamente susceptível (APPEL, 1987). Recentemente, surtos epidêmicos de cinomose em cães vêm sendo relatados na Europa, na Ásia e na África onde em alguns surtos os animais haviam recebido uma ou mais doses de vacina (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; MORREL, 1994; APPEL *et al.*, 1994; MOCHIZUKI *et al.*, 1999).

A cinomose é considerada responsável pela extinção do Black-footed Ferret (*Mustela nigripes*) selvagem (ANDERSON, 1995). Surtos com alto coeficiente de mortalidade, também vem sendo relatados nos últimos anos e com certa freqüência em leões e hienas na África (HAAS, *et al.*, 1996; MORREL, 1996; ROELKE-PARKER *et al.*, 1996), mustelídeos na Europa (VAN MOOL *et al.*, 1995) e grandes felinos e javalis em cativeiro na América do Norte (APPEL; SUMMERS, 1995).

A mortalidade varia de acordo com a espécie susceptível chegando a 50% nos cães, 100% nos mustelídeos e 0% nos felinos domésticos (LÖFFLER *et al.*, 1997). Os felinos domésticos e os suínos são conhecidos como susceptíveis mas não desenvolvem a doença clínica e não excretam o vírus (APPEL *et al.*, 1974).

No Brasil não há estudos do envolvimento do CDV nas doenças que causam mortalidade nos animais selvagens e de quais estirpes virais circulam.

4 PATOGENIA

A manifestação da infecção depende do título viral inicial, da estirpe vacinal, da idade do animal e do título de anticorpos (Ac) neutralizantes para o CDV (APPEL, 1969; APPEL; SUMMERS, 1999). O aparecimento das lesões varia de três semanas a três meses, com a cura ou morte do animal (APPEL, 1969; APPEL, 1970). O CDV ao entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior, nas primeiras 24 horas pós-infecção (PI), se replica nos macrófagos e dissemina-se por via linfática até os linfonodos regionais e tonsilas. Por dois a quatro dias ocorre o aumento da carga viral nos linfonodos pulmonares e tonsilas e por volta do 7º dia já está presente em todo o tecido linfático (APPEL; SUMMERS, 1999).

Neste período entre o 2º e o 6º dia PI ocorre o primeiro pico febril que coincide com o aparecimento de interferon na circulação (APPEL; SUMMERS, 1999). Do quarto ao sexto dia já esta ocorrendo multiplicação viral dentro dos folículos linfóides do baço e do timo, nas células de Kupffer do fígado, na lâmina própria do estômago e intestino delgado (APPEL, 1970).

Por volta do 8º a 9º dia os animais que desenvolvem Ac soroneutralizante com título maior ou igual a 100 debelam a infecção e podem não apresentar sintomatologia. Se a resposta imune é inconsistente o animal pode vir a óbito sem apresentar sinais clínicos da doença. Sem resposta imune protetora ocorre a disseminação hematogena para o epitélio e/ou sistema nervoso central (SNC) levando aos sinais clínicos. Neste período ocorre o segundo pico febril (APPEL, 1969; APPEL, 1970; APPEL; SUMMERS, 1999).

A lesão ocorre aparentemente nos locais de predileção do vírus, o desenvolvimento de uma resposta imune muito lenta direciona ao desenvolvimento de doença aguda ou subaguda (APPEL, 1970). A infecção subaguda é caracterizada por progressão tardia, com sinais sistêmicos mais brandos e por alterações neurológicas em grau variado (APPEL; SUMMERS, 1999). A infecção crônica é consequência da resposta imune humoral (MORITZ *et al.*, 2000) .

A entrada do vírus no SNC ainda não é bem compreendida, a barreira hematoencefálica impede a entrada do vírus no SNC e há necessidade de uma viremia de grande magnitude e grande extensão para quebrar esta barreira (SUMMERS *et al.*, 1978). A trombocitopenia induzida pelo CDV pode aumentar a

permeabilidade capilar e permitir o acesso direto de complexo antígeno-anticorpo ao SNC. Vírus associados a plaquetas podem infectar diretamente o endotélio como consequência do processo de fusão (KRAKOWKA *et al.*, 1987).

As células T e CD4 positivas servem como alvo para o vírus durante o estágio agudo da infecção. A distribuição do CDV foi examinada por imunohistoquímica com anticorpos monoclonais específicos. O antígeno viral foi localizado em células T-dependente e em folículos de órgãos linfóides (IWATSUKI *et al.*, 1995).

Há estudos que demonstram a presença do vírus associado a linfócitos no espaço perivascular do SNC, entretanto este foi demonstrado 10 dias PI quando já esta estabelecida as lesões. A freqüente ocorrência de lesões periventriculares e sub-meningiais e a facilidade em encontrar o vírus nas células do plexocoróide e epêndima sugere a entrada do vírus junto com os componentes do líquido cérebro espinhal (*Cerebrospinal Fluid –CSF–*), presumidamente associado a células do sistema imune infectadas (VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1995). No CSF o vírus pode ser encontrado nas células mononucleares, as quais tem sido observada fundindo-se com as células endimais (HIGGINS, *et al.*, 1982; VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1995).

Estirpes virais que induzem doença de curso agudo fatal aparentemente se localizam na substância cinzenta e determinam destruição neuronal (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; WILD *et al.*, 1995) resultando predominantemente em encefalite (VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1995; GREENE; APPEL, 1998). Enquanto, estipes virais que induzem à doença crônica as lesões tendem a se localizar na substância branca levando a desmielinização (APPEL; SUMMERS, 1999).

Os estudos sobre a patogenia da infecção do CDV no SNC consideram dois estádios de desenvolvimento da desmielinização um agudo e outro crônico. A desmielinização inicial ocorre em torno da terceira semana PI, sem a participação de resposta imune inflamatória, pois coincide com uma extensa imunossupressão (VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1995).

Dependendo do grau e da velocidade da resposta imune os animais podem se tornar moribundos ou se recuperar após desenvolver uma doença leve ou subclínica. Um grupo intermediário de animais recupera-se lentamente ou parcialmente e tendem a desenvolver doença crônica ou recidivante com progressão

da desmielinização como resultado de reações imunopatológicas (VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1995).

Os oligodendrócitos são as células formadoras de mielina no SNC e não tem a capacidade de expressar proteínas virais (VANDEVELDE; ZUBRIGEN, 1998). A extensão da lesão provocada pelo CDV nessas células, parece não ser significativa para explicar a ocorrência da desmielinização (CARLTON; MCGAVIN, 1998). Outros três mecanismos são propostos para o desenvolvimento da desmielinização. O primeiro envolve a capacidade de astrócitos e macrófagos em produzir fatores de necrose tumoral em resposta aos antígenos virais e o segundo a citotoxicidade mediada por células dependente de Anticorpos (CARLTON; MCGAVIN, 1998). O terceiro mecanismo seria a formação de anticorpos antimielina, a presença dessas imunoglobulinas já esta correlacionada com o desenvolvimento das lesões celulares no SNC (KRAKOWKA *et al.*, 1973).

A persistência viral no SNC e a capacidade de produzir doença desmielizante progressiva (*Old Dog Encephalitis* –ODE–) estão associadas a dois processos que interferem na liberação das partículas virais e a exposição de proteínas imunogênicas no espaço extracelular. O primeiro processo é a disseminação não citolítica do vírus e o segundo o reduzido brotamento viral, isto leva a ativação dos macrófagos, entretanto, forma-se uma resposta imune antiviral eficiente para evitar a disseminação, mas ineficiente para debelar a infecção. (ZUBLIGGEN *et al.*, 1995; STETTLER *et al.*, 1997).

5 IMUNOLOGIA

O objetivo da vacinação é a formação de anticorpos para a proteção do organismo contra a entrada do agente infeccioso, a entrada do CDV ocorre pela integração entre as 2 glicoproteínas de superfície H e F, presentes na superfície da membrana, as quais são o alvo dos mecanismos de defesa. A proteína H *in vitro* é o antígeno envolvido na neutralização, mas *in vivo*, o Ac antiproteína F evita a expansão da infecção e o desenvolvimento da doença (NORRBY *et al.*, 1986).

O desenvolvimento do sistema imune fetal, segue um padrão comum, o feto não é totalmente indefeso ao nascimento, mas com menor capacidade de resposta que um adulto, pois o desenvolvimento da resposta imune humoral, imunocompetência, desenvolve-se a partir do terço final de gestação (JACOBY, 1969).

O útero, ambiente estéril, torna a resposta imune do feto à hostilidade do meio sempre primária, lenta e com baixos níveis de anticorpo, concluindo-se que a imunidade passiva é muito importante para a proteção do feto e do recém nascido. (JACOBY, 1969; MCDONALD, 1992).

Os anticorpos específicos formados ativamente pela mãe em resposta a exposição a um determinado agente patogênico, são transferidos para o feto, imunidade passiva, por via transplacentária em quantidade significativa, sendo que a maior quantidade de anticorpos é transferida para o neonato através do colostro até 48 horas após o nascimento (JACOBY, 1969; MCDONALD, 1992).

A quantidade de anticorpos transferida da mãe para o filhote depende do *estatus* imunitário e nutricional da mãe e da permeabilidade do trato digestivo do neonato a imunoglobulina, sendo essa permeabilidade inversamente proporcional ao tempo pós-nascimento. O tempo necessário para que as imunoglobulinas decresçam a níveis não protetores é dependente de sua concentração inicial (MCDONALD, 1992; GREENE; APPEL, 1998).

A imunidade passiva, pode perdurar em média por 33 dias e os anticorpos residuais podem interferir na resposta protetora das vacinas (OTT, 1966; APPEL; SUMMERS, 1999). O aumento da incidência de cinomose em cães, nestes anos recentes, dentre outros fatores por falhas de vacinação pode ser em

decorrência da interferência da imunidade passiva residual (APPEL; SUMMERS, 1999).

O CDV em filhotes, infectados por via transplacentária, podem desenvolver sinais clínicos indicativos de doença neurológica durante as primeiras quatro a seis semanas de vida. Em geral os sinais clínicos surgem entre o 14º e o 18º dias pós-infecção e incluem dispnéia, depressão, anorexia, prostração e colapso, animais que sobrevivem podem apresentar imunodeficiência permanente e apresentar severo dano no esmalte, dentina ou raiz dos dentes. Aborto ou o nascimento de animais debilitados são dependes do período da gestação em que ocorreu a infecção (GREENE; APPEL, 1998).

Cães gnotobióticos infectados com estirpe virulenta do vírus da cinomose e em ambiente controlado, desenvolvem no estágio agudo da infecção uma severa imunossupressão em decorrência da replicação viral no tecido linfóide (KRAKOWKA *et al.*, 1975a). Sem uma resposta antiviral efetiva esses cães podem desenvolver rapidamente uma doença progressiva e morrer, os cães que são hábeis em formar uma resposta imune à infecção pelo vírus da cinomose recuperam-se com poucos ou sem sinais clínicos durante o curso da doença, já animais que demoram a formar resposta imune protetora tendem a desenvolver uma doença neurológica crônica. Quadros que se agravam com o envolvimento de agentes bacterianos secundários (KRAKOWKA *et al.*, 1975b; APPEL, 1970; APPEL, 1969).

A resposta imune depende da cepa viral e capacidade de resposta do sistema imune (APPEL; SUMMERS, 1999). Os anticorpos das classes da imunoglobulina M (IgM) e IgG aparecem no início da infecção, sendo que a IgG é a imunoglobulina mais importante para a imunidade. Sendo que a IgM pode ser detectada por um período que varia de 5 semanas a 3 meses (APPEL, 1987).

O anticorpo IgM pode ser detectado em amostras de soro de cães que manifestam a doença, utilizando um ensaio imunoenzimático (ELISA) ou pelo método de imunofluorescência indireta. Entretanto, esta se apresenta, também, alta após vacinação. O líquido de cães que se recuperam ou de cães vacinados não apresenta Anticorpos ou interferon (APPEL; SUMMERS, 1999).

Cães que têm sido vacinados com CDV inativado não são protegidos contra infecção com vírus selvagem, mas são protegidos contra a doença clínica, quando vacinados com vacinas vivas atenuadas adquirem longa imunidade, semelhante a aquela em decorrência da imunidade pós-infecção (APPEL, 1987).

6 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

A gravidade e variedade de sinais clínicos da cinomose são dependentes da estirpe viral, do local de replicação do vírus e do estatus e/ou competência imunológica do animal (RUDE, 1987; SHELL, 1990; TIPOLD, 1992). A apresentação dos sinais clínicos da cinomose canina varia de inaparente à doença grave, com ou sem sinais relacionados ao SNC, porém aproximadamente 50% a 75% das infecções pelo CDV em cães são inaparentes ou muito brandas (GREENE; APPEL, 1998; APPEL; SUMMERS, 1999).

O CDV é linfotrópico e leva a uma intensa imunossupressão (APPEL; SUMMERS, 1999), que pode desencadear infecções em estado de latência como a herpesvirose e a toxoplasmose. Essas doenças, também, ocorrem em carnívoros domésticos e selvagens, mustelídeos e procionídeos levando a infecções mistas e aumentando a gama de sinais clínicos (DITERS; NIELSEN, 1978).

6.1 SINAIS CLÍNICOS SISTÊMICOS

No início da infecção os sinais de cinomose pode ser confundidos com outras doenças infecciosas (RUDE, 1987; SHELL, 1990). A doença é caracterizada pela presença de dois picos febris e o período de incubação varia de 2 a 4 dias e o primeiro pico febril e os sinais clínicos que o seguem ocorrem três a seis dias pós-infecção (PI) e podem passar despercebidos. Os sinais sistêmicos que sugerem infecção pelo CDV como, descarga nasal e ocular serosa a mucopurulenta, depressão e anorexia, coincidem com o segundo pico febril que ocorre sete a dez dias PI (APPEL; SUMMERS, 1999).

Apesar da cinomose se manifestar com diferentes sinais clínicos, a ocorrência simultânea de um grupo desses sinais facilita o diagnóstico clínico da doença, uma vez que nenhum deles é considerado patognomônico da infecção (APPEL; SUMMERS, 1995).

A evolução da doença coincide com a falha do sistema imune e o aparecimento de sinais gastrintestinais, como diminuição ou ausência de apetite,

vômito, diarreia (mucosa a líquida) e tenesmo, podendo resultar em grave desidratação (APPEL; SUMMERS,1995). Nesta fase sinais como secreção nasal, tosse, dispnéia, apatia, febre e a ceratoconjuntivite seca (KCS) também são muito comuns (GREENE; APPEL, 1998).

A imunossupressão determinada pela replicação viral facilita a instalação de infecções bacterianas secundárias. Durante esta fase o animal pode apresentar doença aguda, com sinais no SNC inicial ou tardio, ou morte súbita por uma doença sistêmica (GREENE; APPEL, 1998; GRÖNE, 1998; APPEL; SUMMERS, 1999).

6.2 SINAIS CLÍNICOS DE DOENÇA NEUROLÓGICA

Os sinais clínicos envolvendo o SNC podem ocorrer i) simultaneamente aos sinais sistêmicos; ii) uma a três semanas após o início dos sinais sistêmicos; ou iii) meses a anos após a resolução da doença sistêmica (GREENE; APPEL, 1998).

Nas infecções pelo CDV, são descritas quatro formas de encefalite i) uma grave e aguda, que afeta os cães jovens, e que apresenta sinais sistêmicos e neurológicos, ii) outra crônica que atinge os cães adultos, onde os sinais sistêmicos podem ou não ocorrer em associação aos neurológicos, iii) a encefalite do cão velho (*Old Dog Encephalitis*–ODE–) onde se observam somente alterações neurológicas sem doença clínica anterior e iv) a encefalite recidivante crônica (ERC) onde se observam somente alterações neurológicas, que geralmente ocorrem meses a anos após a resolução dos sinais sistêmicos (BRAUND,1994; AXTHELM; KRAKOWKA, 1998).

A forma neurológica mais comum de cinomose é a Encefalite do Cão Jovem (ECJ), que geralmente é precedida de sinais sistêmicos da infecção. Os sinais neurológicos são variados e sugerem uma distribuição multifocal das lesões (HOERLEIN; VANDEVELDE, 1978; BRAUND,1994; AXTHELM;KRAKOWKA, 1998).

Os sinais corticais e subcorticais da ECJ incluem convulsão generalizada, alterações comportamentais, como depressão e desorientação. Os sinais de localização no tronco encefálico incluem incoordenação motora, queda,

inclinação da cabeça, nistagmo, mioclonias e ocasionalmente mono ou paraplegias (HOERLEIN; VANDEVELDE, 1978; AXTHELM; KRAKOWKA, 1998).

Assim como na forma sistêmica os sinais clínicos da forma neurológica da cinomose são muito variáveis (ZUBRIGGEN *et al.*, 1995). Cães com sinais neurológicos determinados pelo CDV geralmente apresentam convulsões, ataxia cerebelar vestibular ou sensorial e mioclonias que são mais observadas nos músculos mastigatórios (SHELL, 1990). Cães adultos e animais parcialmente imunes podem desenvolver sinais neurológicos súbitos (JOHNSON, 1987).

No Brasil em estudo realizado por Gebara (2002), usando como diagnóstico a técnica de RT-PCR para detecção de um fragmento do gene N do CDV, encontrou os animais um quadro convulsivo em 11 animais, sendo que 3 animais apresentavam só convulsão, em 4 casos estava associados a ataxia e mioclonia, em 3 somente associado a ataxia e somente em 1 estava associado a mioclonia.

Animais com encefalomielite pelo CDV, também podem desenvolver cegueira em decorrência de uveíte anterior e neurite óptica que são sinais caracterizados por pupilas dilatadas e sem resposta a luz (RUDE, 1987; SHELL, 1990). Outros sinais clínicos relacionados ao CDV também são observados, tais como hipoplasia do esmalte dos dentes, osteosclerose metafiseal dos ossos longos, osteodistrofia hipertrófica e artrite reumatóide (BELL; CARTER, 1991; APPEL; SUMMERS, 1995; BAUMGARTNER *et al.*, 1995; TIPOLD, 1995). Hiperqueratose de focinho e coxim plantar, são mais freqüente em animais com encefalomielite (BRAUND, 1994; GREENE; APPEL, 1998).

A encefalite por reversão vacinal, geralmente, ocorre uma ou duas semanas após a vacinação. Apresenta alta taxa de mortalidade e sinais clínicos de alterações de comportamento, convulsões e cegueira (TIPOLD, 1995; APPEL; SUMMERS, 1999).

7 DIAGNOSTICO

Os patógenos do SNC levam a importantes doenças inflamatórias em todas as espécies animais. Provocam graves e extensos danos neurológicos que resultam na morte do animal e/ou em grande prejuízo econômico (TIPOLD, 1995). A cinomose canina ainda é uma das doenças neurológicas mais graves dos cães domésticos e selvagens susceptíveis e determina alta mortalidade principalmente em animais jovens. Os cães que sobrevivem a cinomose podem apresentar distúrbios neurológicos incompatível com a vida do animal ou ainda torná-lo dependente de anticonvulsivos por toda a vida (APPEL; SUMMERS, 1999; RUDE, 1987).

Muitas doenças do SNC são causadas por agentes infecciosos já conhecidos como vírus, protozoários e fungos, embora haja outros casos em que a etiologia ainda é desconhecida (THOMAS, 1998). O diagnóstico precoce das doenças de etiologia conhecida como cinomose auxilia e direciona o tratamento dos animais e a promove a adoção de medidas profiláticas para evitar sua propagação (GEBARA, 2002).

7.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Os achados clínicos encontrados na anamnese e no exame físico, nem sempre são conclusivos para o diagnóstico definitivo da cinomose, porém a ocorrência simultânea de um grupo desses sinais facilita o diagnóstico da doença, apesar de nenhum sinal clínico ser considerado patognomônico da infecção (BLIXENKRONE-MOLLER, 1989; APPEL; SUMMERS, 1995). Nos estágios iniciais da doença ou durante uma infecção moderada, os sinais podem ser inaparentes ou não característicos, tornando-se aparentes e conclusivos quando todos os sítios alvo já estão comprometidos (WRIGHT *et al.*, 1974)

7.1.1 Provas complementares

7.1.1.1 Hematologia

A proliferação do vírus nos órgãos linfóides determina neutropenia, monocitopenia e linfopenia. Ocorre comprometimento tanto dos linfócitos B como T. A trombocitopenia inicial é decorrente da lise das plaquetas e por diminuição na produção com a evolução da doença (APPEL; SUMMERS, 1999, KRAKOWKA *et al.*, 1987). A linfopenia e a trombocitopenia acompanhada de monocitose podem ser vistas na fase aguda da doença (APPEL; SUMMERS, 1999).

Em um estudo desenvolvido na Universidade Estadual de Londrina (GEBARA, 2002), o resultado do hemograma foi inconsistente para o diagnóstico definitivo. Os cães positivos e negativos controle pela técnica de RT-PCR para cinomose pela técnica, apresentaram os valores obtidos no hemograma similares.

O decréscimo da proteína sérica total incluindo a albumina e aumento da concentração de alfa e gama globulina, são alterações que podem estar presente em outras doenças virais e de cunho inflamatório, não sendo consideradas específicas para a cinomose canina (SHIN *et al.*, 1995; MORITIZ *et al.*, 2000).

7.1.1.2 Exame do Líquido Cefalorraquidiano

Os animais portadores de um quadro agudo de cinomose podem apresentar uma encefalomielite não inflamatória, que resulta em desmielinização com sinais clínicos de doença neurológica, mas que ao exame do líquido não apresentam alterações significativas. Entretanto, aumento na concentração de proteína no líquido superior a 25mg/dL, associado a leucocitose com a predominância de linfocitose, é considerado indicativo da forma inflamatória de encefalomielite determinada pelo CDV (FEITOSA *et al.*, 1997; FRISK *et al.*, 1999).

Os níveis de glicose e cloreto no líquido e no soro de animais com cinomose não foram distintos dos encontrados em animais que não apresentavam o

quadro. Aumento nos níveis de creatina fosfoquinase (CPK) e aspartato aminotransferase (AST) acima dos padrões de normalidade podem ser encontrados em cães com cinomose (FEITOSA *et al.*, 1997).

O aumento da CPK é em decorrência da degeneração da bainha de mielina, entretanto, pode ser encontrado em qualquer degeneração do SNC e em cães com cinomose o nível de CPK pode se encontrar dentro da normalidade. A AST pode permanecer dentro da normalidade e situações não específicas como convulsões podem desencadear o aumento (FEITOSA *et al.*, 1997).

7.1.1.3 Pesquisa de Corpúsculo de Inclusão

A presença de corpúsculo de Inclusão (CI) típico, encontrado no núcleo ou no citoplasma das células infectadas também é considerado definitivo como diagnóstico etiológico da infecção pelo CDV (BLIXENKRONE-MÖLLER, 1993), mas sua ausência não exclui a infecção pelo CDV (APPEL; SUMMERS, 1999).

Os corpúsculos redondos ou ovóides com 5 a 20µm de diâmetro, podem ser encontrados em neutrófilos do sangue periférico, raspados de pele em preparados (imprints) de conjuntiva e epitélio vaginal e com menor frequência são detectadas em linfócitos circulantes, pele, coxins plantares, epitélio da bexiga e conjuntiva (ALLEMAN *et al.*, 1992; APPEL; SUMMERS, 1999).

7.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

7.2.1 Exame histopatológico

Os exames histopatológicos podem ser realizados em fragmentos de pulmão rins, bexiga, baço, linfonodos, intestino delgado e estômago, porém no SNC, em particular no cérebro e cerebelo, as lesões são mais características e podem ser usadas como diagnóstico definitivo da infecção pelo CDV (HAAS *et*

al.,1996; GREENE; APPEL, 1998) porém este é um método de diagnóstico post mortem.

Os achados macroscópicos encontrados incluem atrofia de timo nas infecções pré-natal ou neonatal; pneumonia e enterite catarral nas infecções pós-natal com doença sistêmica; lesão do trato respiratório superior com conjuntivite, rinite, inflamação traqueobrônquica; hiperqueratose de focinho e coxim plantar em cães com doença neurológica. Também podem ser encontrados congestão meningeal ocasional, dilatação ventricular, defeito do esmalte dentário, epididimite intersticial moderada e orquite (HAAS et al., 1996; GREENE; APPEL, 1998).

No exame histopatológico dos órgãos co-relatos detecta-se a pneumonia intersticial catarral; nefrite intersticial subaguda moderada; gastrite não supurativa moderada; encefalite com desmielinização no cerebelo e atrofia com depleção de linfócitos e necrose nos folículos do baço e linfonódos. (HAAS et al., 1996; GREENE; APPEL, 1998). Corpúsculos de inclusão podem ser encontrados nas células alvo do pulmão, bexiga, baço e demais órgãos (CARLTON; MCGAVIN, 1998; MORITIZ et al., 2000).

As alterações no sistema nervoso, diferem na distribuição e na natureza, quando comparadas com as lesões observadas em outras encefalites e são caracterizadas por serem bem delimitadas, de aspecto esponjoso, com desmielinização e a presença de acúmulo de células mononucleares perivascular (mangitos perivascular) e corpúsculos de inclusão podem ser encontrados nas células alvo da replicação, principalmente em astrócitos (CARLTON; MCGAVIN, 1998; MORITIZ et al., 2000).

7.2.2 Diagnóstico Etiológico

7.2.2.1 Detecção do vírus

7.2.2.1.1 Microscopia eletrônica

O diagnóstico pode ser feito pela visualização da partícula viral através da Microscopia Eletrônica (ME) em preparações de fezes, sedimento urinário, plaquetas e outras secreções de cães com cinomose canina (AXTHELM; KRAKOWKA, 1987; ALLERMAN *et al.*, 1992; APPEL; SUMMERS, 1999). Porém sua utilização é limitada pelo alto custo do equipamento e a necessidade de mão-de-obra altamente especializada (SAITO, 2001; GEBARA, 2002).

7.2.2.2 Isolamento viral

O isolamento do CDV virulento tem se mostrado difícil em células de rotina e a taxa de sucesso é baixa. (GREENE; APPEL, 1998). Em casos agudo e subagudo, pode-se isolar o vírus em linfonodos, baço e células do timo (APPEL, 1987).

O CDV tem um tropismo por linfócitos, mas pode ser cultivado em culturas, primária ou contínuo, de células de rim de cão ou furão, células de rim de macaco verde africano (Vero) e linhagem celular de linfócito B de sagüi (B95) (BUXTON *et al.*, 1977; HIRAYAMA *et al.*, 1985; KAI *et al.*, 1993). O isolamento viral em cultivo celular não é uma metodologia muito freqüente no diagnóstico da cinomose canina, por ser trabalhosa, demorada e pode fracassar se o cão não estiver em fase aguda da infecção. O efeito citopático em cultivo celular (ECP) é difícil de ser observado mas pode resultar na formação de células gigantes multinucleadas denominadas sincício (APPEL; SUMMERS, 1999; FRISK *et al.*, 1999).

7.2.2.2 Detecção das proteínas virais

A soroneutralização, a fixação de complemento, a imunoprecipitação, a imunofluorescência indireta e o ensaio imunoenzimático (ELISA), podem ser usadas para a detecção de anticorpos para o vírus da cinomose no soro e no líquido cefalorraquidiano proporcionando dados de valores diagnósticos e prognósticos (BARBEN *et al.*, 1999). Entretanto os animais que morrem de cinomose podem ou não apresentar títulos de Anticorpos (Ac) mensuráveis para o CDV (APPEL; SUMMERS, 1999).

O CDV possui somente um sorotipo apesar das diferenças de patogenicidade entre as estirpes isoladas (exemplo: Rockborn, Ondesteport, Snyder Hill, R-252). Estirpes com diferentes propriedades biológicas, podem ter o mesmo padrão de resposta por análise com anticorpos monoclonais (APPEL; SUMMERS, 1999).

O aumento da concentração da proteína no líquido cefalorraquidiano, indica a presença da Imunoglobulina G (IgG) com atividade específica anti-CDV. Ao analisar o líquido cefalorraquidiano, aumento de IgG e leucocitose com linfocitose, tem sido relacionada à encefalite inflamatória pelo CDV, em cães com a barreira hematoencefálica intacta, isso porque a formação de anticorpos é produzido localmente e em cães vacinados esta alteração não é observada (APPEL; SUMMERS, 1999; VON MESSLING *et al.*, 1999; ZUBRIGGEN *et al.*, 1995).

7.2.2.3 Detecção do genoma viral

As metodologias como a hibridização *in vitro* e RT-PCR, técnicas de biologia molecular, são as ferramentas mais utilizadas tanto para a rotina quanto para a pesquisa, como método diagnóstico a técnica de RT-PCR é o método mais utilizado e está contribuindo para o diagnóstico etiológico de diversas viroses em animais e humanos (HAAS *et al.*, 1991; FRISK *et al.*, 1999; MORITZ *et al.*, 2000; SAITO *et al.*, 2001; GEBARA *et al.*, 2002).

Esta técnica tem sido empregada com sucesso na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas como sangue, soro, urina e fragmentos de órgãos (SAITO *et al.*, 2001; FRISK *et al.*, 1999; SHIN *et al.*, 1995). O limite técnico da detecção da técnica de RT-PCR foi de 0,02 TCID₅₀ em células mononucleares do sangue periférico, confirmando a viremia cinco dias pós-desafio (WELTER *et al.*, 1999).

O RT-PCR rotineiramente esta substituindo os métodos de cultura celular pela fastigiosa natureza do CDV em vitro, detectando o RNA do CDV em material biológico. Quando o CDV é detectado em material biológico pela técnica de RT-PCR, uma RFLP é aplicada ao produto do RT-PCR como tentativa de genotipar o gene H. A diferenciação das estirpes do CDV é feita pela análise dos sítios de glicosilação e resíduos de cisteína do gene H (MOSHIZUKI, 1999). Em muitos estudos os vírus são analisados após o isolamento e passagem em sistema de cultivo celular o que pode levar a mutação e comprometimento do trabalho (MOSHIZUKI, 1999).

O exame molecular pode ser feito diretamente com espécimes clínicos, podendo ser positivo mesmo quando a imuno-istoquímica, ME e o isolamento viral forem negativos. Isto demonstra, portanto, que este método direto é mais apropriado para elucidar a epidemiologia e a virologia molecular das difíceis estirpes de CDV, especialmente quando materiais fresco e suficiente para o isolamento não estão disponíveis. Entretanto, a seleção do oligonucleotídeo iniciador (*primer*) consiste em um ponto crítico para o experimento (MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

8 TERAPIA E CONTROLE AMBIENTAL

A única prática efetiva para o controle da cinomose canina até o presente momento é a vacinação, associada à medidas de higiene padrão (CHAPPUIS, 1995). O prognóstico da doença é reservado na maioria dos casos principalmente naqueles em que sinais neurológicos estão presentes (GREENE; APPEL, 1998).

A vacinação profilática é a maneira mais segura e eficaz de controlar a disseminação do CDV (RUDE, 1987). Para evitar a interferência de anticorpos maternos é recomendado iniciar a vacinação em filhotes com 5-7 semanas de idade e com doses adicionais a cada 3-4 semanas, até o filhote completar 14 semanas de idade. A revacinação anual é indicada e importante pois o título de anticorpos em um terço dos cães vacinados diminui chegando a títulos não protetores em um ano (CHAPPUIS, 1995).

O tratamento é sintomático com a utilização de antibióticos de amplo espectro em decorrência da imunossupressão determinada pelo vírus que pode determinar infecção secundária que é responsável pelo aumento na taxa de mortalidade de 70 a 80 % dos infectados (APPEL, 1987). Não existe medicamento ou quimioterápico efetivo, até o momento, para o tratamento da cinomose (APPEL; SUMMERS, 1999). A fluidoterapia é utilizada para corrigir o desequilíbrio provocado pela anorexia, vômito e diarreia; vitaminas do complexo B e tratamento anticonvulsivo são indicados como terapia auxiliar (RUDE, 1987).

O CDV ao sofrer ação de raios ultravioletas é eliminado em 15 minutos, porém proteínas e agentes antioxidantes ajudam a protegê-lo da inativação no meio ambiente e por ser envelopado é sensível a detergentes, a solventes lipídicos (éter, clorofórmio e fenóis), hipoclorito de sódio e a amônia quaternária e seus derivados, é extremamente susceptível ao calor e a secagem, sendo inativado à temperatura de 50° C a 60° C por 30 minutos (APPEL; SUMMERS, 1999; GREENE; APPEL, 1998).

O CDV pode permanecer viável por até uma hora a 37° C e por no máximo três horas em suspensões de tecidos e exudatos a 20° C. Em climas quentes, o CDV não persiste no canil após a remoção do cão infectado, pois a viabilidade da partícula viral é maior em temperaturas mais frias. Em temperaturas

que variam de 0 a -4° C o CDV pode permanecer por várias semanas infectante no ambiente e em temperaturas menores que -65° C permanece infectante por anos (GREENE; APPEL, 1998).

A participação de espécies selvagens como reservatório da doença ainda é um fato discutido e uma incógnita epidemiológica (HAAS *et al.*, 1997; BOLT *et al.*, 1997).

9 CONSIDERAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

Anticorpos para CDV podem ser detectados em níveis elevados em alguns cães com artrite reumatóide no soro e fluído sinovial, enquanto que em outros cães com artrite reumatóide de etiologia inflamatória ou degenerativa inexistiu esta condição (BELL *et al.*, 1991; FENNER *et al.*, 1993; GREENE; APPEL, 1998). Estudos moleculares detectaram o genoma do nucleocapsídeo do CDV em células de ossos de pessoas com esclerose múltipla. Se o vírus é um agente etiológico da doença ou uma infecção oportunista, necessita ser comprovada (CARTWRIGHT *et al.*, 1993; GORDON *et al.*, 1993).

O vírus do sarampo e o vírus da cinomose causam uma enfermidade com curso semelhante e grave em seus respectivos hospedeiros, caracterizada por febre, exantema e leucopenia. Ambos os vírus sarampo e cinomose, respectivamente, são capazes de determinar uma infecção persistente no sistema nervoso central (SNC) levando à doença neurológica grave, lenta e progressiva (VANDEVELDE; ZUBLIGGEN, 1995; ZUBLIGGEN *et al.*, 1995)

Os mecanismos da doença neurológica lenta em cães mais idosos (Old Dog Encephalitis –ODE–) que é diretamente correlacionada com a presença e persistência do vírus no SNC, é o modelo experimental para estudar a doença grave e geralmente fatal que acomete jovens pacientes humanos, pós-infecção pelo MV, denominada de panencefalite esclerosante sub-aguda (Subacute Sclerosing Panencephalites - SSPE) (ROZENBLATT *et al.*, 1985; YOSHIKAWA *et al.*, 1989; VANDEVELDE; ZUBLIGGEN, 1995).

O vírus vacinal do sarampo é capaz de produzir uma infecção não contagiosa no sistema linfóide dos cães, semelhante ao CDV vacinal (GREENE; APPEL, 1998) e o CDV selvagem é capaz de infectar naturalmente primatas não humanos. Em uma epidemia em macacos japoneses (*Macaca fuscata*), em 1989, surge o primeiro relato de um caso fatal de encefalite viral determinado pelo CDV em primatas não humanos (YOSHIKAWA *et al.*, 1989).

Apesar de todas estas evidências ainda é controversa a participação do vírus da cinomose na esclerose múltipla em humanos. Pois esta suposição, não é bem sustentada pelos experimentos realizados nos últimos 15 anos. Quanto a

participação do CDV na doença humana de Paget, ainda não foi provada (APPEL; SUMMERS, 1999) .

O envolvimento do CDV nas doenças humanas considerado até o momento somente especulação (APPEL; SUMMERS, 1999). Entretanto, é consenso entre os estudiosos que estudos são necessários para eliminar qualquer dúvida que reste.

REFERÊNCIAS

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

ALLEMAN, A.R.; CHRISTOPHER, M.M.; STEINER, D.A.; HOMER, B.L. Identification of intracytoplasmic inclusion bodies in mononuclear cells from the cerebrospinal fluid of dog with canine distemper. **Veterinary Pathology**, v.29, p.84-85, 1992.

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

APPEL, M.J.G. Distemper Pathogenesis in Dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Adviser**. v.156, n. 12, p.1681-1686, 1970.

APPEL, M.; SHEFFY, B.E.; PERCY, D.H.; GASKIN, J.M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 803-806, 1974.

APPEL, M.J.G. Canine distemper virus. In: APPEL, M.J.G. (org.) **Virus Infections of Carnivores**. New York: Elsevier, p. 133-159, 1987.

APPEL, M. J. G.; YATES, R. A.; FOLEY, G. L.; BERNSTEIN, J. J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILLER, L. D.; ARP, L. H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B. A. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 277-288, 1994.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 187-191, 1995.

APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status [on line], 1999. Disponível em <www.ivis.org> Acesso em 13 de julho de 2003.

AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S.; GORHAN, J. R. Canine distemper virus: in vivo virulence of in vitro passaged persistent virus strains . **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, p. 227-234, 1987.

AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S. Experimental Old Dog Encephalitis (ODE) in a Gnotobiotic Dog. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 527-534, 1998.

BARBEN, G.; STETTLER, M.; JAGGY, A.; VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Detection of IgM antibodies against a recombinant nucleocapsid protein of canine distemper virus in dog sera using a dot-blot assay. **Journal Veterinary Medicine**, v. 46, p.115-121, 1999.

BARRETT, T. Unpublished work in: HAAS, L; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D.; BARRET, T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v. 48, p. 165-171, 1997.

BARRON, M.; BARRETT, T. The sequence of the N and L genes of rind pest virus, and the 5' and 3' extra-genic sequences: the completion of the genome sequence of the virus. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 171-186, 1995.

BAUMGARTNER, W.; BOYCE, R.W.; ALLDINGER, S.; AXTHELM, M.K.; WEISBRODE, S.E.; KRAKOWKA, S.; GAEDKE, K. Metaphyseal bone lesions in young dogs with systemic distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 201-209, 1995.

BELL, S.D.; CARTER, D. Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. **Research in Veterinary Science**, v.50, p.64-68, 1991.

BELLINI, W. J.; ENGLUND, G.; RICHARDSON, C. D.; ROZENBLATT, S.; LAZZARINI, R. A. Matrix Genes of Measles Virus and Canine Distemper Virus: Cloning, Nucleotide Sequences, and Deduced Amino Acid Sequences. **Journal of Virology**, v. 58, n. 2, p. 408-416, 1986.

BLIXENKRONE-MØLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.J.G. Studies on manifestation of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.163-173, 1993.

BOLT, G.; JENSEN, T.D.; GOTTSCHALK, E.; ARCTANDER, P.; APPEL, M.J.G.;BUCKLAND, R.; BLIXENKRONE-MOLLER. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. **Journal of General Virology**, v.78, n.2, p. 367-372, 1997.

BRAUND, K.G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. 2^a ed. Saint Louis: Morsby, p. 351-363, 1994.

CARRÉ, M. H. Sur la maladie dès chiens. **Comptes Rendus Hebdomadaire des Seances del Academie des Sciences** , n.140, p. 1489-1491, 1905.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. **Patologia Veterinária Especial**, 2ª ed, Porto Alegre: ArtMed, 1998, 672p.

CARPENTER, M.A.; APPEL, M.J.G.; ROELKE-PARKER, M.E.; MUNSON, L.; HOFER, H.; EAST, M.; O'BRIEN, S.J. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.65, p. 259-266, 1998.

CARTWRIGHT, E. J.; GORDON, M. T.; FREEMONT, A. J.; ANDERSON, D. C.; SHARPE, P. T. Paramyxovirus and Paget's Disease. **Journal of Medicine Virology**, v. 40, p.133-141, 1993.

CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 351-358, 1995.

CURRAN, M. D.; O'LOAN, D.; KENNEDY, S.; RIMA, B. K. Molecular characterization of phocine distemper virus: gene order and sequence of the gene encoding the attachment (H) protein. **Journal of General Virology**, v. 73, n. 5, p. 1189-1194, 1992.

DOMINGO, M.; VILAFRANCA, M.; VISA, J.; PRATS, N.; TRUGETT, A.; VISSER, I.; **Evidence for chonic morbillivirus infection in the Mediterranean dolphin (*Stenella coeruleoalba*)**. *Veterinary Microbiology*, n. 44, p. 229-239, 1995.

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

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

DUNKIN, G. W.; LAIDLAW, P.P. Sudies in Dog Distemper I. Dog Distemper in the Ferret. **Journal of Comparative Pathology Therapie**, n. 39, v. a, p. 201-212, 1926.

DUNKIN, G. W.; LAIDLAW, P.P. Sudies in Dog Distemper II. Dog Distemper in the dog. **Journal of Comparative Pathology Therapie**, n. 39, v. b, p. 213-221, 1926.

FANKHAUSER, R. Hundestaube – Geschichte einer Krankheit. Schweizer **Archiv für Tierheilkunde**, n. 124, v. 01, p. 245-256, 1982.

FEITOSA, M. M.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, F. L. F. Alterações do Líquor de cães com encefalite por cinomose e suas correlações com as alterações do sistema nervoso central. **ARS Veterinária**, v. 1, n. 13, p. 6-16, 1997.

FENNER, F.; GIBBS, E. P.; MURPHY, F. A.; ROTT, R.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. **Veterinary Virology**. Londres: Academic Press, v. 2, p. 471-485, 1993.

FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.

GATHUMBI, P.K. the retrospective use of a peroxidase technique for confirmation of suspected canine distemper in Kenya. **Veterinary Research Communications**, v.17, n.3, p.197-201, 1993.

GEBARA, C. M. S. Achados clínicos e histopatológicos em cães com diagnóstico molecular do CDV. **Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Centro de Ciências Agrárias – Universidade Estadual de Londrina**, 2002.

GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L; Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e por distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.4, p. 539-545, 1987.

GREENE, G.E.; APPEL, M. J. Canine distemper. *In* : GREENE, G.E. **Infectious Diseases of the dog and the Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders, p. 9-22. 1998.

GRÖNE, A.; FRISK, A.L.; BAUMGÄRTNER, W. Cytokine mRNA expression in whole blood samples from dogs with natural canine distemper virus infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, p.11-27, 1998.

GORDON, M. T.; BELL, S. C.; MEE, A. P.; MERCER, S.; CARTER, S. D.; SHARPE, P. T. Prevalence of Canine Distemper Antibodies in the Pagetic Population. **Journal of Medicine Virology**, v. 40, p. 313-317, 1993.

HAAS, L.; SUBBARAO, S.M.; HARDER, T.; LIESS, B.; BARRET, T. Detection of phocid distemper virus RNA in seal tissues using slot hybridization and the polymerase chain reaction amplification assay; genetic evidence that the virus is distinct from canine distemper virus. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 825-832, 1991.

HAAS, L; BARRET, T. Rinderpest and other animal morbillivirus infections: comparative aspects and recent developments. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 147-152, 1996.

HAAS, L; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAIEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D.; BARRET, T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v. 48, p. 165-171, 1997.

HARDER, T.C.; KENTER, M.; VOS, H.; SIEBELINK, K.; HUISMAN, W.; VAN AMEROGUEN, G.; ÖRVELL, C.; BARRETT, T.; APPEL, M. J. G.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 397-405, 1996.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n. 2. 2000.

HIGGINS, R. J.; KRAKOWKA, S. G.; METZLER, A.; KOETSLER, A. Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. **Acta Neuropatologica**, v. 58, n. 1, p. 1-8.

HIRAYAGA, N.; SENDA, M.; KURATA, K.; YOSHIKAWA, Y.; YAMANOUCHI, K. Requirement of Methionine for the Replication of Canine Distemper Virus in Vero Cells. **Journal of General Virology**, v. 66, p. 149-157, 1985.

HOERLEIN, B. F.; VANDEVELDE, M. Primary Disorders of Central Nervous System: in HOERLEIN, B. F. **Canine Neurology**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 321-380, 1978.

HU, A.; NORRBY, E. Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 2173-2181.

IWATSUKI, K.; OKITA, M.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; SHIN, Y. S.; MIYASHITA, N.; MIKAMI, T.; KAI, C. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 2, p. 185-190, 1995.

JACOBY, R.O. Development of immunity in fetal dogs: humoral responses. **American Journal Veterinary Research**, v. 30, n. 9, p. 1503-1510, 1969.

JOHNSON, G.C.; KRAKOWKA, S.; AXTHELM, M.K. Prolonged viral antigen retention in the brain of a gnotobiotic dog experimentally infected with canine distemper virus. **Veterinary Pathology**, v. 24, n.1, p. 87-89, 1987.

KAI, C.; OCHIKUBO, F.; OKIDA, M.; IINUDA, T.; MIKAMI, T.; KONUBE, F.; YAMANOUCHI, K. Use of B95a Cells for Isolation of Canine Distemper Virus from Clinical Cases. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 55, n. 6, p. 1060-1070, 1993.

KOLAKOFSKY, D.; PELET, T.; GARCIN, D.; HAUSMANN, S.; CYRRAN, J.; ROUX, L.; Paramyxovirus RNA synthesis and the requirement for hexamer genome length: the rule of six revisited. **Journal of Virology**, v. 72, p. 891-899, 1998.

KRAKOWKA, S.; MCCULLOUGH, B.; KOESTNER, A.; OLSEN, R. Myelin-specific autoantibodies associated with central nervous system demyelination in canine distemper virus infection. **Infection Immunity**, v.8, p. 819-827, 1973.

KRAKOWKA, S.; COCKERELL, G.; KOESTNER, A. Effects of canine distemper virus infection on lymphoid function in vitro and in vivo. **Infection Immunity**, v.11, n.5, p.1069-1078, 1975a.

KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.; CONFER, A.; KOESTNER, A.; MCCULLOUGH, B. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **Journal Infectious Diseases**, v.132, n.4, p. 384-392, 1975b.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.284-292, 1980.

KRAKOWKA, S.; AXTHELM, M.K.; JOHNSON, G.C. Canine distemper virus. In: R. C. Olson, S. Krakowka and J. R. Blakeslee (Eds), **Comparative Pathobiology of viral diseases**. Boca Raton: CRC Press, v. 2, p. 138-164, 1985.

KRAKOWKA, S.; CORK, L.C.; WINKELSTEIN, J.A.; AXTHELM, M.K. Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 17, n. 1-4, p. 471-482, 1987.

LAMB, R. A.; KOLAKOFSKY, D. Paranyxoviridae: The Viruses and Their Repliation, in FILDS, B. N., KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M. **Filds Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 41, 4^a ed, Multimidia CD-ROM. 2001.

GREENE, G.E.; APPEL, M. J. –Canine distemper in GREENE, G.E. **Infectious Diseases of the dog and the Cat**, Philadelphia: W.B.Saunders, p. 9-22, 1998.

LÖFFLER, S.; LOTTSPEICH, F.; LANZA, F.; AZORSA, D. O.; MEULEN, V. T.; SCHAULIES, J. S. –CD9, a Tetraspan Transmembrane Protein, Renders Cells Susceptible to Canine Distemper Virus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 42-49, 1997.

MAMAEV, L. V.; DENIKINA, N. N.; BELIKOV, S. I.; VOLCHKOV, V. E.; VISSER, I.; FLEMMING, K. G.; KAI, C.; HARDER, T. C.; LIESS, B.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; BARRET, T. Characterization of morbiliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca siberica*). **Veterinary Microbiology**, v. 40, p. 251-259, 1995.

MCDONALD, L.J. Factors that can determine the success of routine vaccination protocols. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 2, p. 223-230, 1992.

MORREL, V. Serengeti's big cats going to the dogs. **Science**, v. 264, p. 1664, 1994.

MORITZ, A.; FRISK, A.L.; BAUMGÄRTNER, W. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v.10, n.1, p.37-45, 2000.

MOSHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, S.; ISHIGURO, S. Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2936-2942, 1999.

NORRBY, E. SHESHBERADAN, H.; MCCULLOUGH, K. C.; CARPENTER, W. C.; ORVELL, C. Is rinderpest virus the archevirus of the Morbilivirus Genus? **Intervirolgy**, v. 23, p. 228-239, 1985.

ÖRVELL, C.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2085-2092, 1990.

OTT, R.L. Introduction to the symposium of canine distemper immunization. **Jornal American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 5, p. 607-609, 1966.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy – 1999. The Universal System of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses 1998 (Suplem. 2). **Archives of Virology**, v. 144, p. 421-429, 1999.

ROELKE-PARKER, M. E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIAN, S. J.; POSPISCHIL, A. HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H.; MWAMENGELE, G. L. M.; MGASA, M. N.; MACHANGE, G. A.; SUMMERS, B. A.; APPEL, M. J. G. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v. 379, p. 441-445, 1996.

ROZENBLATT, S.; EIZENBERG, O.; ENGLUND, G.; BELLINI, W. J. Sequence Homology Within the Morbilliviruses. **Journal of Virology**, v. 53, n. 2, p. 684-690, 1985.

RUDE, T.A. Canine Distemper Virus: Infection and Prevention. **Canine Practice**, v.14, n. 3, p. 16-24, 1987.

SAITO, T.B. **Padronização da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para o diagnóstico ante e post mortem do vírus da cinomose canina.** Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, 2001.

SHELL, L.G. Canine distemper. **The Compendium of Small Animal Practicing**, v. 12, n. 2, p. 173-179, 1990.

SHESHBEDARAN, H.; NORRBY, E.; MCCULLOUGH, K. C.; CARPENTER, W. C.; ORWELL, C. The antigenic relationship between measles, canine distemper and rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, v. 67, n. 7, p. 1381-1392, 1986.

SHIDHU, M. S.; CHAN, J.; KAELIN, K.; SPIELHOFER, P.; RADECKE, F.; SHNEIDER, H.; MASUREKAR, M.; DOWLING, P. C.; BILLETER, M. A.; UDEM, S. A. Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct

efficient expression and propagation of a reporter gene. **Virology**, v. 208, p. 800-807, 1995.

SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 3, p. 439-445, 1995.

STETTLER, M.; BECK, K.; WAGNER, A.; VANDEVELDE, M.; ZUBRIGGEN, A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 57, p. 83-93, 1997.

SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J.G. Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with distemper virus. **The Lancet**, p.187-189, 1978.

TAMIN, A.; ROTA, P. A.; WANG, Z.; HEATH, J. L.; ANDERSON, L. J.; BELLINI, W. J. Antigenic Analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. **Journal of Infectious Disease**, v. 170, p. 795-801, 1994.

THOMAS, W. B. Inflammatory Diseases of the Central Nervous System in Dogs. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 3, p. 167-178, 1998.

TIPOLD, A. Diagnosis of Inflammatory and infectious Diseases of the Central Nervous System in Dogs: A Retrospective Study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 304-314, 1995.

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

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 271-280, 1995.

VAN MOLL, P.; ALLDINGER, S.; BAUGÄRTNER, W.; ADAMIE, M. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 193-199, 1995.

VON MESSLING, V.; HARDER, T. C.; MOENNING, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I.; HAAS, L. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 1049-1056, 1999.

WELTER, J.; TAYLOR, J.; TARTAGLIA, J.; PAOLETTI, E.; STEPHENSEN, C.B. Mucosal vaccination with recombinant poxvirus vaccines protects ferrets against symptomatic CDV infection. **Vaccine**, v.17, p. 308-318, 1999.

WILD, T. F.; NANICHE, D.; RABOURDIN-COMBE, C.; GERLIER, D.; MALVOISIN, E.; LECOUTURIER, V.; BUCKLAND, R.; Mode of entry of morbillivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 267-270, 1995.

WRIGHT, N. G.; CORNWELL, J. C.; TOMPSON, H.; LAUDER, I. M. Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. **Veterinary Research**, v. 94, p. 86-92, 1974.

YOSHIDA, E.; IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; GENNA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 237-244, 1998.

YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, Y.; SUGIYAMA, M.; YAMANOUCHI, K. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Veterinary Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 193-205, 1989.

ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H.U. WAGNER, A.; VANDEVELDE, M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. **Journal of Virology**, n. 69, p. 1678-1686, 1995.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar parcialmente o gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina detectado em cães naturalmente infectados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a técnica de rt-pcr para a detecção do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina.
- Avaliar o perfil de restrição do produto do gene da hemaglutinina amplificado pela técnica de rt-pcr com as enzimas hinf i e rsa i em estirpes padrão disponíveis do cdv e de amostras identificadas em cães com direntes sinais clínicos da cinomose canina .
- Comparar dois tipos de amostras biológicas (urina e leucócitos) para o diagnóstico do cdv para a rt-pcr

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA DETECTADO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS (PAPER)

3.2 AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA URINA E DE LEUCÓCITOS COMO AMOSTRA BIOLÓGICA PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA, PELA RT-PCR (SHORT COMMUNICATION)

AVALIAÇÃO MOLECULAR PARCIAL DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA DETECTADO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

Resumo: As enzimas *Hinf* I e *Rsa* I foram selecionadas para o uso na técnica de polimorfismo no tamanho dos fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism–RFLP–) para determinar o perfil de restrição do vírus da cinomose canina (*canine distemper virus –cdv–*) circulante na região norte do Paraná/Brasil. Um fragmento do gene da Hemaglutinina com 721 pares de base (bp) foi amplificado pela técnica da RT-PCR em amostras biológicas colhidas de 27 cães naturalmente infectados pelo CDV e de três estirpes padrão: Snyder Hill, Onderstepoort e Rockborn. Em todos os amplificadas das amostras de campo, independentemente dos sinais clínicos, o perfil de restrição foi o mesmo. Todos os produtos do PCR geraram, com a enzima *Hinf* I, dois fragmentos visualizados com 320 pb e 250 pb. Em todas as amostras de campo a enzima *Rsa* I produziu dois fragmentos de 360 pb e 230 pb. O perfil de restrição das estirpes Rockborn e Snyder Hill foi o mesmo com dois fragmentos de 363 e 358 pb. Confirmando a análise computacional nas seqüências disponíveis no GenBank. A estirpe Rockborn não apresenta a seqüência do gene H depositada em banco de dados públicos. Os produtos da RT-PCR e da RFLP foram detectados por eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e os fragmentos com 77, 69 e 5 pb (*Hinf* I) e 31 pb (*Rsa* I), deduzido por meio de análises computacionais não puderam ser vistos. Esse método pode ser útil para o diagnóstico *ante* e *post mortem* da cinomose canina, pois pode ser aplicado em urina, sangue (*pool* de granulócitos e linfócitos), líquor e fragmento de órgãos (cérebro, cerebelo e medula espinhal). As relações moleculares demonstradas na análise por RFLP sugeriram que as amostras do CDV circulantes no norte do Paraná, são distintas das estirpes padrão do CDV, o que pode caracterizar diferenças moleculares.

Palavras- chave: Cinomose canina. Gene H. Enzimas de restrição.RFLP.

MOLECULAR PARTIAL EVALUATION OF CANINE DISTEMPER VIRUS HEMAGGLUTININ GENE DETECTED IN DOGS WITH NATURAL INFECTION

Abstract: The enzymes *Hinf* I and *Rsa* I were elected to use in the Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Assay to determine the pattern of wild-type canine distemper virus (CDV) in North of Paraná/Brazil. The CDV 721 base pair (bp) fragment of haemagglutinin gene was amplified using RT-PCR in biological sample from 27 dogs with natural canine distemper infection, and in three laboratory CDV strains: Snyder Hill, Onderstepoort and Rockborn. All PCR products of wild-type CDV amplified have the same RFLP pattern from both enzymes. Every PCR product after digestion with *Hinf* I were cut in two seeing fragment of 320 and 250 bp. Using the enzyme *Rsa* I, two fragment around 360 and 230 bp were seen in the wild-type CDV PCR products. In the Onderstepoort with *Rsa* I were seen two fragment with 363 and 327 bp and in both Snyder Hill and Rockborn fragments with 363 and 358 bp. The Rockborn strain don't have the genome in public database, but the computational analysis using public nucleotide sequence database in this study showed the same RFLP pattern for Onderstepoort and Snyder Hill. The PCR and RFLP products were detected by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide staining and the little fragments with 77, 69 and 5 bp (*Hinf* I), and 31 bp (*Rsa* I) assessed in computational analysis weren't be seen. This method could be useful to *ante* and *post mortem* canine distemper diagnosis, because can be applied in urine, blood (pool of granulocytes and lymphocytes) cerebrospinal fluid and organs fragments (brain, cerebellum and spinal cord). The molecular relationships showed in RFLP analysis suggested that wild-type current in North Paraná are different from laboratory CDV strains, and this RFLP pattern could characterize molecular distinction.

Keywords: Canine distemper. H gene. Restriction enzymes. RFLP.

INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (*Canine Distemper Virus –CDV–*), classificado na família Paramyxoviridae, gênero Morbillivirus (PRINGLE, 1999), é o agente etiológico da cinomose que é considerada uma das principais infecções virais em cães e outros carnívoros (APPEL; SUMMERS, 1999). A cinomose é uma doença multissistêmica, de evolução aguda, sub-aguda ou crônica, que além dos sinais clínicos sistêmicos pode também evoluir para graves sinais neurológicos. Em cães a infecção é altamente contagiosa e ocasiona altas taxas de letalidade (TIPOLD, 1995).

A cinomose é de ocorrência mundial (APPEL *et al.*, 1994), entretanto, em vários países devido à vacinação regular de grande parte da população canina a frequência da doença clínica tem diminuído substancialmente, sendo relatados apenas focos esporádicos (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; MORREL, 1994; HAAS *et al.*, 1997; MOSHIZUKI *et al.*, 1999). No Brasil a cinomose ainda é endêmica podendo representar até 6% de todas as ocorrências clínicas e até 11% das mortes em cães (GOUVEIA *et al.*, 1987; HEADLEY; GRAÇA, 2000).

O CDV é um vírus com genoma RNA fita simples de polaridade negativa, constituído por seis genes que codificam (3'–5') as proteínas N (nucloproteína), P (fosfoproteína), M (proteína matriz), F (proteína de fusão), H (hemaglutinina) e L (grande proteína) (DIALLO, 1990). Análises moleculares têm demonstrado grande similaridade entre as estirpes avaliadas (BOLT *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1997). Estudos realizados com anticorpos policlonais revelaram, até o momento, apenas um sorotipo viral (CHAPUIS, 1995).

A principal glicoproteína do envelope do CDV, a proteína H, é a mais variável e conseqüentemente, é proposta para monitorar mudanças genéticas no vírus (ÖRVELL *et al.*, 1990). Análises filogenéticas realizadas no gene H demonstraram diferenças genéticas relacionadas com a origem geográfica das amostras do CDV (HARDER *et al.*, 1996) e de outros paramixovírus relacionados, como o vírus da peste bovina (RPV) (CHAMBERLAIN *et al.*, 1993) e o vírus do sarampo (MS) (RIMA *et al.*, 1995).

A adaptação viral a uma nova espécie hospedeira, provavelmente envolve a habilidade do vírus em reconhecer e usar diferentes receptores celulares para a ligação e a entrada na célula hospedeira. Análises comparativas da evolução de estirpes do CDV, MS e RPV determinaram que a glicoproteína H é a menos conservada, com somente 34% de homologia entre o MS e o CDV (WILD *et al.*, 1995). O isolamento viral e a manutenção *in vitro* por sucessivas passagens do vírus em células de linhagem contínua, podem levar a mutações pontuais (*antigenic drift*) adaptativas o que pode dificultar a análise da seqüência amplificada (MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

Estudos envolvendo baterias de anticorpos monoclonais realizados com estirpes vacinais do CDV e estirpes isoladas de casos clínicos demonstraram grande variação antigênica na proteína H e maior estabilidade nas proteínas F e P (HANBURGER, *et al.*, 1991; BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993). A hemaglutinina é a proteína com maior variação antigênica entre todas as estirpes do CDV estudadas até o momento (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1992; BOLT *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1999; MOCHIZUKI *et al.*, 1999).

Relatos de falhas vacinais na profilaxia da cinomose canina são freqüentes (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; MORREL, 1994; HAAS *et al.*, 1997). Uma

gama de fatores, incluindo aqueles inerentes ao animal e ao antígeno, pode ser responsável pela ocorrência de cinomose em cães vacinados (HAAS *et al.*, 1997). As estirpes empregadas na grande maioria das vacinas atenuadas utilizadas em todo o mundo, inclusive no Brasil, surgiram no início de 1960 (CHAPPUIS, 1995). Os estudos com o objetivo de caracterização antigênica e molecular de amostras selvagens do CDV, bem como a comparação destas características com aquelas obtidas com as estirpes vacinais, ainda são realizados de forma esporádica em todo o mundo (MOSHIZUKI *et al.*, 1999; BOLT *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1997).

Como a análise do gene H do CDV possibilita a organização das estirpes virais em genótipos (BOLT *et al.*, 1997), o presente trabalho teve como objetivo a comparação entre estirpes do CDV padrão e do vírus selvagem circulante em animais com diferentes formas clínicas da doença, por meio do perfil de restrição de produtos da amplificação de um segmento de 721 pb do gene H de amostras de CDV provenientes de material biológico colhido de cães com diferentes sinais clínicos da infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus e Células

As estirpes Rockborn e Ondersteport do CDV foram amplificadas em células MDCK (*Madin and Darby canine kidney* –MDCK–) e a estirpe Snyder Hill amostra liofilizada, amostras provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram utilizadas como controle positivo.

Amostras vacinais do parvovírus canino, do coronavírus canino, do parainfluenzavírus canino, do adenovírus canino e do rabdovírus foram utilizados na avaliação da especificidade da RT-PCR.

Animais

Foram selecionados para esse estudo 32 cães provenientes do Norte do Paraná atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/Paraná, Brasil, no período de maio a novembro de 2003.

Foram incluídos no experimento os animais submetidos a RT-PCR para a detecção do gene da nucleoproteína (N) do CDV, 27 positivos com sinais clínicos sugestivos de cinomose canina e ou com parâmetros hematológicos e bioquímicos compatíveis com a infecção e cinco cães politraumatizados.

De acordo com os sinais clínicos apresentados os animais foram subdivididos em quatro grupos. No grupo A foram incluídos dez cães que apresentavam um ou mais sinais clínicos comuns à forma sistêmica da cinomose canina tais como hipertermia, diarreia, vômito, redução ou ausência de apetite, tenesmo, secreção nasal, tosse, dispnéia, apatia e ceratoconjuntivite seca. O grupo B foi constituído por oito animais com manifestação clínica de um ou mais sinais compatíveis com a forma neurológica da cinomose como convulsão, mioclonia, rigidez cervical, hiperestesia, tremores musculares, paresia, paralisia, ataxia, mudanças comportamentais, depressão e desorientação. No grupo C foram incluídos nove cães que apresentavam, simultaneamente os sinais clínicos encontrados nas formas sistêmica e neurológica da cinomose canina, descritos nos grupos anteriores. O grupo D foi constituído por cinco cães sem sinal clínico de infecção que foram encaminhados para eutanásia devido a politraumatismo. No Quadro 1 tem-se a distribuição dos

grupos de cães utilizados para a caracterização do gene da H do vírus da cinomose canina de acordo com a forma clínica da doença.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos de cães utilizados para a caracterização parcial do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina de acordo com a forma clínica da infecção, Londrina –PR, 2003.

Grupo	Forma clínica	Número de animais avaliados
A	Sistêmica	10
B	Neurológica	8
C	Sistêmica e Neurológica	9
D	Controle	5
Total		32

Amostras biológicas

Todas as amostras biológicas foram obtidas de forma indolor e respeitando-se as normas de bem-estar e conforto dos animais.

De todos os animais foram colhidos 2 mL de urina, por meio de cistocentese ou sondagem uretro-vesical, e 3 mL de sangue com anticoagulante por venopunção. Dos animais incluídos nos grupos B, C e D, sob anestesia geral, ainda foram colhidos 1 a 3 mL de líquido céfalo-raquidiano, por meio da punção do espaço subaracnóide através da cisterna magna. Nos animais dos grupos B, C e D, cujos proprietários optaram pela eutanásia, foram colhidos fragmentos de cérebro, cerebelo e medula espinhal durante a necropsia.

As amostras foram processadas imediatamente após a colheita ou estocadas no máximo por 48 h a -20°C. Alíquotas de 100 µL de sangue foram submetidas a centrifugação a 10.000 x g por 15 min em gradiente de Percoll (Sigma, EUA) na

densidade de 1,08 g/mL, para a obtenção de leucócitos, esses foram recolhidos e ressuspensos em 1 mL de PBS pH 7,2 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 15 mM K₂H₂PO₄). Após a centrifugação o sedimento foi ressuspense em 300 µL de PBS.

Os fragmentos de SNC foram triturados em “stomacher “ na proporção de 10% (peso/volume) em PBS, após centrifugados a 3.000 x g por 15 min o sobrenadante foi recolhido em frascos estéreis até o processamento .

Extração do Ácido Nucléico

Alíquotas de 300 µL do sobrenadante de uma das estirpes padrão como controle positivo, 300 µL de água ultra-pura autoclavada como controle negativo e 300 µl das amostras biológicas foram submetidas à extração de RNA pelo método da sílica / tiocianato de guanidina (BOMM *et al.*, 1990).

Oligonucleotídeos Iniciadores (*primers*)

Para a detecção do gene N foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*): CDV1 [769] (+) 5'ACAGGATTGCTGAGGACCTAT3', e CDV2 [1055] (-) 5'CAAGATAACCATGTACGGTGC3' (FRISK *et al.*,1999).

Para a amplificação do gene H do CDV, os *primers* NAW1 [7570] (+) 5'ATCGGCAGCAAAYCCTATC3', e NAW2 [8291] (-) 5'TGGCAACTGTCYTCCTCC3' foram desenhados com o auxílio do programa Gene Runner 3,05 (www.generunner.com), utilizando como base o genoma da estirpe Onderstepoort disponível sob o número AF378705 nas bases publicas de informação genômica

(GenBank). Para a escolha da região a ser amplificada utilizou-se as seqüências conhecidas do gene H dos *morbillivirus* de cães, carnívoros não-domésticos, roedores e mamíferos marinhos e os softwares ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) e o software BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)

Para a transcrição reversa (RT) utilizou-se 9 µL de RNA, 20 pmol do *primer* CDV1 (gene N) ou NAW 1(gene H). Após incubação a 70° C por 10 min, seguida de imersão em gelo, adicionou-se a solução RT-MIX constituída por 0,8 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 60 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®) e água ultrapura autoclavada para a obtenção do volume final de 20µL. A RT foi realizada a 42 °C por 30 min.

Para a PCR foram utilizados 5 µL do cDNA e PCR-MIX contendo 20 pmol de cada *primer* (CDV1 e CDV2 ou NAW1 e NAW2), 0,8 mM de dNTP (Invitrogen®), 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase Recombinante (Invitrogen®) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 50 µL .

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) programado com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 94°C/1 min, seguido, por 40 ciclos de 94 °C/1 min, 59°C/2 min (gene N) ou 54°C/1 min (gene H), 72°C/1 min e uma etapa de extensão final de 7 min a 72 °C.

Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP)

Com base na análise das seqüências do gene H das estirpes do CDV disponíveis no GenBank, realizadas com os softwares Gene Runner e ClustalW, foram escolhidas duas enzimas para a clivagem do produto amplificado pela RT-PCR. Na simulação computacional a enzima *Hinf* I apresenta sítios de restrição conservados em todas as estirpes do CDV seqüenciadas até o momento, gerando fragmentos com tamanho de 320, 250, 77, 69 e 5 (pb) e foi empregada para caracterizar a especificidade do produto amplificado.

Para a caracterização molecular parcial das estirpes de CDV provenientes de cães com diferentes formas clínicas da doença, foi selecionada a enzima *Rsa* I. No produto amplificado do gene H (721 pb) proveniente da estirpe Snyder Hill é encontrado um único sítio de clivagem gerando fragmentos de 358 e 363 pb. Na estirpe Onderstepoort do CDV são encontrados, nesse mesmo produto, dois sítios de restrição gerando fragmentos de 363, 327 e 31 pb.

Para a clivagem do produto de 721 pb, 1 µL de cada enzima (*Hinf* I, *Rsa* I - 10 unidades / µL, Invitrogen[®]), 2 µL de seu tampão (respectivamente, React I e React II) e 18 µL do produto amplificado foram encubados a 37°C, em frascos diferentes, conforme protocolo descrito pelo fabricante.

Análise do produto

Os produtos amplificados pela RT-PCR e os clivados pelas enzimas de restrição foram analisados em eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,4 (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM), corado em solução contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. As imagens foram capturadas em sistema digital Kodak (Taiwin 32 - Kodak[®]) e armazenadas digitalmente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A RT-PCR para a amplificação parcial do gene H do CDV apresentou resultado positivo em todos os 27 cães incluídos nesse estudo. Independentemente da forma da infecção, sistêmica, neurológica ou a associação de ambas, em pelo menos uma amostra biológica de cada animal foi amplificado o produto com 721 pb.

Nenhum dos materiais utilizados como controle negativo da reação (água ultrapura autoclavada, amostras vacinais de vírus caninos, urina e leucócitos de cães controle) foram positivos na técnica de RT-PCR demonstrando a especificidade da técnica (Fig.1).

Embora, o objetivo principal da RT-PCR com *primers* específicos para o gene H não fosse o de diagnóstico do CDV, esses resultados demonstram a especificidade dos *primers* desenvolvidos e da técnica padronizada. Apesar do gene N ser mais estável que o gene H, os primers NAW1 e NAW2 foram desenhados para hibridizarem em regiões constantes presentes em todas as estirpes do CDV com seqüências disponíveis no GenBank. A confirmação do resultado positivo em 100% dos animais avaliados demonstra que a RT-PCR desenvolvida nesse estudo pode também ser utilizada como uma ferramenta adicional para o diagnóstico da cinomose canina, podendo ser realizada a partir de diferentes amostras clínicas tais como, urina, líquido, leucócitos e fragmentos de órgãos.

O CDV apresenta como característica molecular a grande similaridade, observada em reações de seqüenciamento, entre as várias estirpes isoladas de animais com diferentes manifestações clínicas, de espécies animais e de regiões geográficas. Entre os seis genes do CDV, o quinto gene (3'-5') codifica a proteína hemaglutinina, localizada no envelope viral e indutora de anticorpos neutralizantes.

A análise filogenética do gene H do CDV tem possibilitado a organização das estirpes virais em grupos, independentemente da espécie animal no qual foi isolado e com nítida distribuição geográfica. Por todos estes fatores, o gene H é o mais indicado para o monitoramento de variações moleculares no CDV (BOLT *et al.*, 1997; MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

A região do gene H amplificada pelos primers NAW1 e NAW2, em análise computacional, apresenta homologia média de 97% entre as estirpes do CDV com seqüências disponíveis no GenBank. As estirpes selvagens comparadas a estirpe Onderstepoort apresentam homologia de 91% e com a estirpe Snyder Hill de 94%.

As estirpes Onderstepoort e Rockborn são as mais utilizadas em todo o mundo para a elaboração de vacinas (BOLT *et al.*, 1997; MOCHIZUKI *et al.*, 1999). A estirpe Snyder Hill, por apresentar grande potencial neurotrópico, é a mais utilizada em experimentos de inoculação experimental tanto em estudos de patogênese viral quanto de desafio pós-vacinal (SLATER, 1970). Porém, seqüências para o gene H da estirpe Rockborn ainda não são disponíveis no GenBank.

A enzima *Hinf* I clivou todos os produtos amplificados do gene H nos mesmos pontos. Tanto as estirpes padrão (Rockborn, Snider Hill e Onderstepoort) quanto todas as 27 amostras selvagens analisadas apresentaram com essa enzima o mesmo perfil de restrição que possibilitou a visualização de fragmentos de aproximadamente 320 e 250 pb. Devido às características de porosidade do gel de agarose os fragmentos de pequeno tamanho molecular com 77, 69 e 5 pb não puderam ser visualizados. Devido à conservação de sítios de clivagem para a enzima *Hinf* I dentro dos genogrupos, observada em todas as amostras seqüenciadas até o momento, essa enzima foi escolhida para a análise da especificidade do produto

amplificado. Esse resultado, onde todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de restrição, ratifica que o produto amplificado é específico do CDV.

A clivagem dos produtos da RT-PCR do gene H da estirpe Onderstepoort com a enzima *Rsa I* produziu o perfil esperado com dois fragmentos de aproximadamente 327 e 358 pb. Não foi possível a visualização do fragmento de 31 pb. A estirpe Snyder Hill clivada com a enzima *Rsa I*, também, produziu o perfil esperado com fragmentos de 358 e 363 pb. Entretanto, devido à pequena diferença no tamanho molecular (5 pb) os fragmentos co-migram.

A estirpe Rockborn, que não tem seqüência genômica disponível para o gene H, ao ser clivada com a enzima *Rsa I* gerou o mesmo perfil da estirpe Snyder Hill. A seqüência do gene H da estirpe Snyder Hill possui alto grau de homologia com as estirpes vacinais, provavelmente devido ao fato de terem sido isoladas no mesmo período de tempo (HAAS, 1997).

O perfil de restrição do fragmento de 721 pb de todas das 27 amostras de campo do CDV, foi semelhante entre si porém, diferente do observado nas estirpes padrão. A clivagem dos produtos da RT-PCR das amostras de campo com a enzima *Rsa I* geraram dois fragmentos de 360 e 230 pb que foram facilmente visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio. Os outros fragmentos, provavelmente, de pequeno tamanho molecular não foram visualizados.

O perfil de restrição, gerado pelas enzimas *Hinf I* e *Rsa I*, foi obtido a partir do produto amplificado pela RT-PCR que foi realizada em amostras biológicas (urina, líquido, leucócitos e fragmentos do SNC) colhidas em cães com sinais clínicos sugestivos de cinomose. A realização da técnica diretamente a partir do material biológico diminui a possibilidade de mutações de ponto que são muito comuns,

particularmente em vírus com genoma RNA, durante o isolamento viral *in vitro*, devido à adaptação do vírus à célula hospedeira (BOLT et al., 1997).

Os resultados indicam que as amostras de campo, independentemente dos sinais clínicos apresentados pelos cães nos quais elas foram identificadas, possuíam sítios de restrição nas mesmas posições. Também evidencia-se que existem diferenças no gene H entre as estirpes que estão circulando e determinando doença clínica em cães de nossa região, com aquelas estirpes que são largamente utilizadas para a produção de vacinas, para o controle e profilaxia da cinomose canina particularmente as estirpes Onderstepoort e Rockborn.

A demonstração de que todas as 27 amostras de campo do CDV apresentaram perfil de restrição (*Rsa* I) diferente das estirpes vacinais, descarta a possibilidade de que qualquer uma das amostras amplificadas pudesse ter origem vacinal. Paralelamente, em caso de doença clínica após vacinação, a análise do segmento de 721 pb do gene H do CDV clivado com a enzima *Rsa* I, no caso de perfil diferente do esperado para as amostras vacinais descarta a reversão de virulência do vírus vacinal.

Estudos complementares fazem-se necessários para avaliar se as diferenças no gene H do CDV identificadas na análise comparativa entre estirpes padrão e de campo, circulantes na região Norte do Paraná/Sul do Brasil, são suficientes para interferir no processo de imunização dos cães contra a cinomose canina. Divergência no perfil de restrição de um produto amplificado sugere diferenças na seqüência de nucleotídeos entre as estirpes de campo e as vacinais. Porém, ainda não se pode afirmar que essas diferenças possam envolver também diferenças em aminoácidos da proteína H e, conseqüentemente, alteração na estrutura antigênica da proteína.

Em todo o Brasil é freqüente o relato de clínicos veterinários de que cães com esquema regular de vacinação, particularmente aqueles com ainda uma, duas ou até mesmo três doses de vacina, desenvolvem quadros clínicos de cinomose. Falhas vacinais podem ser geradas por múltiplos fatores como interferência de anticorpos passivos, falhas individuais na resposta imune, qualidade, conservação e variabilidade antigênica do imunógeno e infecção anterior à vacinação, entre outros.

A probabilidade de mutações do tipo adição, deleção e substituição de nucleotídeos em vírus como genoma constituído por RNA é bem maior que em vírus DNA (DIALLO, 1990). O genoma do CDV é composto por uma molécula de RNA fita simples com polaridade negativa com aproximadamente 16.000 nucleotídeos. Apenas um sorotipo do CDV é descrito (DIALLO, 1990; PRINGLE, 1999), entretanto, são conhecidas diferenças biológicas entre as estirpes. Há variações nas formas de manifestação clínica da doença, bem como também são passíveis de infecção uma gama de hospedeiros tais como cães, roedores, carnívoros selvagens e mamíferos aquáticos (APPEL & SUMMERS, 1999). Essas diferenças biológicas entre as estirpes do CDV sugerem também a circulação de estirpes virais com diferenças moleculares e/ou antigênicas que em algumas circunstâncias, podem interferir tanto no diagnóstico quanto na imunoprofilaxia da infecção (BOLT *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1999; MOSHIZUKI *et al.*, 1999).

O monitoramento das características antigênicas e moleculares de estirpes circulantes do CDV é fundamental para o sucesso no controle da infecção. O gene H, por suas características, é o mais indicado para essa análise e a obtenção direta do material biológico diminui a possibilidade de mutações de ponto na seqüência de aminoácidos que ocorrem, com maior freqüência, durante o isolamento *in vitro*, devido à adaptação do vírus à célula hospedeira (BOLT *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que existem diferenças moleculares entre as estirpes vacinais do CDV e aquelas presentes na região de Londrina/PR. O grau de interferência dessas diferenças nas características antigênicas das estirpes virais que ocasionam a cinomose canina em nossa região precisa ser avaliado. Esses resultados abrem a perspectiva da elaboração de análises moleculares comparativas mais complexas, particularmente com relação ao seqüenciamento de todo o gene H de diferentes estirpes do CDV.

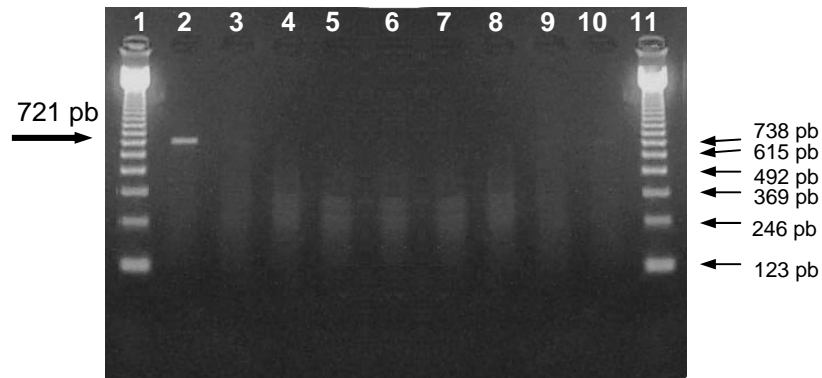


Figura 1. Resultado da RT-PCR com os *primers* NAW1 e NAW2, frente a outros vírus de importância para a espécie canina; ao vírus padrão Rockborn e urina e leucócito de cães controle.

- Canaletas 1 e 11:** Padrão de tamanho molecular 123bp (Invitrogen®)
Canaleta 2: Controle positivo da reação (estirpe Rockborn)
Canaleta 3: PCR da estirpe Rockborn sem etapa de transcrição reversa
Canaleta 4: Adenovírus canino
Canaleta 5: Parvovírus canino
Canaleta 6: Coronavírus canino
Canaleta 7: Parainfluenzavírus canino
Canaleta 8: Urina de cão assintomático (saudável)
Canaleta 9: Leucócito cão assintomático
Canaleta 10: Controle negativo da extração (água ultrapura)

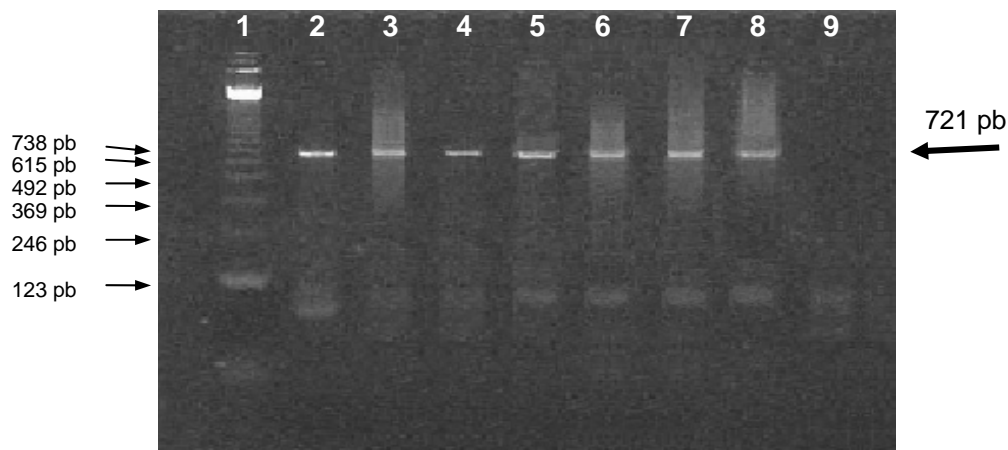


Figura 2. Identificação do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina, frente as diferentes amostras biológicas.

- Canaleta 1:** Padrão de tamanho molecular 123bp (Invitrogen®)
Canaleta 2: Urina cão 16
Canaleta 3: Leucócito cão 16
Canaleta 4: Líquor cão 16
Canaleta 5: Fragmento de bexiga cão 16
Canaleta 6: Fragmento de cérebro cão 16
Canaleta 7: Fragmento de cerebelo cão 16
Canaleta 8: Fragmento de pulmão cão 16
Canaleta 9: Controle negativo da extração (água ultrapura)

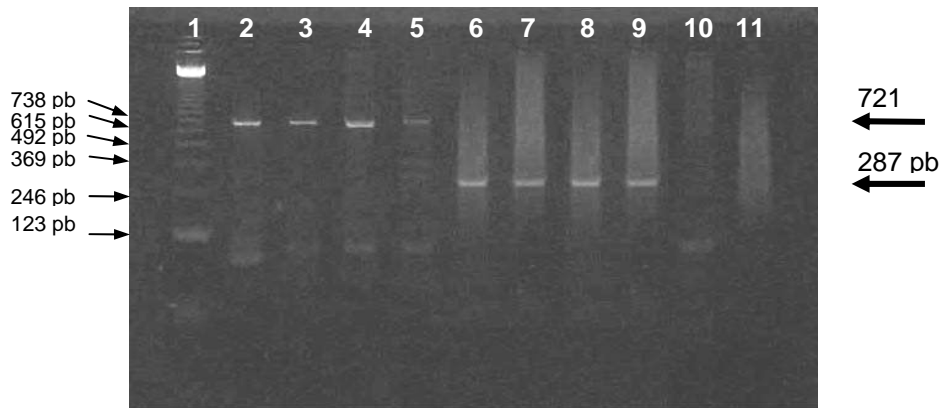


Figura 3. Resultado da técnica de RT-PCR utilizando os *primers* NAW1/NAW2 e CDV1/CDV2, frente a urina e leucócito como amostras biológicas,

Canaleta	1:	Padrão de tamanho molecular 123bp (Invitrogen®)
Canaleta	2:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 33
Canaleta	3:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 33
Canaleta	4:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 35
Canaleta	5:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 35
Canaleta	6:	RT-PCR para o gene N em urina, amostra cão 33
Canaleta	7:	RT-PCR para o gene N em leucócito, amostra cão 33
Canaleta	8:	RT-PCR para o gene N em urina, amostra cão 35
Canaleta	9:	RT-PCR para o gene N em leucócito, amostra cão 35
Canaleta	10:	Controle negativo da extração gene H (água ultrapura)
Canaleta	11:	Controle negativo da extração gene N (água ultrapura)

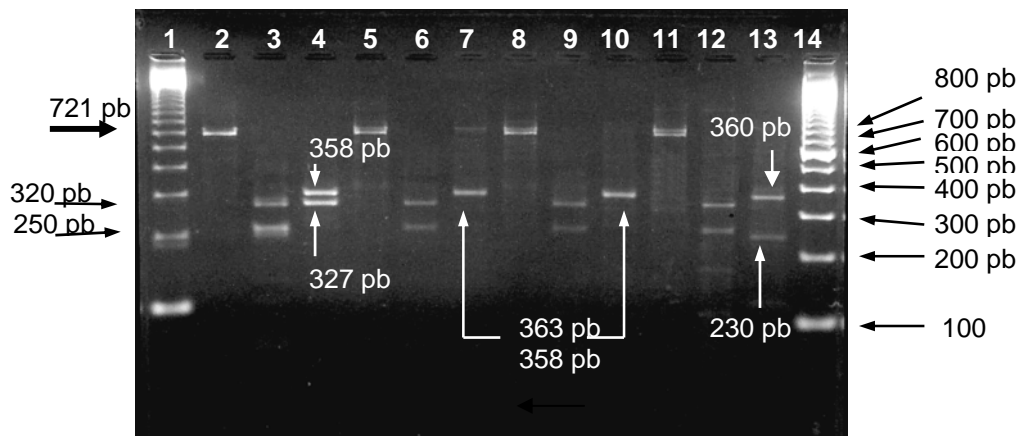


Figura 4. Perfil de restrição de produtos de RT-PCR do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina utilizando a enzima *Hinf* I e a enzima *Rsa* I.

Canaleta	1:	Padrão de tamanho molecular 123 bp (Invitrogen®)
Canaleta	2:	RT-PCR estirpe Onderstepoort (721 pb)
Canaleta	3:	RFLP estirpe Onderstepoort enzima <i>Hinf</i> I (320 e 250 pb)
Canaleta	4:	RFLP estirpe Onderstepoort enzima <i>Rsa</i> I (327 e 358 pb)
Canaleta	5:	RT-PCR estirpe Rockborn (721 pb)
Canaleta	6:	RFLP estirpe Rockborn enzima <i>Hinf</i> I (320 e 250 pb)
Canaleta	7:	RFLP estirpe Rockborn enzima <i>Rsa</i> I (363 e 358 pb)
Canaleta	8:	RT-PCR estirpe Snyder Hill (721 pb)
Canaleta	9:	RFLP estirpe Snyder Hill enzima <i>Hinf</i> I (320 e 250 pb)
Canaleta	10:	RFLP estirpe Snyder Hill enzima <i>Rsa</i> I (363 e 358 pb)
Canaleta	11:	RT-PCR amostra selvagem (721 pb)
Canaleta	12:	RFLP amostra selvagem enzima <i>Hinf</i> I (320 e 250 pb)
Canaleta	13:	RFLP amostra selvagem enzima <i>Rsa</i> I (360 e 230 pb)
Canaleta	14:	Padrão de tamanho molecular 100 bp (Invitrogen®)

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F., GISH W., MILLER W., MYERS EW., LIPMAN DJ. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal Veterinary Research**, v.30. p.1167-1182. 1969.
- APPEL, M. J. G.; YATES, R. A.; FOLEY, G. L.; BERNSTEIN, J. J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILLER, L. D.; ARP, L. H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B. A. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 277-288, 1994.
- APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status [on line], 1999. Disponível em <www.ivis.org> Acesso em 13 de julho de 2003.
- BLIXENKRONE-MØLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.J.G. Studies on manifestation of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.163-173, 1993.
- BOLT, G.; JENSEN, T.D.; GOTTSCHALK, E.; ARCTANDER, P.; APPEL, M.J.G.;BUCKLAND, R.; BLIXENKRONE-MOLLER. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. **Journal of General Virology**, v.78, n.2, p. 367-372, 1997.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, P.M.E.; WERTHEIN-van DILLEN; NOORDAA, J. Rapid an simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BUXTON, A.; FRASER, G. **Animal Microbiology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, v. 2, p. 533-548, 1977.
- CHAMBERLAIN, R. W.; WANWAYI, H.; HOCKLEY, E.; SUBBARAO, S. M.; GOATLEY, L.; KROWLES, N. J.; BARRETT. T. Evidence for different lineages of rinderpest virus reflecting their geographic isolation. **Journal of General Virology**. v. 72, p. 443-447, 1993.
- CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 351-358, 1995.
- DIALLO, A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. **Veterinary Microbiology**, v. 23, p. 155-163, 1990.
- DOMINGO, M.; VILAFRANCA, M.; VISA, J.; PRATS, N.; TRUGETT, A.; VISSER, I.; Evidence for chonicmorbillivirus infection in the Mediterranean dolphin (*Stenella coeruleoalba*). **Veterinary Microbiology**, n. 44, p. 229-239, 1995.
- FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.

GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L; Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e por distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n. 4, p. 539-545, 1987.

HAAS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, BARRETT, T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v. 48, p. 165-171, 1997.

HAAS, L.; LIERMANN, H.; HARDER, T. C.; BARRETT, T.; LÖCHELT, M.; VON MESSLING, V.; BAUMGÄRTNER, W.; GREISER-WILKE, I. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 15-18, 1999.

HAMBURGER, D.; GRIOT, C.; ZUBRIGGEN, A.; ORVELL, C.; VANDEVELDE, M. Loss of virulence of canine distemper virus is associated with a structural change recognized by a monoclonal antibody. **Experientia**, v. 47, n. 11, p. 842-845, 1991.

HARDER, T. C.; KLUSMEYER, K.; FREY, H. –R.; ÖRVELL, C.; LIESS, B. Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid morbilivírus isolates by kinetic neutralization using a novel immunoplaque assay. **Journal of Virological Methods**, v. 41, p. 77-92, 1996.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.2, 2000.

MORREL, V. Serengeti's big cats going to the dogs. **Science**, v. 264, p. 1664, 1994.

MOSHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, S.; ISHIGURO, S. Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2936-2942, 1999.

ÖRVELL, C.; BLIXENKRONE-MÖLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 2085-2092, 1990.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy – 1999. The Universal System of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses 1998 (Suplem. 2). **Archives of Virology**, v. 144, p. 421-429, 1999.

RIMA, B. K.; EARLE, J. A. P.; YEO, R. P.; HERLIHY, L.; BACZOKO, K.; TER MEULEN, V.; CARABANA, J. CABALLERO, M., CELMA, M. L.; FERNANDES-MUNOZ, R. Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1173-1180, 1995.

SLATER, E. A. The Response to Measles and Distemper Virus in Immuno-Suppressed and Normal Dogs. **Journal of American Veterinary Medicine Adviser**, v. 156, n. 12. p. 1762-1766, 1970.

TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 304-314, 1995.

WILD, T. F.; NANICHE, D.; RABOURDIN-COMBE, C.; GERLIER, D.; MALVOISIN, E.; LECOUTURIER, V.; BUCKLAND, R.; Mode of entry of morbillivirus. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 267-270, 1995.

AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA URINA E DE LEUCÓCITOS COMO AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA POR RT-PCR

Resumo: Urina e leucócitos foram comparados como amostras biológicas para o diagnóstico molecular do vírus da cinomose canina (CDV) por meio da reação em cadeia pela polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). Foram selecionados 56 cães com diagnóstico clínico de cinomose canina. De acordo com os sinais clínicos os animais foram distribuídos em três grupos. O grupo A foi constituído por 17 cães com sinais clínicos sistêmicos; o grupo B por 8 cães com sinais neurológicos e o grupo C por 31 cães que apresentavam simultaneamente sinais clínicos sistêmicos e neurológicos. Em 80,4 % (45/56) dos cães foi amplificado um fragmento de 721 pares de base do gene da hemaglutinina do CDV. Em 75,5% (34/45) animais o CDV foi detectado tanto na urina quanto em leucócitos. Em 24,4% (11/45) dos cães apenas um tipo de material biológico foi positivo (urina 1; leucócitos 10). Esses resultados demonstram que as diferentes formas de apresentação clínica da cinomose canina podem dificultar a eleição de apenas um tipo de amostra biológica para a realização do diagnóstico etiológico do CDV podendo, nessa situação, serem gerados resultados falso-negativos.

Palavras- chave: Cinomose canina. RT-PCR. Material biológico. Gene H.

**COMPARATIVE EVALUATION OF URINE AND LEUCOCYTES AS A
BIOLOGICAL SAMPLE FOR CANINE DISTEMPER DETECTION, USING THE
RT-PCR ASSAY**

Abstract: Urine and leucocytes were compared like biological sample to the canine distemper virus (CDV) molecular diagnosis by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Fifth-six dogs with clinical diagnostic were selected. In accordance with clinical signs the dogs were disposed in three groups. The A group was formatted by seventeen dogs with systemic disease; and the B group was formatted by eight with neurologic disease; and the C group formatted by thirty-one dogs with systemic and neurologic signs. In 80,4 per cent (45 of 56) of the dogs were amplified one fragment of CDV nucleoprotein gene with 721 base pare (bp). In 75,5 per cent (34 of 45) the CDV were detected such in urine as in leucocytes. In 24,4 per cent (11 of 45) of the dogs only one biological sample was positive (urine 1 dog; leucocytes 10 dogs). From these studies it can be concluded that great variation in then clinical disease make difficult to etiological diagnosis and this choice may be to generate false-negative results.

Keywords: Canine distemper. RT-PCR. Biological sample. H gene.

Comunicação

A cinomose canina é uma das mais importantes doenças infecciosas em cães de todo o mundo e pode ocorrer na forma epidêmica, nos países onde a vacinação da população canina é realizada de forma regular, e endêmica, onde esta prática de controle e profilaxia é esporádica (GOUVEIA *et al.*, 1987; HAAS *et al.*, 1997).

A cinomose é causada pelo vírus da cinomose canina (*canine distemper virus* –CDV–) que é membro da família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*. O CDV é um vírus envelopado com genoma constituído por RNA fita simples de polaridade negativa. Apenas um sorotipo do CDV foi descrito até o momento. Além dos cães, algumas espécies de carnívoros não-domésticos, roedores e de mamíferos marinhos são susceptíveis à infecção (APPEL; SUMMERS, 1995; PRINGLE, 1999).

Em cães a replicação do CDV resulta em doença multissistêmica aguda ou subaguda, altamente contagiosa, que caracteriza-se por secreção nasal e ocular serosa a mucopurulenta, apatia, anorexia, hipertermia, diarreia, vômito, tosse, dispnéia, desidratação e ceratoconjuntivite seca. Com frequência esses sinais sistêmicos são acompanhados por graves sinais neurológicos, como, mioclonia, convulsão, ataxia, paresia, paralisia e mudanças comportamentais, que podem ocorrer durante a fase aguda da doença ou várias semanas ou meses após (GRENNE; APPEL, 1998).

No Brasil a cinomose canina é endêmica e pode representar até 6% de todas as ocorrências atendidas na clínica (GOUVEIA *et al.*, 1987) e pode ainda ser responsável por até 11% das mortes em cães (HEADLEY; GRAÇA, 2000).

O CDV pode estar presente em alto título nas secreções e excreções, ou mesmo em diferentes órgãos ou tecidos. A excreção viral inicia-se aproximadamente

sete dias pós-infecção e, na dependência da forma de apresentação clínica, período de evolução, estirpe viral e da resposta imune do animal, pode persistir por até 60 a 90 dias, embora períodos mais curtos sejam mais freqüentes. Animais infectados, tanto na forma sintomática quanto assintomática, são importantes na cadeia epidemiológica da cinomose canina pois o vírus eliminado no ambiente é a principal fonte de contaminação dos animais susceptíveis (KRAKOWKA *et al.*, 1975; GREENE; APPEL, 1998).

A vacinação é a forma mais eficaz de controle e profilaxia da cinomose canina. O diagnóstico precoce da infecção é uma importante ferramenta no controle da doença pois pode minimizar a contaminação do ambiente e evitar a exposição de animais susceptíveis ao CDV (CHAPUIS, 1995; APPEL; SUMMERS, 1999; MORITZ *et al.*, 2000).

O diagnóstico clínico, realizado com base no exame físico, na anamnese e na realização de exames complementares, como o exame radiográfico, o hemograma e a análise bioquímica do soro e do líquido, em uma grande proporção dos casos, gera parâmetros inconclusivos pois o mesmo padrão, também, pode ser encontrado em outras doenças infecciosas e parasitárias de ocorrência comum em cães (APPEL; SUMMERS, 1999; MORITZ *et al.*, 2000).

Para a realização do diagnóstico *ante mortem* da cinomose canina vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos, destacando-se a pesquisa de corpúsculo de inclusão em células presentes em secreções e em neutrófilos circulantes, a imunofluorescência direta, a imunohistoquímica e o isolamento do CDV em cultivo celular. Porém, todos os métodos apresentam desvantagens, que podem inviabilizar o uso rotineiro, como baixa sensibilidade e/ou especificidade, etapas laboriosas de processamento do material biológico e tempo necessário para

a conclusão do resultado (BLIXENKRONE-MÖLLER *et al.*, 1993; FRISK *et al.*, 1999; APPEL; SUMMERS, 1999).

A transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) é uma técnica molecular que pode ser utilizada com o objetivo da identificação precoce do CDV em cães com sinais clínicos da infecção. Esse método de diagnóstico *ante mortem* tem apresentado boas taxas de sensibilidade e de especificidade. Entretanto, assim como outras técnicas a RT-PCR apresenta alguns fatores que podem ser limitantes, tais como: a definição da região alvo a ser amplificada, o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), o método de extração do ácido nucléico e a seleção do material biológico a ser utilizado para o diagnóstico (FRISK *et al.*, 1999; SAITO, 2001).

Na dependência exclusiva da forma de apresentação clínica e da evolução da cinomose canina o CDV pode estar presente em uma gama de amostras biológicas. Urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva, secreção respiratória, líquor podem apresentar o vírus em diferentes estádios da doença e em diferentes títulos (SAITO, 2001; FRISK *et al.*, 1999). A definição do melhor tipo de amostra biológica a ser enviada para a realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* é de fundamental importância para o sucesso da técnica.

O presente estudo foi delineado com o objetivo de avaliar, comparativamente, dois tipos de material biológico, urina e leucócitos, para a detecção do CDV pela técnica da RT-PCR de cães com diferentes formas clínicas da infecção.

A estirpe Rockborn do CDV, amplificada em células MDCK (*Madin Darby canine kidney*) conforme procedimento padrão (BUXTON *et al.*, 1977), foi utilizada como controle positivo nas reações de RT-PCR.

Cinquenta e seis cães com sinais clínicos de cinomose canina, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/Paraná, Brasil, no período de maio a novembro de 2003 foram selecionados para esse estudo.

De acordo com os sinais clínicos apresentados os animais foram subdivididos em três grupos de estudo. No grupo A foram incluídos 17 animais que apresentavam um ou mais sinais clínicos comuns à forma sistêmica da cinomose canina tais como hipertermia, diarreia, vômito, redução ou ausência de apetite, tenesmo, secreção nasal, tosse, dispnéia, apatia e ceratoconjuntivite seca. O grupo B foi constituído por 8 animais com manifestação clínica de um ou mais sinais compatíveis com a forma neurológica da cinomose incluindo convulsão, mioclonia, rigidez cervical, hiperestesia, tremores musculares, paresia, paralisia, ataxia, mudanças comportamentais, depressão e desorientação. No grupo C foram incluídos 31 cães que apresentavam, simultaneamente, sinais clínicos encontrados nas formas sistêmica e neurológica da cinomose canina e descritos nos grupos anteriores.

Anteriormente à inclusão dos animais no experimento obteve-se o consentimento dos proprietários. Naqueles cães com sinais neurológicos incontroláveis e irreversíveis a eutanásia foi precedida de tranquilização e anestesia geral.

De todos os animais foram colhidos 2 mL de urina, por meio de cistocentese ou sondagem uretro-vesical, e 3 mL de sangue com anticoagulante por venopunção. As amostras foram processadas imediatamente após a colheita ou estocadas no máximo por 48 hs a -20 °C. Para a obtenção de leucócitos, alíquotas de 100 µL de sangue foram submetidas a centrifugação a 10.000 x g por 15 min em gradiente de Percoll (Sigma, EUA) na densidade de 1,08 g/mL. Os leucócitos foram recolhidos e ressuspensos em 1 mL de PBS pH 7,2 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄,

15 mM $K_2H_2PO_4$). Após centrifugação a 1.000 x g por 10 min o sedimento foi ressuspenso em 300 μ L de PBS.

Alíquotas de 300 μ L das amostras clínicas foram submetidas à extração de RNA pelo método da sílica / tiocianato de guanidina (BOMM *et al.*, 1990). Como controle negativo, uma alíquota de água ultrapura autoclavada foi incluída em cada extração.

Para a detecção do gene H do CDV foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) NAW1 [7570] (+) 5'ATCGGCAGCAAAYCCTATC3' e NAW2 [8291] (-) 5'TGGCAACTGTCYTCTCC3', que amplificam um segmento 721 pares de bases (pb) (NEGRÃO *et al.*, 2004). Para a transcrição reversa (RT) foram utilizados 9 μ L de RNA e 1 μ L (20 pmol) do *primer* NAW1. Após incubação a 70 °C por 10 min e imersão em gelo adicionou-se a solução RT-MIX constituída por 1,6 mM de dNTP (Invitrogen[®]), 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM de $MgCl_2$, 60 unidades da enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen[®]) e água ultrapura autoclavada, para a obtenção do volume final de 20 μ L. A RT foi realizada a 42° C por 30 min. Para a PCR foram utilizados 5 μ L do cDNA e PCR-MIX contendo 20 pmol de cada *primer* (NAW1 e NAW2), 1,6 mM de dNTP (Invitrogen[®]), 1 x PCR buffer (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase Recombinante (Invitrogen[®]) e água ultrapura autoclavada para o volume final de 50 μ L .

O processo de amplificação foi realizado em termociclador (MJ Research Co. Water Town, MA, EUA) programado com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa de 94°C/1 min, seguido, por 40 ciclos de 94°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/1 min e uma etapa de extensão final de 7 min a 72°C. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE

pH 8,4 (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM), corado em solução contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Dos 56 animais avaliados, em 45 (80,3%) foi possível a amplificação de um fragmento com 721 pb, correspondente ao gene H do CDV, a partir da urina ou de leucócitos. A tab. 1 apresenta os resultados da RT-PCR realizada em urina e leucócito dos três grupos de cães avaliados.

Tabela 1 – Resultado da RT-PCR para o gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina distribuído de acordo com a forma clínica da doença, em cães naturalmente infectados, Londrina-PR, 2003.

GRUPOS ¹	RESULTADO		TOTAL
	Positivo (%)	Negativo (%)	
A	10 (58,8%)	7 (41,2 %)	17 (30,4%)
B	7 (87,5%)	1 (12,5%)	8 (14,3%)
C	28 (90,3%)	3 (9,7%)	31 (55,3%)
Total	45 (80,3%)	11 (19,7%)	56 (100%)

¹Grupos de cães com manifestação clínica: (A) sistêmica; (B) neurológica e (C) sistêmica/neurológica simultâneas. **p = 0,0272** (Fisher)

A análise da Tab. 1 demonstrou que há diferença significativa ($p = 0,0272$; teste exato de Fischer) entre os três grupos de sinais clínicos testados em relação à positividade ao RT-PCR. O percentual de positividade, de acordo com a forma de manifestação clínica, foi de 87,5% e 90,3% para as formas neurológicas e para a associação das formas sistêmica e neurológica. Apenas 10 (58,8%) dos 17 animais com manifestação de sinais clínicos sistêmicos foram positivos. Esse menor percentual de positividade no grupo A pode ter sido originado pelo próprio modelo de inclusão utilizado na distribuição dos grupos de animais. Os sinais sistêmicos como hipertermia, diarreia, vômito, hiporexia e anorexia, tenesmo, secreção nasal, tosse, dispnéia, apatia e ceratoconjuntivite seca podem ser comuns a uma série de outras infecções (GREENE & APPEL, 1998).

A maioria dos sinais neurológicos utilizados para incluir os cães nos grupos B e C, como convulsão, mioclonia, rigidez cervical, hiperestesia, tremores musculares, paresia, paralisia, ataxia, mudanças comportamentais, depressão e desorientação, também, podem ser observados em outras síndromes neurológicas como a meningoencefalomielite granulomatos, toxoplasmose, neosporose, criptococose e encefalite do Pug (TIPOLD *et al.*, 1992; 1993; 1995). Entretanto, a mioclonia, que foi identificada em 65,7% (23/35) dos animais desses grupos positivos pela RT-PCR, é um sinal clássico da forma nervosa da cinomose. Com isso, na presença de mioclonia, a chance do diagnóstico clínico ser confirmado por um método de diagnóstico laboratorial é maior do que naqueles animais onde são observados apenas sinais clínicos sistêmicos.

Do total de cães positivos na RT-PCR (n=45) a amplificação parcial do gene H do CDV foi possível a partir de leucócitos em 44 (97,8%) animais e a partir de urina em 35 (77,8%) animais. A Quadro 1 apresenta a distribuição dos resultados da RT-PCR de acordo com o tipo de material biológico (urina x leucócitos) empregado para o diagnóstico e os sinais clínicos apresentados pelos cães incluídos nesse estudo.

Quadro 1 Resultado da Técnica de RT-PCR para o gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina em urina e leucócitos distribuídos de acordo com a forma clínica da doença em cães naturalmente infectados, Londrina-PR, 2003

RESULTADO		GRUPOS ¹			TOTAL
URINA	LEUCÓCITOS	A	B	C	
+	+	6	6	22	34
+	-	—	—	1	1
-	+	4	1	5	10
-	-	7	1	3	11
TOTAL		17	8	31	56

¹Grupos: (A) Cães com manifestação clínica sistêmica, (B) neurológica e (C) sistêmica / neurológica simultâneas

Apesar da virúria ser considerada uma forma de excreção freqüente do CDV (SHEN *et al.* 1981), na amostragem utilizada nesse experimento, os leucócitos apresentaram-se como o material de eleição uma vez que, com exceção de apenas um animal, a quase totalidade dos cães positivos apresentou o vírus em leucócitos.

A RT-PCR é um método molecular de diagnóstico que, quando adequadamente padronizado, apresenta alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, na dependência do material biológico a ser empregado para a realização do diagnóstico, resultados falso-negativos podem ocorrer. Particularmente nas infecções agudas, localizadas ou sistêmicas, é possível a eleição de um material biológico para a pesquisa do agente etiológico. Nessa situação características como a patogenia, a evolução e os sinais clínicos da infecção podem definir, com pequena margem de erro, o material biológico mais apropriado para a detecção do agente etiológico (FRISK *et al.*, 1999).

As diferentes formas de apresentação clínica e de evolução da cinomose canina podem dificultar a eleição de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico etiológico dessa virose. Particularmente nas formas de evolução subaguda ou crônica e na ausência de sinais clínicos sistêmicos o CDV pode não estar presente em órgãos, tecidos, secreções e excreções de maneira uniforme. Nessas situações, a utilização de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico pode ser responsável pela ocorrência de resultados falso-negativo (FRISK *et al.*, 1999; MOSHIZUKI *et al.*, 1999) .

Os cães do presente estudo foram incluídos em três grupos de acordo com a predominância de sinais clínicos. A evolução da infecção não foi avaliada. Nessa amostragem, na hipótese de seleção dos leucócitos como único material biológico utilizado para o diagnóstico do CDV, a RT-PCR teria originado 1 (2,2%) resultado falso-negativo, proveniente de um cão do grupo C. Na situação em que apenas a

urina fosse encaminhada para a realização do diagnóstico poderiam ter sido gerados 10 (22,2%) resultados falso-negativos, distribuídos entre os cães incluídos nos três grupos avaliados.

Onze (19,6%) cães foram negativos tanto na urina quanto nos leucócitos. Porém, prováveis resultados falso-negativos não podem ser excluídos pois não foram utilizadas outras técnicas para avaliar a presença ou a ausência do CDV uma vez que o objetivo principal desse trabalho foi a análise comparativa do uso simultâneo de dois materiais biológicos para o diagnóstico etiológico *ante mortem* da cinomose canina. Outras doenças infecto-parasitárias que determinam sinais clínicos semelhantes aos utilizados para a inclusão e distribuição dos cães nos três grupos estudados também não foram investigadas. Apenas em quatro cães que apresentaram sinais clínicos neurológicos e negativos na RT-PCR foi possível realizar exames histopatológicos em fragmentos do sistema nervoso central. Em todos os quatro animais as alterações histológicas observadas descartaram a hipótese de infecção viral.

A possibilidade da realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina é de fundamental importância para os clínicos uma vez que com a confirmação e/ou exclusão do CDV como provável etiologia permite ao clínico a realização do prognóstico de forma mais objetiva e a adoção de medidas de controle e profilaxia diferenciadas e específicas mais apropriadas para cada caso.

A otimização de métodos de diagnóstico sensíveis e específicos que possibilitem a realização do diagnóstico laboratorial conclusivo *ante mortem* do CDV, como a RT-PCR, apresenta-se como uma opção viável. Entretanto, esse trabalho demonstrou que o tipo de amostra clínica submetida ao diagnóstico tem também grande importância no resultado final da técnica. A realização da RT-PCR em duas ou até mesmo em um maior número de amostras biológicas, simultaneamente, pode aumentar consideravelmente a capacidade de diagnóstico da técnica.

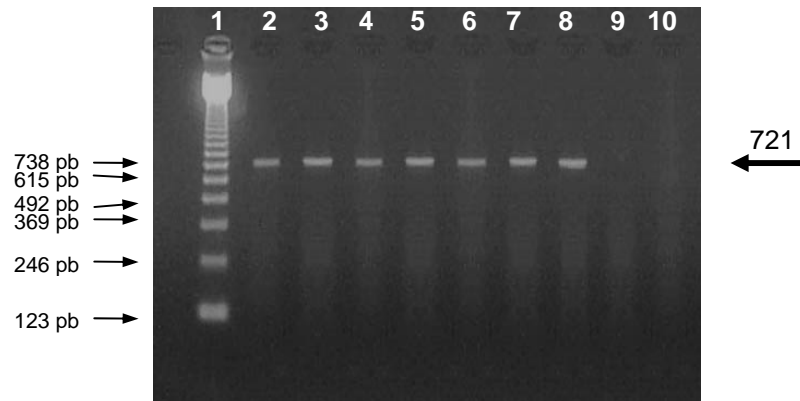


Figura 1. Identificação do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina em urina e leucócito de cães naturalmente infectados.

Canaleta	1:	Padrão de tamanho molecular 123bp (Invitrogen®)
Canaleta	2:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 46
Canaleta	3:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 46
Canaleta	4:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 47
Canaleta	5:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 47
Canaleta	6:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 51
Canaleta	7:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 51
Canaleta	8:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 36
Canaleta	9:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 36
Canaleta	10:	Controle negativo da extração gene H (água ultrapura)

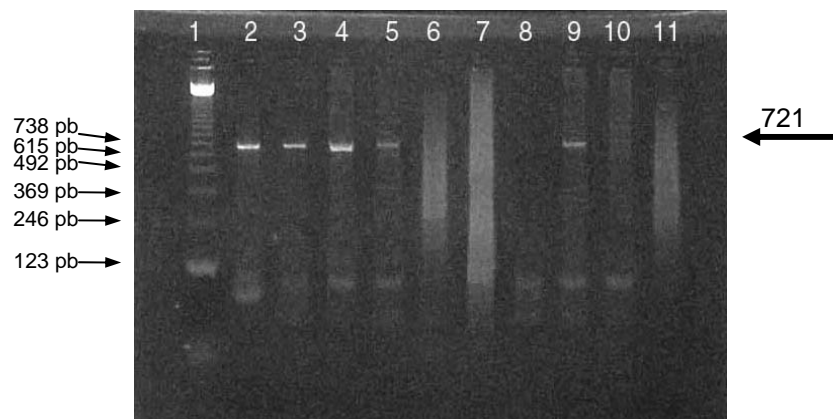


Figura 2. Identificação do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina, frente a urina e leucócito como amostras biológicas.

Canaleta	1:	Padrão de tamanho molecular 123bp (Invitrogen®)
Canaleta	2:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 23
Canaleta	3:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 23
Canaleta	4:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 24
Canaleta	5:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 24
Canaleta	6:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 26
Canaleta	7:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 26
Canaleta	8:	RT-PCR para o gene H em urina, amostra cão 28
Canaleta	9:	RT-PCR para o gene H em leucócito, amostra cão 28
Canaleta	10:	Controle negativo da extração gene H (água ultrapura)
Canaleta	11:	PCR da amostra 23 sem a etapa de RT

REFERÊNCIAS

- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 187-191, 1995.
- APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status [on line], 1999. Disponível na internet via: www.ivis.org. Acesso em 13 de julho de 2003.
- BLIXENKRONE-MÖLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ORVELL, C.; APPEL, M.J.G. Studies on manifestation of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v.37, p.163-173, 1993.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, P.M.E.; WERTHEIN-van DILLEN; NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.
- BUXTON, A.; FRASER, G. **Animal Microbiology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, v. 2, p. 533-548, 1977.
- CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 351-358, 1995.
- FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.
- GREENE, G.E.; APPEL, M. J. Canine distemper. *In* : GREENE, G.E. **Infectious Diseases of the dog and the Cat**. Philadelphia: W.B.Saunders, p. 9-22, 1998.
- GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L; Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e por distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, n.4, p. 539-545, 1987.
- HAAS, L; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D.; BARRET, T. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v. 48, p. 165-171, 1997.
- HEADLEY,S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.2, 2000.
- KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.; CONFER, A.; KOESTNER, A.; MCCULLOUGH, B. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Infectious Diseases**, v.132, n.4, p. 384-392, 1975.
- MOSHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, S.; ISHIGURO, S. Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2936-2942, 1999.

MORITZ, A.; FRISK, A.L.; BAUMGÄRTNER, W. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. **The European Journal of Companion Animal Practice**, v.10, n.1, p.37-45, 2000.

NEGRAO, F. J. **Desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) seguida da técnica de Polimorfismo no Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para a caracterização parcial do gene da Hemaglutinina do vírus da cinomose canina.** Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, 2004.

PRINGLE, C.R. Virus taxonomy – 1999. The Universal System of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses 1998 (Suplem. 2). **Archive of Virology**, v. 144, p. 421-429, 1999.

SAITO, T.B. **Padronização da técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) para o diagnóstico *ante e post* morte do vírus da cinomose canina.** Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)–Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, 2001.

SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; PERDERSEN, V. Viriuria in dogs infected with canine distemper. **Veterinary Medicine / Small Animal Clinician**, p.1175-117, 1981.

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 9, p. 466-470, 1992.

TIPOLD, R.; FATZER, A.; JAGGY, A.; ZUBRIGGEN, A.; VANDEVELDE, M. Necrotizing encephalitis in Yorkshire Terriers. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 11, p. 623-628, 1993.

TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 5, p. 304-314, 1995.

4 CONCLUSÕES

- A técnica de rt-pcr seguida pelo ensaio de rflp, mostrou-se como uma alternativa viável para a caracterização parcial do vírus da cinomose canina.
- A utilização do sistema de rt-pcr e rflp possibilitou a determinação do padrão de restrição do cdv selvagem circulante entre os animais avaliados e a diferenciação desse das estirpes padrão do cdv.
- Independente das formas de manifestação clínica da cinomose canina a utilização de mais de um material biológico aumenta a capacidade de diagnóstico etiológico da cinomose canina.

ANEXOS

ANEXO A – Lista de Reagente

1. Ácido bórico (H_3BO_3) PM: 61,83
2. Agarose (Invitrogen[®])
3. Brometo de Etídio
4. Cloreto de Magnésio – (Invitrogen[®])
5. Clorofórmio
6. dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – (Invitrogen[®])
7. EDTA dissodium PM: 372,24
8. Enzima de Restrição *Hinf* I e *Rsa*I (Gibco BRL[®])
9. Etanol – álcool etílico absoluto
10. Fenol saturado
11. Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
12. Fungizona
13. Gentamicina (40 mg/mL)
14. Isotiocianato de Guanidina (Invitrogen[®])
15. Padrão 123 bp (Invitrogen[®])
16. PBS
17. PCR buffer 10 x (Invitrogen[®])
18. Percoll (SIGMA[®])
19. *Primers* – Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen[®])
20. Random Primer Hexameros (Promega[®])
21. RNase H⁻ Reverse Transcriptase SuperScript[™] II - 200U/ μ l (Invitrogen[®])
22. Sílica (SIGMA[®])
23. Sódio Dodecil Sulfato (SDS)
24. Tampão da amostra para PCR
25. *Taq* DNA polymerase, Recombinant – 5U/ μ L (Invitrogen[®])
26. TRIS (Hidroximetil Amino Metano) PM: 121,14
27. Triton x-100
28. TRIzol LS[®] reagent (Invitrogen[®])

ANEXO B – Preparo de Soluções

Tampão TRIS - acetato - EDTA

- TRIS - 242 g
- Ácido acético glacial - 57,1 mL
- EDTA 0,5M (pH 8,0) - 100 MI

Solução de Percoll

É utilizado para a separação dos leucócitos dos demais componentes celulares do sangue, antes da realização da extração.

$$- V_0 = V \left\{ \frac{d - 0.1x - 0.9}{y - 1} \right\}$$

Sendo V_0 = Volume de PERCOLL

V = Volume final da solução

d = densidade final da solução (= 1,08)

x = densidade NaCl 1,5M (= 1.058)

y = densidade do PERCOLL (= 1.130)

Solução Final: - V_0 (calculado)

- NaCl 1,5M 1:10 da solução final

- água ultrapura (MilliQ) qsp.

Para 3000 μ L de solução final e densidade 1.008, era utilizado 1,94 ml de Percoll (densidade 1.130), adicionado 300 μ L NaCl (1,5 M) e 760 μ L de água ultrapura (água MilliQ). Alternativamente o NaCl pode ser substituído por Sucrose a 2,5 M.

Após a retirada do anel celular o precipitado deve ser lavado por 2 vezes do precipitado com tampão PBS para retirada do Percoll, antes do início da extração sob pena de não amplificação do material genético visto que o Percoll pode interferir na reação.

Solução de Precipitação de DNA Cromossomal

- 1,5 ml de Tampão TRIS (10 Mm)
- 1 mM de EDTA, contendo 0,5% de Nonidet P-40

Tampão TRIS-EDTA-NaCl

- TRIS - 1,2 g
- EDTA - 0,37 g
- NaCl - 5,8 g
- Água qsp. 1000 ml

Solução L6

- 120 gr de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 gr de Triton x 100

Solução L2

- 120 gr de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

Tampão de corrida TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x []

- 0,89 M TRIS ou 107,78 g (peso molecular - 121,1)
- 0,89 M ácido bórico ou 55,03 g (peso molecular - 61,83)
- 0,02 M EDTA dissodium ou 7,45 g (peso molecular – 373,24)
- 1 litro de água destilada qsp

pH = 8,4

Solução tampão de fosfato salina (PBS)

- 137 mM NaCl
- 3 mM KCl
- 8 mM Na₂HPO₄

- 15 mM $K_2H_2PO_4$
- água MilliQ autoclavada qsp 1 litro
- pH = 7,2

Hidratação da sílica

- 60 gr de sílica (SIGMA[®])
- Adicionar 500 ml de água bidestilada
- Agitar e permanecer em repouso durante 24 horas
- Desprezar 430 ml do sobrenadante por sucção
- Ressuspender a sílica em 500 ml de água bidestilada
- Permanecer em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 440 ml do sobrenadante
- Adicionar 600 μ L de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

Gel de Agarose 2%

- 2 gr de agarose (Invitrogen[®])
- 100 ml água destilada qsp
- Aquecer até dissolver a agarose

ANEXO C – Diluição dos primers

Primer *CDV1*

Seqüência: 5'aca gga ttg ctg agg acc tat 3'

Posição: 769-789

Concentração: 60,2 nmol

$60,2 \times 1000 = 60200$ pmol

$60200 / 20 = 3010$

- Solução estoque: ressuspender em 301,0 μ L de água MilliQ autoclavada para obter uma solução 10 x []
- Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MilliQ autoclavada
- Concentração final: 20 pmol / μ L

Primer *CDV2*

Seqüência: 5'caa gat aac cat gta cgg tgc 3'

Posição: 1055-1035

Concentração: 62,7 nmol

$62,7 \times 1000 = 62700$ pmol

$62700 / 20 = 3135$

- Solução estoque: ressuspender em 313,5 μ L de água MilliQ autoclavada para obter uma solução 10 x []
- Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MilliQ autoclavada
- Concentração final: 20 pmol / μ L

Primer NAW1**Seqüência:** 5'ATCGGCAGCAAAYCCTATC3',

Posição: 7570-7588

Concentração: 38,9 nmol

 $38,9 \times 1000 = 38900 \text{ pmol}$ $38900 / 20 = 194,5$

- Solução estoque: ressuspender em 194,5 μL de água MilliQ autoclavada para obter uma solução 10 x []
- Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MilliQ autoclavada
- Concentração final: 20 pmol / μL

Primer NAW2**Seqüência:** [8291] (-) 5'TGGCAACTGTCYTCTCC3'tgc 3'

Posição: 8273-8291

Concentração: 48,2 nmol

 $48,2 \times 1000 = 48200 \text{ pmol}$ $48200 / 20 = 2410$

- Solução estoque: ressuspender em 241 μL de água MilliQ autoclavada para obter uma solução 10 x []
- Solução de uso: diluir 1 parte da solução estoque em 9 partes de água MilliQ autoclavada
- Concentração final: 20 pmol / μL
- Y representa a base degenerada correspondente as bases C ou T

ANEXO D – Número de acesso das seqüências do CDV (GenBank)

1. Onderstepoort nº D00758;
2. Convac nº Z35493;
3. US 89 nº Z47762;
4. DK 91 B+C nº Z47761;
5. GR 88 nº Z47760;
6. 404 nº Z77671;
7. 2544 nº Z77672;
8. 4513 nº Z77673;
9. 5804/Han 90 nº X85000;
10. Ueno nº D85753;
11. Hamamatsu nº D85754;
12. Yanaka nº D85755;
13. A 92-27/4, nº Z54156;
14. A 92-6, nº Z54166;
15. Leopardo/US 91, nº Z47763;
16. Raccoon/US 89, nº Z47765;
17. Javali/US 89, nº Z47764;
18. Mink/DK 86, nº Z47759;
19. 1493/Han 89, nº X84999;
20. Tanu 96, nº AB01676;
21. 98-002, nº AB025270;
22. KDK-1, nº AB025271.

A estirpe vacinal Rockborn presente no Brasil não tem a seqüência da ORF H disponível no GenBank e a estirpe vacinal Convac não esta presente no Brasil.

ANEXO E – Protocolos de Técnicas

Macerado de Fragmentos de Órgãos

1. Pesar 2 ou 4 gramas de cada órgão
2. Triturar o órgão com pistilo em um cadinho contendo PBS (se for só fazer o PCR) ou Meio de cultivo celular mínimo essencial sem soro fetal bovino (isolamento)
3. Centrifugar a 4000 x g por 15 minutos à 4° C
4. Recolher sobrenadante para extração do RNA ou para a inoculação em célula de cultura contínua

Separação de leucócitos em gradiente de densidade em solução Percoll

1. Percoll 1,08 na proporção de 1:2 com sangue total com anticoagulante (EDTA)
2. Centrifugação a 1000x g por 20 minutos, para formação anel de leucócitos
3. Recolher leucócitos
4. Lavagem das células com tampão PBS 1:5 (alternativamente pode ser utilizado NaCl 0,9% 1:5, SAITO, 2000), duas vezes, para remover solução de Percoll

Precipitação por etanol seguido da técnica de sílica

1. 100 µL da amostra
2. 900 µL de L6
3. Mantemos 10 minutos sob agitação a temperatura ambiente
4. Adicionamos 40 µL de sílica
5. Colocamos no homogenizador de bandeja onde permaneceu por 30 minutos a temperatura ambiente
6. Centrifugamos 30 segundos em alta rotação
7. Desprezamos o sobrenadante
8. Lavamos com 500 µL de L2 (tiocianato de guanidina) por 2 vezes.
9. Lavamos com 1000 µL de etanol 70% por 2 vezes
10. Lavamos com 1000 µL de acetona 1 vez
11. Secamos o pelett em estufa a 37 °C por 15 minutos

12. Adicionamos 50 μL de água e colocamos em banho-maria a 56° C por 10 minutos e centrifugamos em alta rotação por 2 minutos, retiramos o sobrenadante, repetimos a operação novamente.
13. Aos 100 μL obtidos adicionamos 10 μL de acetato de sódio 3 M e 400 μL de etanol puro e mantemos a solução em freezer -20 °C overnight.
14. Centrifugamos a amostra em alta rotação por 10 a 15 minutos, pelo protocolo desprezamos o sobrenadante pois é um protocolo para ácido nucléico de alto peso molecular. Secamos o pellet na estufa e ressuspendemos em 30 μL de água ultrapura autoclavada.

Extração do RNA fenol/clorofórmio–álcool isoamílico

1. 500 μl do sobrenadante de cultura celular infectada com o CDV, 500 μL da suspensão de fragmentos de órgãos, ou 500 μL das amostras clínicas (sangue, soro, plasma, leucócitos, urina ou líquido)
2. Adicionar 500 μL de fenol saturado
3. Homogeneizar em vórtex
4. Banho-maria à 56° C durante 15 minutos
5. Homogeneizar em vórtex
6. Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos
7. Recolher a fase aquosa em outro tubo
8. Adicionar 500 μL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
9. Homogeneizar em vórtex
10. Banho-maria à 56° C durante 15 minutos
11. Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos
12. Recolher fase aquosa em outro tubo
13. 40 μL de NaCl a 20%
14. Adicionar etanol até completar o tubo
15. Homogeneizar por inversão
16. Estocar à -20° C por 12 horas
17. Centrifugar a 10.000 x g durante 15 minutos
18. Desprezar sobrenadante por inversão
19. Secar o pellet em estufa à 37° C

20. Adicionar 35 μ L de água MilliQ autoclavada

Extração do RNA pelo método sílica / tiocianato de guanidina

1. 300 μ L do sobrenadante de cultura celular infectada com o CDV, 300 μ L da suspensão de fragmentos de órgãos, ou 300 μ L das amostras clínicas (sangue, leucócitos)
2. 10 μ L de sílica hidratada
3. 900 μ L de solução L6
4. Homogeneizar em vórtex
5. Agitar durante 30 minutos em temperatura ambiente
6. Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
7. Desprezar sobrenadante
8. Adicionar 500 μ L de solução L2
9. Homogeneizar em vórtex
10. Centrifugar a 10.000 x g durante 30 segundos
11. Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
12. Repetir passos 8, 9, 10 e 11
13. Adicionar 1 mL de etanol a 70%
14. Repetir os passos 9, 10 e 11
15. Repetir os passos 13 e 14
16. Adicionar 1 mL de acetona PA
17. Repetir passos 9, 10 e 11
18. Secar o pellet em estufa à 37° C durante 15 minutos (tubo aberto)
19. Adicionar 40 μ L de água MilliQ autoclavada
20. Homogeneizar em vórtex
21. Banho-maria à 56° C durante 15 minutos
22. Homogeneizar em vórtex
23. Centrifugar a 10.000 x g durante 2 minutos
24. Recolher sobrenadante

Extração do RNA pela associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ tiocianato de guanidina.

1. 500 μ L da amostra
2. 60 μ L de SDS
3. Homogeneizar em vórtex
4. Banho-maria à 56° C durante 10 minutos
5. 500 μ L de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
6. Homogeneizar em vórtex
7. Banho-maria à 56° C durante 15 minutos
8. Centrifugar a 10.000 x g durante 10 minutos
9. Recolher sobrenadante em outro tubo
10. Prosseguir extração pelo método sílica / tiocianato de guanidina descrito anteriormente

Protocolo do TRIzol LS[®]

1. Colocamos 300 μ l da amostra em um ependorf
2. Adicionamos 900 μ L TRIzol[®]
3. Homogeneizamos com pipeta
4. Incubamos a temperatura ambiente (15-30° C) por 5 minutos
5. Adicionamos 240 μ L Clorofórmio
6. Agitamos manualmente por 15 segundos
7. Incubamos novamente a 4 °C por 15 minutos
8. Centrifugamos a 12.000x g (12000 RPM) por 15 minutos em 2-8° C
9. Recolhemos a fase superior aquosa evitando a interfase e transferimos para outro ependorf
10. Adicionamos 500 μ L de álcool isopropílico para precipitar o RNA
11. Incubamos a temperatura ambiente (15-30° C) por 10 minutos
12. Centrifugamos a 12.000x g (12000 RPM) por 10 minutos a 4° C
13. Desprezamos o sobrenadante
14. Adicionamos 200 μ L etanol 75% gelado
15. Homogeneizamos em vórtex
16. Centrifugamos a 7.500x g (7500 RPM) por 5 minutos a 4° C

17. Desprezamos o sobrenadante em fluxo laminar
18. Secamos o pellet por 5-10 minutos
19. Adicionamos 75 μL de água MilliQ autoclavada com DPEC (Dietilpirocarbonato – inibidor de RNase).
20. Homogeneizamos com pipeta

Protocolo de extração de DNA de gel de agarose “QIAquick”

1. 130 g de gel
2. Adicionar 400 μL tampão QX1
3. Agitar manualmente
4. Banho-maria a 56° C por 10 minutos
5. Passar a amostra para coluna com tubo de coleta
6. Centrifugar por 1 minuto
7. Desprezar o filtrado
8. Adicionar 750 μL tampão PE
9. Repouso por 5 minutos
10. Centrifugar por 1 minuto
11. Desprezar o filtrado
12. Centrifugar por 1 minuto
13. Eluir o produto com 50 μL de água ultrapura autoclavada
14. Centrifugar por 1 minuto
15. Armazenar o sobrenadante para uso.

Restrição do produto por digestão enzimática

1. 18 μL da amostra
2. Adicionar 1 μL da enzima *Hinf* I ou *Rsa* I (Invitrogen®) e 2 μL do tampão da enzima (React I e React II).
3. Homogeneizar
4. Incubar à 37° C durante 2 horas