

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS VÍRUS DA CINMOSE E  
PARAINFLUENZA CANINOS EM CÃES E FELINOS SILVESTRES EM  
CATIVEIRO**

**Tamahine Larronda Schmidt Hartmann**

**Porto Alegre**

**2006**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS VÍRUS DA CINMOSE E  
PARAINFLUENZA CANINOS EM CÃES E FELINOS SILVESTRES EM  
CATIVEIRO**

**Tamahine Larronda Schmidt Hartmann\***

Dissertação apresentada como requisito  
para obtenção do grau de Mestre em  
Ciências Veterinárias na área de Medicina  
Preventiva Veterinária – Virologia Veterinária

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle**

**Co-orientador: Profa. Dra. Ana Cláudia Franco**

**Porto Alegre**

**2006**

\* Médica Veterinária, ULBRA 2000/1

**AVALIAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS VÍRUS  
DA CINMOSE E PARAINFLUENZA CANINOS EM CÃES E FELINOS  
SILVESTRES EM CATIVEIRO**

**APROVADO POR:**

**Prof. Dr. PAULO MICHEL ROEHE**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

**Prof. Dr. AMAURI SIMONETTI**  
**Membro da Banca.**

**Prof. Dr. CLÁUDIO WAGECK CANAL**  
**Membro da Banca.**

**Profa. Dra. VIRGÍNIA MINGHELLI SCHMITT**  
**Membro da Banca.**

## AGRADECIMENTOS

À minha família: meus pais João Roberto e Joyce, meu irmão Christian; sogros Círio e Ivany, vô Ruy e tia Zoraide (sei que torcem por mim de onde estão); vó Suely, tios (Elida, Paulo, Jeane), cunhados e cunhadas (Priscilla, Stella Maris, Augusto, Alexandre e Fernanda) e sobrinhos (Júlia, Leonardo, Catharina, Isadora, Theodoro). Ao meu amado Cícero, muito obrigado por sempre me apoiar em tudo que faço, por estar ao meu lado em todos os momentos com muito carinho e dedicação. Obrigada por todo apoio, amor, carinho, amizade e compreensão, vocês todos são muito especiais e um grande incentivo para mim, amo vocês.

Ao Lucki e a minha grande amiga Fernanda (Fefa), obrigada pelo apoio moral.

Ao meu orientador Paulo Michel Roehe, pela oportunidade, ensinamentos, confiança, paciência, amizade, exemplo de entusiasmo e dedicação à pesquisa. À minha co-orientadora Ana Cláudia e ao Frans, obrigada pela amizade, ensinamentos e disposição em ajudar. Todos vocês são exemplos a serem seguidos.

A todos os meus amigos e colegas: Paulinho e Alessandra, Helena (Dada), Fernando Spilki, Sílvia, Anna Paula, Cíntia, Diógenes e Thaís. Muito obrigado por estarem presentes nesta fase de minha vida, tornando-a muito mais alegre e principalmente pelo aprendizado, opiniões, apoio e amizade. Cada um de vocês ajudou-me do seu jeito, em momentos diferentes e espero que no futuro possamos continuar nos encontrando.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS e todos os professores, pelos ensinamentos e oportunidade.

A FAPERGS e CNPq, por terem financiado este projeto.

A direção e todos os integrantes da FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), em especial ao Eng. Agr. Eduardo Schmidt.

A todos vocês que me ajudaram em vários momentos e foram muito importantes durante este trabalho.

A Deus, por ter colocado vocês em meu caminho.

## **ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA OS VÍRUS DA CINOMOSE E PARAINFLUENZA CANINOS EM CÃES E FELINOS SILVESTRES EM CATIVEIRO**

### **RESUMO**

O vírus da cinomose canina (CDV) e o vírus parainfluenza canino (CPIV) afetam uma ampla variedade de hospedeiros e encontram-se distribuídos mundialmente. O CDV é considerado um dos mais importantes agentes infecciosos dentro das populações caninas. Este vírus é o agente causal da cinomose, uma doença potencialmente letal em membros das famílias *Canidae*, *Mustelidae* e *Procionidae*, sendo recentemente detectado como causa de morbidade e mortalidade em carnívoros aquáticos e grandes felinos. O CPIV, por sua vez, é altamente contagioso entre cães, podendo infectar roedores e gatos em infecções experimentais. Geralmente, o CPIV produz uma traqueobronquite aguda auto-limitante, porém pode atuar sinergicamente com outros agentes infecciosos, como o CDV, causando sinais clínicos mais graves. Como em nosso meio são escassas as informações sobre estes vírus, o presente estudo visou aprofundar os conhecimentos sobre a prevalência de CDV e CPIV em cães e felinos silvestres mantidos em cativeiro. Para tanto, soros destes animais foram testados em busca de anticorpos neutralizantes contra amostras padrão do CDV (Rockborn e Snyder Hill) e do CPIV (V660). Inicialmente, foram testados soros de 173 cães de rua mantidos em canis municipais em Novo Hamburgo e Porto Alegre, RS. A prevalência de anticorpos neutralizantes anti-CDV frente às amostras de vírus da cinomose Rockborn e Snyder Hill, foi de 9,3 % e 4,1 %, respectivamente. Somente dois cães apresentaram títulos de anticorpos considerados protetores contra CDV Rockborn (igual ou maior que 100) e nenhum soro apresentou título de anticorpos neutralizantes considerado protetor para a amostra Snyder Hill (igual ou maior que 100). Contra a amostra de parainfluenza canino V660, a prevalência de anticorpos neutralizantes encontrada foi de 51,4 %. Conclui-se, portanto, que a população de cães de rua amostrada apresenta poucos indícios de contato prévio com CDV, sugerindo grande susceptibilidade à cinomose. Por outro lado, o CPIV parece circular amplamente nesta população. Na segunda parte do presente estudo, como no Brasil não existem relatos sobre CDV e CPIV em felinos silvestres, buscou-se verificar a possibilidade da ocorrência dessas infecções em felinos silvestres brasileiros. Para tanto, foram testados soros de 84 felinos silvestres de seis diferentes espécies nativas do Brasil (*Leopardus*

*tigrinus*, *Puma concolor*, *Leopardus wiedii*, *Herpailurus yaguarondi*, *Panthera onca*), todos mantidos em cativeiro em criatórios de distintas regiões do País. Todos os felinos amostrados apresentaram-se soronegativos frente às amostras de CDV e CPIV utilizadas. Estes resultados indicam que CDV e CPIV parecem não circular nas populações de felinos silvestres amostradas.

**Palavras-chave:** vírus da cinomose; vírus parainfluenza canino; cães; felinos silvestres; soroneutralização; prevalência.

## NEUTRALIZING ANTIBODIES TO DISTEMPER AND PARAINFLUENZA VIRUSES IN DOGS AND CAPTIVE WILD FELIDS.

### **ABSTRACT**

Canine distemper virus (CDV) and canine parainfluenza virus (CPIV) infect a great variety of hosts ranges and are distributed worldwide. CDV is one of the most important infectious agents in dogs. This virus may cause potentially lethal disease among members of the *Canidae*, *Mustelidae* and *Procionidae* families. It has also caused diseases of significant morbidity and mortality in aquatic carnivores and large felids. CPIV, on its turn, is highly contagious among dogs, whilst rodents and cats are susceptible to experimental infections. CPIV is usually associated with an acute self-limiting tracheobronchitis. However, it can act synergistically with other infectious agents, such as CDV, and cause clinical signs of variable severity. As information on CDV and CPIV infections in our millieu are scarce, this study was carried out aiming to increase knowledge on the prevalence of CDV and CPIV in stray dogs as well as in captive Brazilian wild felids. In order to have an estimate on such prevalences, sera from these animals were tested for neutralizing antibodies to CDV strains Rockborn and Snyder Hill, and to CPIV strain V660. Initially, 173 sera from stray dogs kept in kennels from the municipalities of Novo Hamburgo and Porto Alegre, RS, were examined. The prevalences of neutralizing antibodies to CDV strains Rockborn and Snyder Hill were 9.3 % and 4.1 %, respectively. Only two dogs had antibody levels which could be correlated to protection (that is, titre  $\geq 100$ ) to CDV Rockborn whereas no sera presented antibody titres high enough to be considered protective to CDV strain Snyder Hill (that is, titre  $\geq 100$ ). Regarding CPIV, the prevalence of anti-V660 neutralizing antibodies was 51.4 %. It can be concluded that the stray dog populations under study shows few serological evidence of previous contact with CDV and seem largely susceptible to CDV infections. On the other hand, CPIV seems to circulate widely in the examined population. In the second part of this study, as there are no reports on CDV and CPIV infections in wild felids in Brazil, it was aimed to determine whether there would be any evidence of such infections among some of such species. For that, 84 sera from wild felids of six different Brazilian native species (*Leopardus tigrinus*, *Puma concolor*, *Leopardus wiedii*, *Herpailurus yaguarondi*, *Panthera onca*), all kept in captivity in different regions of the country, were tested for neutralizing antibodies to both CDV and CPIV. All wild felid sera tested were negative for

antibodies to the two strains of CDV as well as to CPIV. These results indicate that CDV and CPIV do not seem to circulate among the wild felid populations examined.

**Key words:** canine distemper virus; canine parainfluenza virus; dogs; wild felids; sero neutralization; prevalence.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática de um membro da família *Paramyxoviridae*. **13**
- Figura 2** - Esquema da estratégia de replicação viral dos membros da família *Paramyxoviridae*. **15**
- Figura 3** - Foto de um paramixovírus ao microscópio eletrônico. **24**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>12</b>
<b>1.1 Vírus da Cinomose</b>	<b>12</b>
<b>1.1.1 Introdução</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2 Descrição do agente</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2.1 Multiplicação Viral</b>	<b>13</b>
<b>1.1.3 Epidemiologia</b>	<b>15</b>
<b>1.1.4 Transmissão</b>	<b>16</b>
<b>1.1.5 Patogenia</b>	<b>16</b>
<b>1.1.6 Manifestações clínicas de infecções por CDV</b>	<b>17</b>
<b>1.1.7 Imunidade em infecções por CDV</b>	<b>18</b>
<b>1.1.8 Diagnóstico</b>	<b>19</b>
<b>1.1.8.1 Isolamento Viral</b>	<b>21</b>
<b>1.1.9 Prevenção</b>	<b>21</b>
<b>1.2 Vírus Parainfluenza Canino</b>	<b>23</b>
<b>1.2.1 Introdução</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2 Descrição do agente</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2.1 Multiplicação Viral</b>	<b>25</b>
<b>1.2.3 Epidemiologia</b>	<b>25</b>
<b>1.2.4 Transmissão</b>	<b>25</b>
<b>1.2.5 Patogenia</b>	<b>26</b>
<b>1.2.6 Manifestações clínicas de infecções por CPIV</b>	<b>26</b>
<b>1.2.7 Imunidade em infecções por CPIV</b>	<b>27</b>
<b>1.2.8 Diagnóstico</b>	<b>28</b>
<b>1.2.8.1. Isolamento Viral</b>	<b>28</b>
<b>1.2.9 Prevenção</b>	<b>29</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>Capítulo 1- Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e parainfluenza em cães.</b>	<b>31</b>
<b>Capítulo 2- Ausência de anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e parainfluenza canino em felinos silvestres em cativeiro.</b>	<b>48</b>

<b>3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS</b>	<b>60</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 Vírus da Cinomose

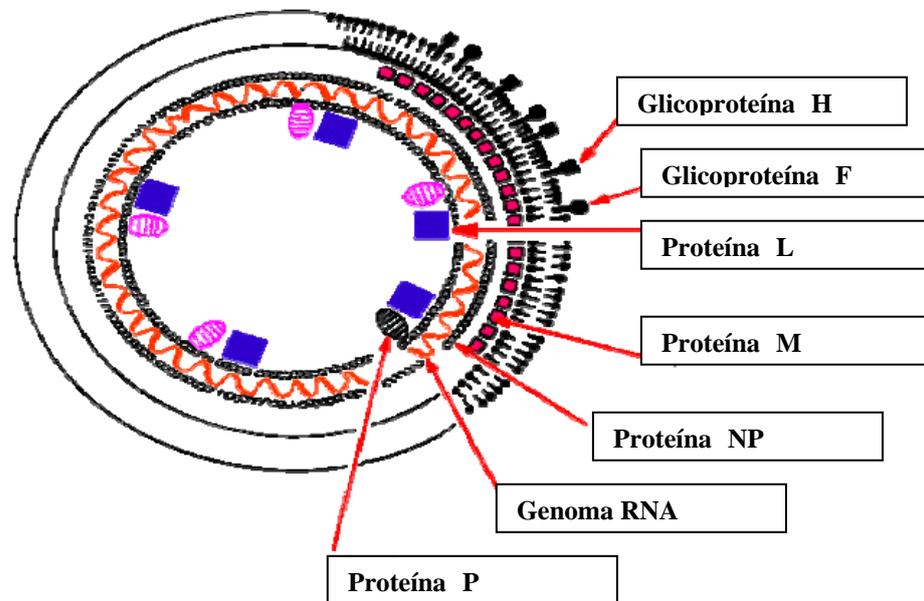
#### 1.1.1 Introdução

O vírus da cinomose canina (“canine distemper virus”, ou CDV), causa uma doença infecciosa sistêmica contagiosa aguda, subaguda ou crônica que pode causar significativa mortalidade em cães e muitos outros carnívoros. A cinomose é a moléstia viral mais prevalente em cães. Em todo o mundo, apenas a raiva tem percentagem de fatalidades em cães mais elevada do que a cinomose (SWANGO, 1997). Além dos cães, o CDV pode infectar uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo muitas espécies de felinos silvestres ameaçadas de extinção (BLYTHE et al., 1983; TIMONEY et al., 1992; APPEL et al., 1994; SUMMERS et al., 1994; MAMAEV et al., 1995; LEDNICKY et al., 2004).

#### 1.1.2 Descrição do agente

O CDV pertence ao gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* (POSTOM e ENGLAND, 1992; LEDNICKY et al., 2004). O CDV, como os demais membros da família *Paramyxoviridae*, é um vírus pleomórfico, envelopado, com simetria helicoidal e fita simples de RNA com polaridade negativa e diâmetro de 150 a 300 nm (APPEL e SUMMERS, 1995; BÜCHEN-OSMOND, 2003; LEDNICKY et al., 2004). O nucleocapsídeo contém três das seis proteínas virais estruturais denominadas NP, P e L (APPEL, 1987; LEDNICKY et al., 2004). Estas são circundadas por um envelope lipoprotéico com uma proteína de membrana denominada proteína matriz (M) no lado interno do vírion e duas glicoproteínas denominadas hemaglutinina e proteína de fusão (H e F) no lado externo (SHAPSHAK et al., 1982; RIMA, 1983). A proteína M estabiliza o envelope. A proteína H é responsável pela ligação com o receptor celular. A proteína F é responsável pela fusão viral com a célula hospedeira (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). A nucleoproteína (NP) e hemaglutinina (H) induzem resposta imune humoral específica e celular contra CDV (SIXT et al., 1998; MESSLING et al., 2001) (Figura 1). Estes agentes virais são relativamente lábeis e sua

infectividade é destruída pelo calor, dessecação, detergentes, solventes de lipídios e desinfetantes (GREENE, 1984; BÜCHEN-OSMOND, 2003).



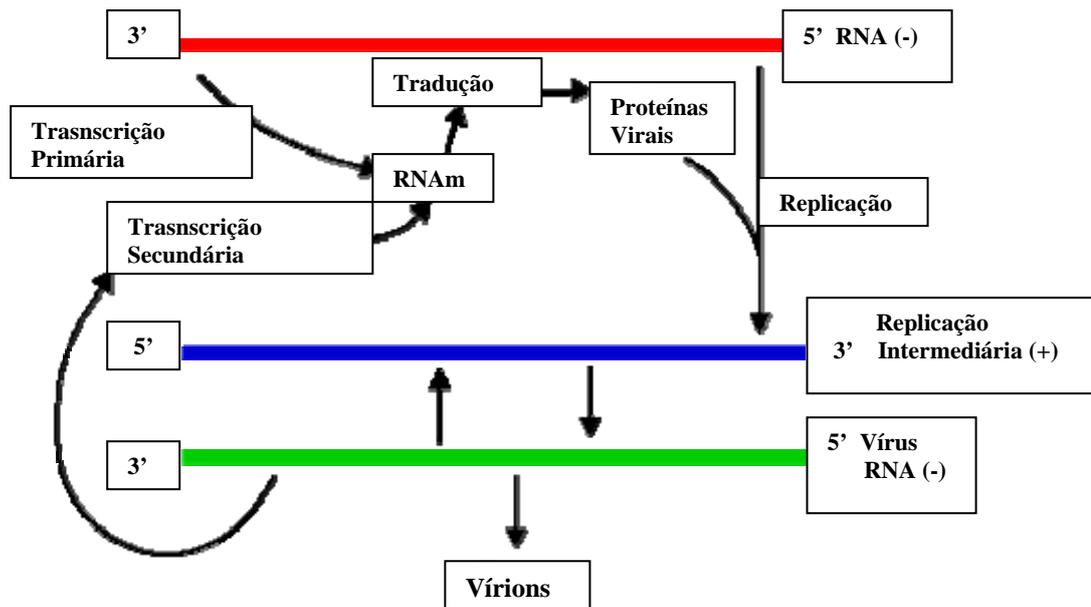
**Figura 1:** Representação esquemática de um membro da família *Paramyxoviridae*.

### 1.1.2.1 Multiplicação Viral

Os mecanismos de replicação dos membros da família *Paramyxoviridae* são similares (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). A adsorção viral nas células hospedeiras resulta da combinação da glicoproteína H do envelope do vírion com os receptores da membrana celular, seguida por fusão deste envelope com a membrana celular (BÜCHEN-OSMOND, 2003; MESSLING et al. 2001). A fusão celular e a infectividade viral são acentuadas por clivagem proteolítica da proteína F e a inibição destas atividades é realizada por inibidores enzimáticos. A fusão dos vírions na membrana celular resulta na liberação do nucleocapsídeo dentro do citoplasma onde é feita a síntese macromolecular viral. O nucleocapsídeo atua como um complexo transcricional contendo o genoma viral e as proteínas NP, P e L, com a capacidade para sintetizar, metilar, restringir e poliadenilar o RNAm viral. A transcrição do RNAm e a síntese de proteínas virais são seguidas por replicação do RNA viral contendo cópias complementares do genoma viral. Este processo é dependente da síntese de proteínas e é

catalisado, em parte, por uma replicase recém sintetizada. A fita de RNA de sentido positivo obtida serve como modelo para a progênie de genomas que são secundariamente transcritos e replicados, amplificando os componentes virais no citoplasma celular (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). As glicoproteínas H e F são sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso sendo, então, associadas ao retículo endoplasmático liso de onde migram para a membrana plasmática, onde ocorre a maturação viral. A proteína NP que é maior proteína do nucleocapsídeo, parece ser sintetizada em polissomos livres e transportada direto para a membrana plasmática. A proteína M é incorporada na membrana plasmática rapidamente após sua síntese. Esta proteína tem um importante papel na montagem viral por interagir com as glicoproteínas do envelope e com a proteína N do nucleocapsídeo. Estas interações formam ligações entre os componentes virais internos e externos em áreas localizadas da membrana celular, onde os vírions amadurecem e são liberados por brotamento (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003) (Figura 2).

O CDV replica melhor em linfócitos e macrófagos dos animais infectados (FRIENLANDER et al., 1985). Pode replicar-se, também, em culturas de células de cérebro e fibroblastos de cães e furões. O isolamento em células de linhagem pode ser alcançado pelo uso de suspensões de células de animais infectados de forma aguda (APPEL, 1987). Uma vez adaptado, o CDV replica-se em um grande número de células de linhagem de diferentes espécies. As células de linhagem renais caninas (MDCK) e células VERO têm sido mais comumente usadas (APPEL e GILLESPIE, 1972; SUMMERS et al, 1984). A formação de células gigantes multinucleadas (sincícios) é freqüentemente encontrada em infecções por CDV. Formas arredondadas e estreladas podem ser encontradas também. Corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares também são achados comuns. O efeito citopático (ECP) pode aparecer de um a dez dias após a infecção celular (FRIENLANDER et al., 1985).



**Figura 2:** Esquema da estratégia de replicação viral dos membros da família *Paramyxoviridae*.

### 1.1.3 Epidemiologia

O CDV está distribuído mundialmente, sendo um dos mais importantes agentes infecciosos das populações caninas, jovens e adultos, tanto não imunizadas como imunizadas (DUNGWOTH,1993; BLIXENKRONE-MØLLER et al.,1993; KAI et al.,1993; ALEX & DHANAPALAN, 1994; JOHSON et al., 1995; GEMMA et al., 1996; GOUVEIA et al., 1996; EK-KOMMONEN et al., 1997; FRISK et al. 1999). Conhecido por causar uma doença potencialmente letal em membros das famílias *Canidae*, *Mustelidae* e *Procionidae*, o CDV foi recentemente detectado como causa de morbidade e mortalidade em grandes felinos (*Felidae*), carnívoros aquáticos e vários outros animais (BLYTHE et al., 1983; GOULD & FENNER, 1983; TIMONEY et al.,1992; APPEL et al., 1994; SUMMERS et al., 1994; MAMAEV et al., 1995; LEDNICKY et al., 2004). No Brasil, existem poucas informações disponíveis a respeito da prevalência do CDV nas populações caninas (GOUVEIA et al., 1987; HEADLEY e GRAÇA, 2000). Em um estudo realizado em Santa Maria, RS, foram detectados anticorpos específicos contra CDV em 17,4% da população canina amostrada, com histórico de vacinação desconhecido (DEZENGRINI, 2005). Em outro estudo, realizado

em Belo Horizonte, MG, foi encontrada uma soropositividade para cinomose de 6,1% em cães vacinados (GOUVEIA et al., 1987).

#### **1.1.4 Transmissão**

O CDV é transmitido predominantemente por aerossóis ou por contato direto entre animais. Não obstante, o vírus pode ser isolado da maioria dos tecidos, secreções e até mesmo da urina de animais infectados (APPEL, 1987; APPEL e SUMMERS, 1995). O vírus pode ser excretado por sessenta a noventa dias após a infecção, porém, períodos curtos de liberação viral são mais típicos. O contato entre animais infectados mantém o vírus na população. Embora a imunidade contra o vírus da cinomose seja prolongada, ela não é necessariamente sólida ou duradoura. Cães que não recebem imunizações periódicas podem perder sua imunidade e infectar-se após estresse, imunossupressão ou contato com indivíduos doentes (GREENE e APPEL, 1998). A prevalência de cinomose em cães cosmopolitas é maior entre três e seis meses de idade, o que está correlacionado com a gradativa redução no nível de anticorpos maternos passivamente adquiridos com ausência de imunidade ativa (ADELUS-NEVEU et al., 1991; GREENE e APPEL, 1998).

#### **1.1.5 Patogenia**

A infecção natural se dá usualmente através da inalação do vírus em aerossóis (APPEL e SUMMERS, 1995). A replicação viral ocorre primeiramente em células do tecido linfático do trato respiratório. O vírus multiplica-se em macrófagos teciduais, sendo transportado para outros tecidos linfóides. Após replicação em macrófagos e linfócitos T e B, o CDV é carregado por migração celular para todos os tecidos linfáticos do animal, incluindo baço, timo, linfonodos, medula óssea, lâmina própria do estômago e intestino e células de Küpfer do fígado (SUMMERS et al.1978; APPEL, 1987). Aproximadamente sete dias pós-infecção (p.i.), o CDV pode ser isolado de todos os tecidos linfáticos e dos linfócitos do sangue. Durante este período, a primeira elevação de temperatura corporal é detectada, normalmente três a quatro dias p.i.. Ao mesmo tempo, interferon (IFN) se torna detectável no soro (TSAI et al., 1982).

Entre sete a quatorze dias p.i. aproximadamente, dependendo da amostra viral, inicia-se uma vigorosa resposta imune humoral e celular. Dependendo de fatores

individuais e de suas interações com outras variáveis relacionadas à amostra de vírus infectante, o animal pode seguir caminhos distintos após a infecção: desenvolver uma resposta imune vigorosa e recuperar-se, ou apresentar algum tipo de falha em sua resposta imune que poderá resultar no desenvolvimento da doença aguda ou subaguda, em morte ou ainda levar a uma infecção persistente (crônica). Os cães que se recuperam são capazes de eliminar o vírus de seus tecidos. Em cães onde a recuperação não ocorre prontamente, o vírus se espalha pela superfície epitelial dos tratos digestivo, respiratório e urogenital, nas glândulas endócrinas e exócrinas e para o sistema nervoso central (SNC; APPEL et al., 1982, 1984; TSAI et al., 1982). No SNC, o CDV aparece inicialmente em linfócitos perivasculars oito a dez dias p.i., logo depois em macrófagos meningeais e células endoteliais e mais tarde em células gliais e neurônios. Muitos cães com infecção disseminada sucumbem três a quatro semanas p.i. Como mencionado acima, em alguns cães o início da resposta imune é tardio. Tais cães sucumbem a uma doença subaguda, frequentemente cursando com encefalite, ou apresentam uma infecção crônica persistente por três a quatro meses (APPEL et al., 1982, 1984; TSAI et al., 1982). Com o início tardio da resposta imune em animais infectados por CDV, o vírus gradualmente desaparece dos tecidos linfáticos e muitos órgãos, exceto o SNC, olhos, algumas vezes os pulmões e certas áreas da pele (almofadas plantares). IFN é liberado dentro do SNC destes cães enquanto se mantiver a infecção viral persistente. Em contraste, não há IFN mensurável no soro aproximadamente por duas semanas p.i. (TSAI et al., 1982; SUMMERS et al., 1983). A patogênese da encefalomielite na cinomose está relacionada com a distribuição do vírus. Encefalite aguda e morte são freqüentes quando há infecção da massa cinzenta, ao passo que encefalite subaguda ou crônica ocorre quando a desmielinização predomina (APPEL, 1987). Diferentes amostras de vírus têm afinidade distinta quanto à massa branca ou cinzenta do cérebro (SUMMERS et al., 1984). O vírus infeccioso pode ser isolado do cérebro infectado com CDV (APPEL, 1987; LEDNICKY et al. 2004).

#### **1.1.6 Manifestações clínicas de infecções por CDV**

A duração e severidade da doença clínica parecem depender da amostra viral, condições ambientais, idade do animal, da resistência individual do hospedeiro e infecções secundárias bacterianas e virais. Mais de 50 a 70% das infecções por CDV são provavelmente subclínicas (GREENE e APPEL, 1998). O nível de mortalidade é

maior em cães jovens do que em cães adultos (KRAKOWKA e KOESTNER, 1976; ADELUS-NEVEU et al., 1991). O CDV frequentemente contribui para o complexo das doenças respiratórias caninas (“tosse dos canis”) (FORD e VADEM, 1998; DAMIÁN et al., 2005).

O período de incubação da doença causada pelo CDV pode ser de uma a quatro semanas ou mais. Nos casos de resposta imune tardia à infecção com CDV, sinais neurológicos podem aparecer sem sintomas sistêmicos prévios (GREENE e APPEL, 1998). A primeira febre pode passar despercebida (três a seis dias p.i.). O segundo pico febril ocorre vários dias mais tarde, normalmente associado a descargas nasais, conjuntivite e anorexia. Leucopenia, especialmente linfopenia, e trombocitopenia estão sempre presentes no início da infecção (AXTHELM e KRAKOWKA, 1987). Sinais respiratórios e gastrointestinais podem aparecer, frequentemente acompanhados de infecções secundárias. Pústulas na pele e queratoconjuntivite também são achados freqüentes (CORNWELL et al., 1965; APPEL, 1987; GREENE e APPEL, 1998).

Alguns animais desenvolvem sinais nervosos, frequentemente associados à infecção sistêmica ou subsequente a esta. Os sinais nervosos podem ainda seguir uma infecção sistêmica subclínica. Dependendo da amostra viral, os sinais podem estar relacionados com a infecção da massa branca ou da massa cinzenta do cérebro (SUMMERS et al., 1984). Incoordenações e convulsões ocorrem com maior freqüência. Mioclonias, tremores, paresia, nistagmo, sinais meningeais de hiperestesia e rigidez cervical, ou sinais neurológicos envolvendo o nervo óptico e lesões retinianas podem ser notadas (GELATT et al. 1985; APPEL, 1987). Animais com sinais neurológicos usualmente morrem. Porém, alguns se recuperam ocasionalmente apresentando sinais residuais, como mioclonias persistentes em diferentes grupos musculares (APPEL, 1987). Hiperqueratose plantar e nasal e hipoplasia de esmalte dentário em cães em crescimento podem ser observadas ocasionalmente (GREENE e APPEL, 1998).

### **1.1.7 Imunidade em infecções por CDV**

A resposta imune em cães após a infecção com CDV depende da amostra viral e do hospedeiro. Cães que se recuperam no início da infecção respondem com vigorosa reação imune humoral e celular. Anticorpos neutralizantes aparecem dentro de dez a vinte dias p.i. e atingem níveis máximos logo depois (KRAKOWKA et al., 1980; GRIOT-WENK et al., 2001). A resposta citotóxica humoral dependente de

complemento segue um mesmo padrão (APPEL et al, 1987). Ambas IgG e IgM vírus-específicas aparecem no início da infecção, sendo que a IgM vírus-específica só pode ser mensurada entre cinco semanas a três meses p.i. A IgG vírus-específica parece ser mais importante para a imunidade (WINTERS et al., 1984; APPEL et al., 1987; GRIOT-WENK et al., 2001).

A resposta imune mediada por células, que é mensurada por células T citotóxicas vírus-específicas circulantes, aparece em dez a quatorze dias p.i. e atinge o máximo em quatorze a vinte dias p.i. Enquanto a resposta imune humoral persiste por vários anos em cães recuperados, a resposta imune mediada por células é de curta duração (APPEL et al. 1982; HIRAMA et al. 2002).

Cães que sucumbem à cinomose aguda entre duas a quatro semanas p.i., dependendo da amostra viral, têm pouco ou nenhum anticorpo neutralizante em seu soro e a resposta imune mediada por células está ausente. Grandes variações na resposta imune são observadas em cães com cinomose subaguda e cães que sobrevivem com infecção persistente no SNC. Os cães que morrem da doença, normalmente, têm formação tardia de anticorpos neutralizantes e da resposta imune celular (KRAKOWKA, 1982; SIXT et al. 1998).

O líquido cerebrospinal de cães que se recuperam precocemente é normalmente livre de anticorpos contra CDV e IFN. Entretanto, cães que morrem de cinomose aguda ou persistentemente infectados apresentam anticorpos neutralizantes e IFN no SNC. Além disso, anticorpos neutralizantes séricos podem ser encontrados em alguns cães, mas não todos, com infecção persistente por CDV (TSAI et al., 1982; APPEL et al., 1984a; SIXT et al. 1998).

Imunidade de longa duração pode ser induzida com vacinas de CDV vivo atenuado, enquanto que a imunidade induzida por vacinas com CDV inativado é de curta duração (SHEK et al., 1980; NORRBY et al., 1986). O líquido cerebrospinal permanece livre de anticorpos neutralizantes e IFN em cães vacinados (APPEL et al, 1987).

### **1.1.8 Diagnóstico**

O diagnóstico de cinomose nas suas formas aguda ou subaguda deve levar em consideração a história e os sinais clínicos. Uma combinação de febre, sinais respiratórios, corrimentos oculonasais mucopurulentos, diarreia, hiperqueratose plantar

e sinais neurológicos é altamente indicativo de cinomose, especialmente em cães jovens não vacinados ou cães adultos com histórico de vacinação inadequado. O exame oftalmoscópico pode detectar lesões retinianas e podem estar presentes também, irregularidades na superfície dos dentes, em decorrência da hipoplasia do esmalte. Porém, os testes laboratoriais são importantes para diferenciar de outras moléstias que também acometem os sistemas nervoso, digestivo e respiratório (GREENE, 1984).

A soroneutralização (SN) é um método diagnóstico simples que visa a detecção de anticorpos neutralizantes no soro (GREENE e APPEL, 1998). A imunoperoxidase (IPX) pode ser utilizada na demonstração de IgM anti-CDV, que pode ser um indício de uma infecção recente por CDV, e de IgG. Em animais expostos a CDV de campo, anticorpos IgM podem persistir por mais de três meses. Porém, após a vacinação, cães têm IgM anti-CDV no soro por mais de três semanas, o que pode confundir o diagnóstico. Além disso, os testes sorológicos podem não ser conclusivos no diagnóstico da cinomose aguda, porque os cães infectados podem ainda não ter gerado uma resposta imune detectável. De qualquer modo, são métodos importantes para a determinação da prevalência de um vírus em uma população (WINTERS et al., 1984; SOMA et al. 2001; JOZWIK et Al. 2004).

O diagnóstico definitivo pode ser firmado pela detecção do CDV nas células epiteliais, por meio de exame de anticorpos fluorescentes, ou por isolamento do vírus (WINTERS, 1984). As técnicas de imunofluorescência podem facilitar o diagnóstico específico de CDV, contudo estes testes requerem equipamento especial, assim como o ensaio imuno-enzimático (ELISA). O ELISA pode ser usado para detectar antígenos virais ou anticorpos no soro e SNC de cães infectados (MESSLING et al., 1999). A demonstração de antígenos de CDV através da técnica de imunohistoquímica é a mais indicada para revelar corpúsculos de inclusão no tecido cerebral para confirmar encefalites por cinomose, porém, são alterações pouco frequentes (JONES et al., 2000). Técnicas de PCR foram desenvolvidas para detectar o CDV em culturas de tecido, secções histológicas e urina, tendo como vantagem a rapidez na obtenção dos resultados, sensibilidade e especificidade, porém têm custos mais elevados que outros métodos e nem sempre estão disponíveis (FRISK et al., 1999; MORITZ et al., 2000; GEBARA et al. 2004).

### **1.1.8.1. Isolamento Viral**

O isolamento viral de CDV virulento tem sido difícil em células de cultura de rotina. A maioria das replicações virais com sucesso ocorre durante o cultivo direto de tecidos-alvo do hospedeiro infectado. Culturas de macrófagos alveolares detectam o vírus em vinte e quatro a quarenta e oito horas. A formação de sincícios é um efeito citopático (ECP) característico do CDV em diversos tipos de cultivos celulares, podendo ser detectado de dois a cinco dias. O crescimento em macrófagos pulmonares ou linfócitos era considerado uma característica essencial de isolados de CDV virulento, porém, algumas amostras de CDV virulento têm sido isoladas em células VERO ou MDCK (APPEL, 1987; GREENE e APPEL, 1998; LEDNICKY et al., 2004).

### **1.1.9 Prevenção**

A erradicação do CDV tem sido buscada através da vacinação. Durante as últimas décadas a incidência de cinomose tem diminuído consideravelmente, podendo ser devida à vacinação regular de cães (JOZWIK e FRYMUS, 2002). Contudo, muitos surtos de cinomose foram documentados, inclusive em animais vacinados (BLIXENKRONE- MØLLER et al., 1993; APPEL et al., 1994; GEMMA et al., 1996; HASS et al., 1997; EK-KOMMONEN et al., 1997; JOZWIK e FRYMUS, 2002). Muitas espécies de carnívoros selvagens são suscetíveis ao CDV e representam uma constante fonte de infecção para cães não devidamente vacinados (APPEL, 1987).

As vacinas de CDV inativadas não são capazes de controlar a doença. Elas induzem uma resposta imune pobre, que pode proteger os cães por muitos meses da doença, mas não contra a infecção com CDV (APPEL et al., 1984b). Em espécies selvagens ou exóticas, a imunização contra cinomose só pode ser realizada com vacinas de CDV inativadas (GREENE e APPEL, 1998). Em raposas cinzentas as vacinas de CDV atenuado são virulentas, sendo que apenas as amostras adaptadas às células de aves não são virulentas. Porém, o início da resposta imune é retardado em relação a vacinas adaptadas em células caninas e nem todas as espécies selvagens ficam imunizadas com as mesmas (HALBROOKS et al., 1981; APPEL, 1987).

As vacinas de vírus vivo modificado (VVM) existentes atualmente para o CDV induzem imunidade efetiva contra cinomose. Geralmente uma única dose de vacina VVM para cinomose imuniza cães que estejam sem anticorpos. A imunidade materna interfere com a imunização dos filhotes (APPEL, 1987). A idade na qual filhotes

tornam-se suscetíveis à cinomose é proporcional ao título de anticorpos de sua mãe e varia de acordo com a transferência dos anticorpos pelo colostro aos filhotes (SWANGO, 1997; GREENE e APPEL, 1998). Aproximadamente 50% dos filhotes são imunizáveis para a cinomose por volta de seis semanas de idade, cerca de 75% por volta de nove semanas de idade e mais de 95% por volta de treze semanas de idade. Devido à idade variável em que os filhotes tornam-se imunizáveis à cinomose e de acordo com histórico de vacinação das mães, é aplicada uma série de vacinações aos filhotes, seguindo esquemas que sejam práticos, mas que maximizem a probabilidade da indução da imunidade. A revacinação anual é recomendável, porque o título de anticorpos poderá declinar até níveis não mais protetores dentro de um ano, em até um terço dos cães jovens. Os títulos perduram por mais tempo após o reforço (SWANGO, 1997; BIAZONO et al. 2001). Com poucas exceções, as vacinas VVM disponíveis hoje são multiplicadas em células de aves ou ovos, como as amostras Onderstepoort (HAIG, 1956) ou Lederle (HAIG, 1956) ou de adaptações em culturas de células caninas com as amostras Rockborn (ROCKBORN, 1960) ou Snyder Hill (CABASSO et al., 1962). Ambos os caminhos de adaptação resultam em vacinas muito efetivas as quais induzem imunidade em cães suscetíveis que ficam protegidos por, no mínimo, um ano e provavelmente por vários anos na maioria dos cães (APPEL e GILLESPIE, 1972; SWANGO, 1997; GORE et al., 2005).

Vacinas com vírus heterólogo podem ser uma alternativa para driblar a interferência de anticorpos maternos. As vacinas de sarampo não são neutralizadas por anticorpos contra CDV. Como as vacinas de CDV inativadas, a vacina contra sarampo induz uma imunidade limitada que protege os cães contra a doença, mas não contra a infecção (APPEL et al., 1984b). A imunidade estimulada pelo vírus do sarampo em filhotes é basicamente do tipo mediada por células, com baixos títulos de anticorpos, proporcionando proteção temporária contra o CDV (SWANGO, 1997).

Vacinas recombinantes baseadas em vetores canaripox e adenovírus, bem como diferentes vacinas de DNA, vem sendo avaliadas (DE VRIES et al., 1988; PARDO et al., 1997; CHERPPILOD et al., 2000; FISHER et al. 2002; FISHER et al., 2003). Alguns autores demonstraram completa proteção em filhotes com estas vacinas (SIXT et al., 1998; FISHER et al., 2003). Normalmente, estas vacinas são muito seguras, pois não causam infecções nos animais vacinados, além de poder provocar uma vigorosa resposta imune celular em recém-nascidos sem interferir com anticorpos maternos (DONELLY et al., 1997; MOCHIZUKI et al., 1999). Contudo, os níveis de anticorpos

neutralizantes e de proteção são geralmente inadequados se estas vacinas não forem aplicadas várias vezes e em altas doses (DE VRIES, 1988; LAYOR et al, 1999).

Além da imunização, o isolamento de cães doentes é importante para o controle da disseminação da cinomose para outros animais. A desinfecção de um ambiente contaminado com CDV pode ser alcançada com detergentes e solventes de gorduras comuns, pois o envelope viral é facilmente solubilizado, inativando o agente (APPEL, 1997).

## **1.2 Vírus Parainfluenza canino**

### **1.2.1 Introdução**

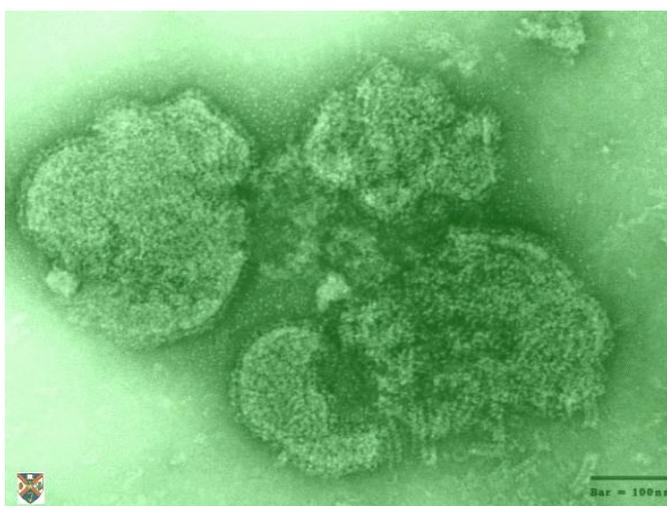
O vírus parainfluenza canino (CPIV) é um de vários patógenos envolvidos no quadro denominado “tosse dos canis”, uma importante enfermidade dos cães (BINN et al., 1967; ROSEMBRG et al., 1971; WAGNER et al.,1984). A infecção natural pelo CPIV produz uma traqueobronquite aguda auto-limitante (WAGNER et al., 1983). Contudo, este vírus pode atuar sinergicamente com CDV, *Bordetella bronchiseptica*, entre outros agentes, afetando primariamente as vias aéreas, podendo ocasionar doença sistêmica (EVERMAN et al., 1980; FORD & VADEM, 1998; DAMIÁN et al., 2005). O CPIV também já foi descrito como causa de encefalite em cães (EVERMAN et al., 1981; BAUMGÄRTNER et al.,1981). Encontra-se distribuído mundialmente e atinge uma ampla variedade de hospedeiros incluindo vários roedores, sendo altamente contagioso entre cães (BINN & LAZAR, 1970; HSIUNG, 1972; ANDREWES et al., 1989). A doença pode ser controlada por vacinas de vírus vivo atenuado (SWANGO, 1997; EDIMBORO et al., 2004).

### **1.2.2 Descrição do agente**

O vírus parainfluenza canino (CPIV) pertence à família *Paramyxoviridae*, classificado presentemente como do gênero *Paramyxovirus* (KINGSBURY, 1973; SWANGO, 1997; BÜCHEN-OSMOND, 2003), (Figura 3). Os vírions pertencentes à família *Paramyxoviridae* possuem a mesma morfologia (APPEL e SUMMERS, 1995; BÜCHEN-OSMOND, 2003). O genoma do CPIV codifica oito proteínas virais

denominadas nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína V, proteína matriz (M), proteína de fusão (F), pequena proteína hidrofóbica (SH), hemaglutinina-neuraminidase (HN) e grande proteína (L). As proteínas HN e F são glicosiladas e formam espículas que projetam-se através do envelope viral. A proteína M está localizada na superfície interna do envelope viral e a NP, P, L e V estão associadas ao RNA genômico para formar um complexo ribonucleoprotéico chamado de nucleocapsídeo (BUETTI e CHOPPIN, 1977; ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). As proteínas HN e F estão envolvidas na indução de imunidade, sendo que a HN é responsável pela adesão e liberação do vírion e F pela penetração e disseminação do vírus célula a célula (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). As funções das proteínas L e SH não são bem conhecidas (COLLINS et al. 1996). As proteínas NP, P, L e, provavelmente, V estão envolvidas na transcrição e replicação viral (SOUTHERN et al. 1990; BÜCHEN-OSMOND, 2003). Este vírus é relativamente lábil, não sobrevive por muito tempo no ambiente e é facilmente inativado por desinfetantes químicos (SWANGO, 1997).

O CPIV é antígenicamente similar ao vírus parainfluenza símio (SV5), ao parainfluenza humano tipo 2 e aos parainfluenza bovino, ovino, suíno e felino (AIJIKI et al., 1982; RANDALL et al., 1987).



**Figura 3:** Foto de um paramixovírus ao microscópio eletrônico. (aumento de x 250000; obtida de McNulty, S. Veterinary Sciences, Queen's University, Belfast).

### 1.2.2.1 Multiplicação Viral

Como visto anteriormente, os mecanismos de replicação dos membros da família *Paramyxoviridae* são similares (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003). Tanto a replicação viral como a multiplicação *in vitro* do CPIV seguem os mesmos princípios descritos anteriormente (capítulo 1.1.2.1) para o CDV, exceto pela presença de ácido neuramínico em receptores de membrana nos membros do gênero *Paramixovirus* e não no gênero *Morbillivirus* (ANDREWES et al., 1989; BÜCHEN-OSMOND, 2003).

### 1.2.3 Epidemiologia

O CPIV foi primeiramente isolado de cães com doença respiratória em 1967 (BINN et al., 1967). O vírus encontra-se amplamente distribuído geograficamente, atingindo uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo roedores (BINN e LAZAR, 1970; ADREWES et al., 1989; COLLINS et al. 1996). Gatos e furões são suscetíveis à infecção experimental com CPIV (SAONA-BLACK e LEE, 1970; DURCHEFELD et al., 1991). Este vírus é altamente contagioso entre cães (BINN e LAZAR, 1970; HSIUNG, 1972). Estudos soroepidemiológicos revelaram alta prevalência de anticorpos contra CPIV na população canina, por volta de 30 a 70 % (BIBRACK e BENARY, 1975; THOMPSON et al. 1975; BAUMGÄRTNER, 1985). Infecções pelo CPIV, sem associações com outros agentes, são geralmente inaparentes e a morbidade varia de 10 a 50 %, sendo a mortalidade rara (SWANGO, 1997). Em todo o mundo, assim como no Brasil, existem poucas informações disponíveis sobre prevalência de infecções virais em felinos silvestres ou praticamente inexistem como no caso do CPIV (CATROXO et al, 2004; BATISTA et al., 2005).

### 1.2.4 Transmissão

O CPIV é extremamente infeccioso, sendo transmitido por aerossóis ou contato direto entre animais, porém, não persiste por muito tempo no ambiente (COLLINS et al. 1996; SWANGO, 1997). O vírus geralmente causa infecção limitada ao trato respiratório, porém, podem ocorrer doença sistêmica e encefalite (BINN, 1970; EVERMAN et al., 1980; MACARTNAY et al, 1985; SWANGO, 1997).

A síndrome “tosse dos canis”, onde o CPIV geralmente é um dos vários patógenos envolvidos, ocorre mais frequentemente em cães que vivem em grupos, como canis, centros de recolhimento de animais de rua e hospitais veterinários (APPEL e BINN, 1987; UELAND, 1990). A infecção pelo CPIV ocorre mais frequentemente na segunda semana após a entrada de cães novos em um canil, podendo predispor o epitélio respiratório à entrada de outros agentes (ERLES et al., 2004).

Randall et al. (1987), revelaram pequenas diferenças antigênicas, usando anticorpos monoclonais, entre isolados de parainfluenza canino, humano e símio. Entretanto, ainda não está claro se estas diferenças são suficientes para restringir a transmissão do vírus entre as espécies ou se o vírus pode atravessar barreiras entre espécies (DURCHEFELD et al., 1991).

### **1.2.5 Patogenia**

O CPIV causa infecção do trato respiratório, replicando-se tanto nas vias aéreas superiores como inferiores e são expelidos nas secreções respiratórias, propagando a infecção. O CPIV tem maior afinidade pelos macrófagos alveolares, causando pneumonia intersticial. A infecção natural com CPIV em cães em geral é auto-limitante e restrita ao trato respiratório (SWANGO, 1997; LÓPEZ, 2001). Contudo, o CPIV já foi isolado de outros órgãos, como intestino, baço, fígado, cérebro e fluido cérebro-spinal de cães, podendo causar doença sistêmica e encefalite (BINN, 1970; EVERMAN et al., 1980; MACARTNAY et al, 1985). Uma amostra neurotrópica de CPIV, denominada CPI+, já foi isolada do fluido cerebrospinal de um cão com paralisia posterior temporária (EVERMANN et al. 1981; BAUMGÄRTNER et al. 1981). Infecções intracerebrais de cães gnotobióticos com este mesmo isolado de CPIV, resultaram em encefalite aguda com necrose cortical laminar e aparecimento de antígenos virais em célula endodimais e neurônios (BAUMGÄRTNER et al., 1982). Análises mais detalhadas a respeito da patogenia da infecção por CPIV não estão disponíveis (COLLINS et al. 1996; LÓPEZ, 2001).

### **1.2.6 Manifestações clínicas de infecções por CPIV**

Em cães, o CPIV produz uma traqueobronquite aguda auto-limitante com mínimos sinais clínicos e alterações histológicas. Sinais clínicos e lesões mais aparentes

ocorrem com infecções concomitantes com outros patógenos, resultando na síndrome clínica denominada “tosse dos canis” (WAGNER et al., 1983; BAUMGÄRTNER, 1985; APPEL e BINN, 1987; FORD e VADEM 1998). A principal manifestação da infecção é a tosse paroxística de frequência e intensidade variáveis. A febre também é variável. A tosse resulta da irritação traqueobrônquico-bronquiolar do trato respiratório (SWANGO, 1997; FORD e VADEM 1998, LÓPEZ 2001). Geralmente os cães recuperam-se da traqueobronquite induzida pelo vírus dentro de três a sete dias após o surgimento dos sinais clínicos. A tosse pode ser induzida pela palpação ou manipulação da traquéia por período de tempo mais prolongado. Experimentalmente, tem sido difícil a reprodução da moléstia respiratória com o vírus CPIV (SWANGO, 1997).

Como visto anteriormente, o CPIV tem manifestado-se como uma infecção geralmente restrita ao trato respiratório. Porém, em 1978, um agente viral foi isolado do fluido cerebrospinal de um cão com disfunção neurológica (EVERMANN et al. 1980; BAUMGÄRTNER et al. 1982). Este isolado (78-238), foi caracterizado através de suas propriedades biológicas como um parainfluenza canino (BAUMGÄRTNER et al. 1981). Além disso, o vírus já foi isolado de outros órgãos, além do sistema respiratório, causando doença sistêmica (BINN, 1970; EVERMAN et al., 1980; MACARTNAY et al, 1985).

### **1.2.7 Imunidade em infecções por CPIV**

Nas infecções por CPIV, em sua maioria, os animais recuperam-se espontaneamente dentro de três a sete dias após o início dos sinais clínicos. A recuperação corresponde ao desenvolvimento da imunidade à infecção viral. A resposta imune faz com que a multiplicação viral fique sob controle, ocorrendo após a eliminação viral (SWANGO, 1997). A proteção imunológica do trato respiratório contra a infecção depende da presença de anticorpos nas secreções respiratórias. Anticorpos da classe IgG estão presentes em secreções do trato respiratório inferior, em concentração proporcional ao título de anticorpos humorais. Mecanismos específicos para transportar a IgG do soro para o lúmen do trato respiratório inexistem. O transporte ocorre por transudação inespecífica, dirigida por altos títulos no soro. Uma quantidade mínima de anticorpos está presente em secreções do trato respiratório superior, a menos que tenha ocorrido infecção e estimulação dos anticorpos secretores da classe IgA (S-IgA) (COLLINS et al. 1996; SWANGO, 1997). Em situações naturais, a IgA tem a vantagem

de ser transportada especificamente através do epitélio da superfície do lúmen, bem como ser capaz de neutralizar o vírus dentro das células epiteliais (RENEGAR e SMALL, 1991; MAZANEC et al., 1992). A recuperação da infecção confere imunidade de longa duração. Células de memória efetuam a resposta anamnésica à exposição e reinfeção, que estende a duração da imunidade (SWANGO, 1997).

### **1.2.8 Diagnóstico**

Devido ao fato que os vários agentes associados a doenças respiratórias em cães podem causar sinais similares, não é possível firmar diagnóstico etiológico com base apenas no exame clínico. Além disso, no caso de infecção pelo CPIV, geralmente não ocorrem alterações clinico-patológicas consistentes que permitam o estabelecimento definitivo da causa (SWANGO, 1997). Assim, o diagnóstico etiológico depende da identificação do vírus nos animais enfermos, seja por isolamento do vírus a partir de espécimes apropriados retirados do trato respiratório, seja pela identificação de antígenos virais em secreções do trato respiratório por imunofluorescência ou outros ensaios imuno-enzimáticos, ou ainda, mais modernamente, pela identificação de ácidos nucléicos virais nas secreções e tecidos de animais infectados. Os testes sorológicos podem ainda auxiliar no diagnóstico pela demonstração de títulos ascendentes de anticorpos vírus-específicos em soros pareados. Este último pode ser feito através de testes de fixação do complemento, inibição da hemaglutinação, neutralização e ensaios imuno-enzimáticos pareados (ANDREWES et al., 1989; COLLINS et al., 1996; SWANGO, 1997).

#### **1.2.8.1 Isolamento viral**

O vírus é isolado usualmente em células VERO. O isolamento não fornece usualmente resultados rápidos, sendo necessárias várias passagens ou subcultivos do vírus, antes que as células infectadas manifestem qualquer efeito citopático (ECP) visível. Os tipos de ECP que podem ser observados em células infectadas com CDV de campo podem incluir arredondamento ou fusão de células formando sincícios, eventualmente revelando células com inclusões citoplasmáticas eosinofílicas. O ECP, muitas vezes, pode ser leve ou ausente. Os isolados podem ser identificados por testes

de inibição da hemadsorção, inibição da hemaglutinação, neutralização, imunoperoxidase ou fixação do complemento (ANDREWES et al., 1989).

### 1.2.9 Prevenção

A prevenção da doença é buscada através da vacinação. Atualmente apenas vacinas inativadas e vacinas VVM contra CPIV estão disponíveis comercialmente e são de administração intramuscular, subcutânea ou intranasal (VVM). Estas vacinas estão combinadas com outros vírus caninos atenuados e geralmente induzem imunidade que ajuda na prevenção da doença (SWANGO, 1997). Vacinas contra o CPIV existem em combinação com *Bordetella bronchiseptica* e também adenovírus canino, para uso pelas vias intranasal, intramuscular e subcutânea. A vacina contra o CPIV de administração intranasal, induz imunidade mais efetiva que a vacina VVM administrada por via intramuscular ou subcutânea (KONTOR et al., 1981; SWANGO, 1997; EDIMBORO et al., 2004). As vacinas de uso intranasal produzem uma proteção rápida e localizada (estimulação de IgA na mucosa) e a imunidade protetora pode ser alcançada dentro de quatro dias, após uma segunda dose (KONTOR et al., 1981; BEY et al., 1981). Quando a “tosse dos canis” endêmica torna-se seriamente problemática em um canil, é recomendado o uso de vacinas intranasais em filhotes de até três a quatro semanas de idade. Geralmente as vacinas de uso intramuscular e subcutâneo contra CPIV são administradas em combinação com outros vírus caninos (polivalentes), sendo recomendadas em filhotes a partir de seis semanas de idade, três doses com intervalos de vinte e um a trinta dias, mais um reforço anual (SWANGO, 1997).

Além da vacinação, a prevenção da infecção por CPIV inclui quarentena dos animais antes de introduzi-los em um grupo, isolamento de animais doentes, adequada sanidade e ventilação do ambiente (FORD e VADEN, 1990).

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivos:

- avaliar a ocorrência de infecções por CDV e CPIV em duas populações de cães de rua mantidos em centros de recolhimento de animais dos municípios de Novo Hamburgo e de Porto Alegre, RS, através da pesquisa de anticorpos neutralizantes nos soros destes animais.

- avaliar a ocorrência de infecções por CDV e CPIV em seis espécies de felinos silvestres brasileiros, de diferentes regiões do Brasil, mantidos em cativeiro, através da pesquisa de anticorpos neutralizantes nos soros destes animais.

## **Capítulo 1**

### **Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e parainfluenza em cães.**

Neutralizing antibodies to distemper and parainfluenza viruses in dogs.

#### **Autores:**

Tamahine Larronda Schmidt Hartmann, Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista,  
Diógenes Dezen, Fernando Rosado Spilki, Ana Cláudia Franco,  
Paulo Michel Roche

## **Resumo**

No presente estudo, foi realizada uma enquete sorológica para determinar a presença de anticorpos neutralizantes contra os **vírus da cinomose** (CDV) e **parainfluenza** caninos (CPIV) em soros de duas populações de cães de rua dos municípios de Novo Hamburgo e de Porto Alegre, RS. Foram coletados soros de 173 cães de rua (82 soros de Novo Hamburgo e 91 soros de Porto Alegre) mantidos em canis municipais destas regiões. A prevalência de anticorpos neutralizantes, determinada através da técnica de soroneutralização frente às amostras de CDV Rockborn e Snyder Hill foi de 9,3 % e 4,1 %, respectivamente. Contra a amostra de CPIV V660, a prevalência de anticorpos neutralizantes encontrada foi de 51,4 %. Estes resultados indicam que o CDV aparentemente não circula ou tem circulação limitada na população amostrada, sugerindo susceptibilidade à eventuais infecções por este vírus. Já o CPIV parece circular amplamente nestas populações.

**Palavras-chave:** **cinomose; parainfluenza canino; cães; soroneutralização; prevalência.**

**Abstract**

In this study a serological survey was carried out to determine the prevalence of antibodies to canine **distemper virus** (CDV) and canine **parainfluenza virus** (CPIV) in sera from stray dogs from the cities of Novo Hamburgo and Porto Alegre, RS, Brazil. Samples were taken from 173 stray dogs (82 samples from Novo Hamburgo and 91 samples from Porto Alegre) kept in municipal kennels. Prevalence of neutralizing antibodies against two strains of canine distemper virus (Rockborn and Snyder Hill) and one strain of CPIV (V660) was evaluated. Neutralizing antibodies to CDV Rockborn were detected in 9.3 % of the samples, whereas 4.1 % of those had neutralizing antibodies to CDV Snyder Hill. Neutralizing antibodies to CPIV V2660 were detected in 51.4 % of samples. The rather limited frequency distribution of antibodies to CDV suggest that the sampled populations could be largely susceptible to this virus. On the other hand, CPIV seems to circulate widely within the stray dogs populations evaluated.

**Key words:** canine distemper virus; canine parainfluenza virus; dogs; sero neutralization; prevalence

## Introdução

O vírus da cinomose canina (“canine distemper virus”, ou CDV) pertence ao gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* (APPEL & SUMMERS, 1999). O CDV está distribuído mundialmente, sendo um dos mais importantes agentes infecciosos dentro das populações caninas, tanto não-imunizadas quanto imunizadas (GOUVEIA et al., 1987; BLIXENKRONE-MØLLER et al., 1993; GEMMA et al., 1996; EK-KOMMONEN et al., 1997). O CDV causa uma doença sistêmica disseminando-se por todo o organismo do hospedeiro através de células linfóides, podendo infectar o sistema nervoso central e, ocasionalmente, produzindo uma encefalite aguda ou crônica desmielinizante (SUMMERS & APPEL, 1994). Sinais respiratórios, digestivos e neurológicos podem, isoladamente ou em associação, ser encontrados em várias outras doenças infecciosas, dificultando o diagnóstico clínico de cinomose (TIPOLD, 1995). A encefalite causada pelo CDV já foi identificada em várias espécies, incluindo membros das famílias *Canidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Felidae* e muitos outros carnívoros (APPEL, 1987; TIMONEY et al., 1992; APPEL et al., 1994).

Outro importante agente que acomete a população canina é o vírus parainfluenza. O vírus parainfluenza canino (CPIV) pertence ao gênero *Paramyxovirus* da família *Paramyxoviridae* (SOUTHERN et al., 1991). O CPIV é um de vários patógenos envolvidos no quadro denominado “tosse dos canis”, uma síndrome que ocorre com maior frequência em cães que vivem em grupos, clinicamente caracterizada por uma traqueobronquite aguda auto-limitante (WAGNER et al., 1984; APPEL & BINN, 1987). O CPIV tem uma ampla variedade de hospedeiros, incluindo vários roedores (HSIUNG, 1972), sendo altamente contagioso entre cães (BINN & LAZAR, 1970), usualmente incidindo nas populações

caninas com prevalências reportadas entre 30 % e 70 % (THOMPSON et al., 1975; BAUMGÄRTNER, 1985). CDV e CPIV podem estar associados e causar doenças respiratórias caninas (FORD & VADEM, 1998; DAMIÁN et al., 2005). Em nosso meio são escassas as informações sobre prevalência de infecções pelo CDV (HEADLEY & GRAÇA, 2000). Menos abundantes ainda são as informações sobre infecções pelo CPIV (GOUVEIA et al., 1987). O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV em cães de rua mantidos em canis municipais dos municípios de Novo Hamburgo e de Porto Alegre, RS. Para tanto, os soros dos animais foram testados em provas de soroneutralização frente a duas amostras vacinais de CDV e frente a uma amostra de CPIV.

## **Materiais e métodos**

### **Células**

Células da linhagem VERO (ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (E-MEM) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB; Nutricell) e 0,1 mL/L de enrofloxacina a 10 % (Baytril). As células foram multiplicadas segundo procedimentos usuais, em intervalos de dois a cinco dias (BUTLER e DAWSON, 1992).

### **Soros**

Foram coletadas amostras de soro de 173 cães sem raça definida (SRD) de diferentes faixas etárias e com histórico de vacinação desconhecido. Destas, 82 (47,4 %) amostras eram de cães provenientes do Canil Municipal de Novo Hamburgo (RS). Outras 91 (52,6 %) amostras foram coletadas de cães pertencentes a canis da região metropolitana de Porto Alegre (RS).

## Amostras de Vírus

As amostras de vírus utilizadas neste trabalho foram amostras de CDV denominadas Rockborn (ROCKBORN, 1958; CORNWELL & THOMPSON, 1982) e Snyder Hill (TIZARD, 1990). Ambas foram multiplicadas em células VERO, de acordo com procedimentos usuais. Os títulos infecciosos dos estoques preparados situavam-se em torno de  $10^{5,5}$  doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares ( $DICC_{50}$ ). A amostra de CPIV V660 (RIJSEWIJK et al., 1998) foi igualmente multiplicada em células VERO. O estoque de vírus assim produzido atingiu títulos de aproximadamente  $10^{4,5}$   $DICC_{50}$ .

## Soroneutralização (SN)

As amostras de soros de cães foram testadas pela técnica de soroneutralização (SN) frente às amostras de CDV Rockborn e Snyder Hill e a amostra de CPIV V660. Brevemente, cada soro diluído (1:4 a 1:128) em E-MEM e colocado em microplacas de cultivo celular, foi misturado com 100  $DICC_{50}$  de cada um dos vírus em estudo. Após incubação por 1 hora em estufa a 37 °C, foi adicionada uma suspensão de células VERO ( $10^{5,8}$  a  $10^6$  células/mL) e incubados novamente a 37 °C. As células foram observadas por até 7 dias em busca do ECP característico (CDV) ou coradas por imunoperoxidase (CPIV), como descrito previamente (KRAMPS et al. 1994), exceto que o anticorpo primário utilizado foi um soro canino policlonal anti-CPIV e o anticorpo secundário utilizado foi um conjugado peroxidase/anti-IgG canina (Serotec). Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de inibir completamente o ECP (CDV) ou inibir a coloração associada à presença do vírus nas células (CPIV).

Soros com títulos de anticorpos neutralizantes  $\geq 4$  foram considerados positivos.

## Resultados

Dos 173 soros caninos titulados por SN para CDV, a maioria apresentou-se negativo frente às duas amostras de CDV testadas, sendo 157 (90,7 %) negativos para CDV Rockborn e 166 (95,9%) negativos para CDV Snyder Hill (Fig.1). Dos 173 cães apenas 20 cães (16,7%) apresentaram anticorpos neutralizantes contra CDV sendo que apenas três cães (2,5 %) apresentaram anticorpos neutralizantes contra as duas amostras de CDV testadas (Fig.2).

Frente ao CPIV, dos 173 soros caninos testados, 84 (48,6 %) apresentaram-se negativos para a amostra V660, sendo 89 (51,4 %) positivos (Fig. 3).

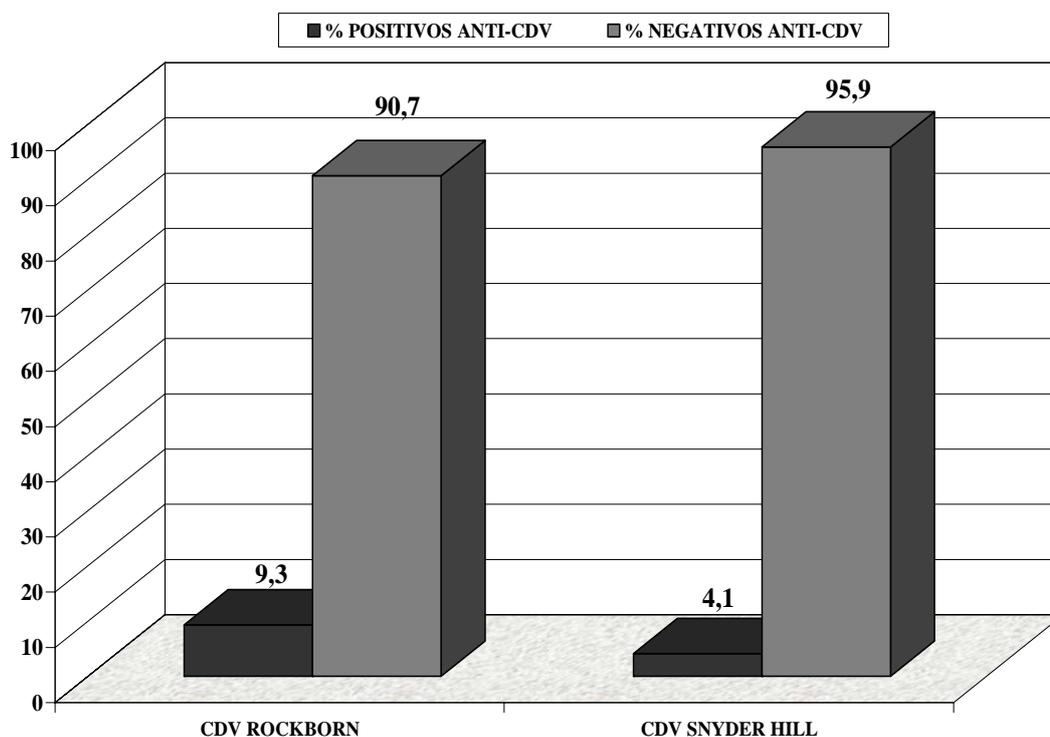


Figura 1 - Resultados dos testes de soroneutralização (SN) frente ao vírus da cinomose (CDV; amostras Rockborn e Snyder Hill). n= 173

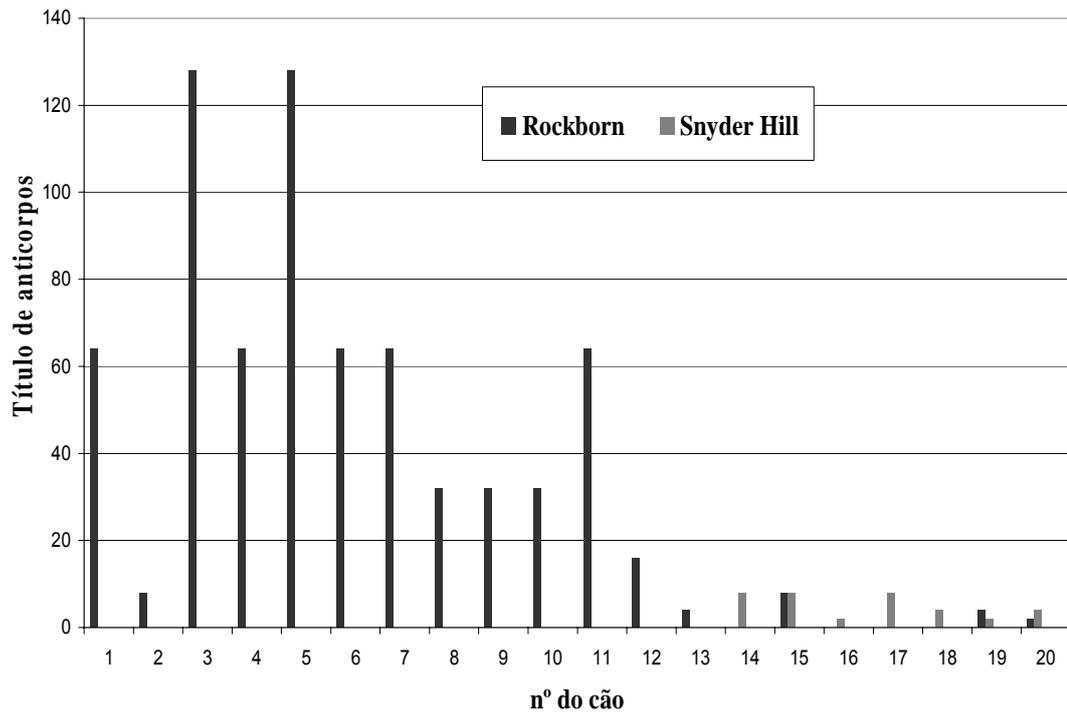


Figura 2: Títulos de anticorpos neutralizantes contra as amostras Rockborn e Snyder Hill do vírus da cinomose (CDV) em cães soropositivos (n= 20).

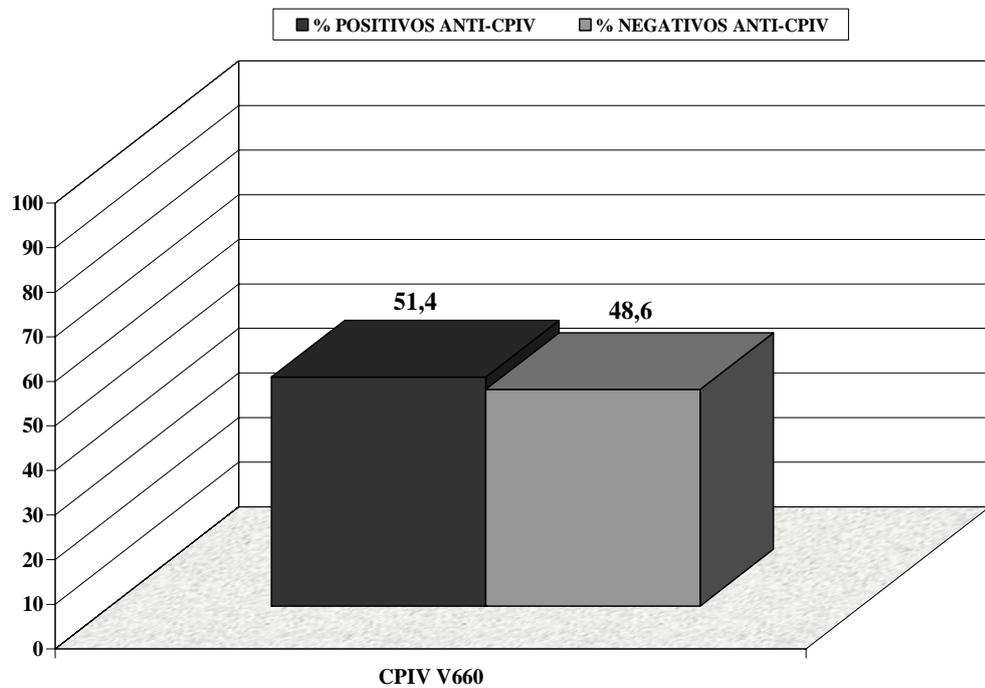


Figura 3: Resultados dos testes de soroneutralização (SN) frente ao vírus parainfluenza canino (CPIV; amostra V660). n= 173

## Discussão

A tomada de amostras em populações de cães de rua, constituída essencialmente por cães não vacinados, pode servir como um indicativo da evolução da infecção em ambiente urbano (MURPHY et al., 1999). No presente estudo, os elevados títulos de anticorpos detectados em alguns soros contra a amostra de CDV Rockborn sugerem que alguns cães provavelmente foram vacinados (Fig. 2). Entretanto, estes mesmos soros frente à amostra Snyder Hill apresentaram títulos de anticorpos baixos ou eram negativos para anticorpos neutralizantes, sugerindo que estes cães só estariam protegidos frente a amostras antigenicamente mais parecidas com a amostra Rockborn do que à Snyder Hill. Na verdade, somente dois cães apresentaram títulos de anticorpos considerados protetores frente a uma agressão com CDV virulento ( $\geq 100$ ; APPEL, 1996) e, ainda assim, frente apenas à amostra Rockborn (Fig.2). Apenas 2,46 % (3) dos animais possuíam anticorpos neutralizantes contra as duas amostras de CDV, o que é um indício de pouca reatividade cruzada entre as mesmas. Esta baixa reatividade cruzada pode ser um reflexo de diferenças antigênicas nos epítomos protetores entre amostras de CDV (GEMMA et al., 1996; HAAS et al., 1997), embora as implicações dessas variações na vacinação sejam ainda desconhecidas. Variações na glicosilação da hemaglutinina podem causar significativas diferenças no perfil antigênico do CDV (IWATSUKI et al., 1997). Todavia, vacinas produzidas com amostras para CDV, são tidas como capazes de induzir imunidade protetora nos animais vacinados (CORNWELL & THOMPSON, 1982; GREENE, 1990). Assim, permanece obscuro o significado das diferenças antigênicas aqui detectadas, assim como seus reflexos na suscetibilidade dos animais soropositivos a infecções por CDV.

Por outro lado, um grande número de animais (Fig.1) não apresentou anticorpos neutralizantes contra as amostras utilizadas (90,7 % para Rockborn e 95,9 % para Snyder Hill). Uma vez que a população estudada era formada por cães de rua, isto sugere que a maioria dos cães não havia sido vacinada ou não havia tido contato prévio com o CDV. É possível que a mortalidade associada ao CDV possa ter eliminado os animais que tenham tido contato prévio com o agente, com isso, diminuindo sua transmissão entre a população canina de rua e, conseqüentemente, levando à baixa prevalência detectada. Em um estudo já havia sido reportado resultados similares, onde 81 % de cães com histórico de vacinação desconhecido, eram soronegativos (JÓZWIK et al. 2004). Os resultados encontrados neste estudo deixam claro que a população amostrada não está protegida contra a doença. Portanto, em cães adotados, tal fato pode ser relevante à primeira imunização de filhotes se não estiverem disponíveis dados sobre o histórico de vacinação dos mesmos. É freqüente em nosso meio a recomendação de evitar a vacinação de filhotes de menos de dois meses de idade (APPEL & SUMMERS, 1999), visando evitar a interferência de anticorpos maternos no desenvolvimento de imunidade ativa do filhote. Na população amostrada, esse risco seria negligenciável, uma vez que a maioria dos animais, incluindo cadelas, apresentou-se soronegativa. Dessa forma, a ausência de anticorpos passivamente adquiridos poderia dar origem a populações de cães neonatos totalmente sensíveis ao vírus. Essa exposição nas primeiras semanas de vida poderia levar à morte os animais que tivessem contato com o vírus, levando às altas taxas de soronegatividade aqui detectadas.

Em relação ao CPIV, mais da metade dos cães testados (51,4 %) apresentou-se soropositiva para anticorpos neutralizantes anti-CPIV. Em outros estudos, a prevalência de anticorpos anti-CPIV também tem sido elevada, situando-se entre 30 %

e 70 % (THOMPSON et al., 1975; BAUMGÄRTNER, 1985). O CPIV é facilmente transmissível entre as populações caninas e, além disso, os títulos de anticorpos neutralizantes estão pobremente relacionados com a proteção contra o desafio com o mesmo (BINN & LAZAR, 1970; BAUMGÄRTNER, 1985; ERLES et al., 2004).

No presente estudo, foi possível detectar que o CPIV parece circular entre a população de cães não-vacinados com prevalência muito superior ao CDV. Isto pode ser conseqüente ao fato de que o CDV possa induzir alta mortalidade entre os cães, de certa forma auto-limitando sua disseminação nas populações caninas. Outra possibilidade seria que os cães de rua de fato não tenham contato com o vírus, talvez pela vacinação de grande número de cães domiciliados, o que poderia levar a uma baixa ou insignificante circulação do vírus no ambiente. Estas possibilidades são ambas muito interessantes, pois revelam distintas possibilidades de evolução desta infecção nas regiões amostradas. Ainda existe a possibilidade de que o teste diagnóstico aqui utilizado (SN) não detecte estas amostras circulantes. Claro está que estudos futuros serão necessários para determinar com precisão o comportamento dessa virose em nosso meio. Por outro lado, a ampla disseminação do CPIV entre a população canina sugere que este agente dissemina-se de forma extremamente eficaz entre estes animais. Questionamentos podem ser, portanto, levantados em relação à necessidade de vacinação contra CPIV na região amostrada. Esse tema igualmente permanece como uma interessante questão a ser abordada em estudos futuros.

## **Conclusão**

O baixo índice de soropositividade detectado frente ao CDV sugere que este agente não tem uma circulação significativa entre as populações de cães de rua amostradas. O CPIV apresentou prevalência significativa na população amostrada dos

municípios de Novo Hamburgo e Porto Alegre, indicando que esse agente circula amplamente em populações caninas não domiciliadas.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi apoiado por CNPq e FAPERGS. P.M. Roehle é um pesquisador do CNPq. Agradecemos ao Dr. Frans Rijsewijk (Animal Sciences Group, Lelystad, The Netherlands), pela amostra de CPIV V660 e à Dra. Daisy Heck (veterinária responsável do Canil Municipal de Novo Hamburgo), por facilitar as coletas de soro dos cães.

## Referências Bibliográficas

APPEL, M.J.G. Canine distemper virus. In: APPEL, M.J.G. **Virus Infection of Carnivores**, (ed), 1987, p.133-49.

APPEL, M.J.G. Canine distemper: emerging new problems. **Infectious Diseases Bulletin**, p.1-6, 1996.

APPEL, M.J.G.; BINN, L.N. Canine infectious tracheobronchitis short review: kennel cough. In: APPEL, M.J.G. (ed). **Virus infections of carnivores**. 1 ed., Amsterdam:Elsevier Science Publishers, 1987. p. 201-211.

APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L.E. **Recent advances in canine infectious diseases**. (ed) document nº 0103.1199, (online), Ithaca, NY, 1999. International Veterinary Information Service.

APPEL, M.J.G. et al. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.277-88, 1994.

BAUMGÄRTNER, W.K. Canine parainfluenza virus. In: OLSEN, R.G.; KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, J.R. **Comparative Pathobiology of Viral Diseases**. ed.,1985, v.2, p.77-83.

BINN L.N.; LAZAR, E.C. Viral antibody patterns in laboratory dogs with respiratory disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.697-702, 1970.

BLIXENKRONE-MØELLER, M. et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, 37:163-73, 1993.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell Culture Labfax**. Oxford: Bios Scientific Publisher Limited, 1992. v.1, p.240-241.

CORNWELL, H.J.C.; THOMPSON, H. Vaccination in the dog. **In Practice**, v.5, p.151-158, 1982.

DAMIÁN, M. et al. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v.10, p.1-5, 2005.

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

ERLES, K. et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.10, p.4524-4529, 2004.

FORD, R.B.; VANDEN, S.L. Canine infectious tracheobronchitis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed., Philadelphia: Saunders, 1998. p.33-38.

GEMMA, T. et al. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokio area. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.58, p.547-550, 1996.

GOUVEIA, A.M.G. et al. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.539-45, 1987.

GREENE, C.E. (1990) Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. ed. Philadelphia: Saunders, 1990. p.21-54.

HASS, L. et al. 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.

HISIUNG, G. D. Parainfluenza-5 virus. Infection of man and animals. **Progress in Medical Virology**, v.14, p.241-274, 1972.

IWATSUKI, K. et al. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. **Journal of General Virology**, p.78, p.373-380, 1997.

JÓZWIK, A. et al. Antibody titres against canine distemper virus in vaccinated and unvaccinated dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, p.99-103, 2004.

KRAMPS, J.A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2175-2181, 1994.

MURPHY, S.C. et al. **Veterinary Virology**. 3.ed. California: Academic Press, 1999, 629p.

RIJSEWIJK, F. et al. Report on the study: Validation of CPI-5 challenge. **ID-DLO report 98.014**, 1998.

ROCKBORN, G. Further studies on viraemia and neutralizing antibodies in naturally acquired distemper in dogs. **Archive fur die Gesamte Virusforschung**, v.8, p.500-510, 1958.

SOUTHERN, J.A. et al. Identification of an epitope in the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. **Journal of General Virology**, v.72, p.1551-1557, 1991.

SUMMERS, B.A.; APPEL, M.J.G. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.20, p.525-534, 1994.

TIMONEY, J.F. et al. **Hagan and Brunner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals**. 8 ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1992. 951p.

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, p.304-314, 1995.

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

THOMPSON, H. et al. Contagious respiratory disease in dogs. **Veterinary Bulletin**, v.45, p.479-488, 1975.

WAGNER, J.S. et al. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella Bronchiseptica* in kennel cough. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1862-1866, 1984.

## **Capítulo 2**

### **Ausência de anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e parainfluenza canino em felinos silvestres em cativeiro.**

Absence of neutralizing antibodies to distemper and parainfluenza viruses in captive wild felids.

#### **Autores:**

Tamahine Larronda Schmidt Hartmann; Helena Beatriz de Carvalho Ruthner Batista; Ana Cláudia Franco; Franco Kindlein Vicentini; Cristina Harumi Adania; Paulo Michel Roehle

**Resumo**

O vírus da cinomose canina (CDV) e o vírus parainfluenza canino (CPIV) podem infectar uma ampla variedade de hospedeiros. O CDV foi recentemente detectado como causa de morbidade e mortalidade em grandes felinos na África, América do Norte e Ásia, porém no Brasil não existem relatos disponíveis sobre sua ocorrência em felinos silvestres. Em relação ao CPIV, não existem referências sobre a sua presença em felinos silvestres. No presente estudo, foi realizado um levantamento sorológico em busca de anticorpos neutralizantes contra o CDV e CPIV em soros de 84 felinos silvestres mantidos em cativeiro, de seis diferentes espécies nativas brasileiras (*Leopardus tigrinus*, *Puma concolor*, *Leopardus wiedii*, *Herpailurus yaguarondi*, *Panthera onça*), coletados em diferentes regiões do Brasil. Todas as amostras examinadas foram negativas para anticorpos neutralizantes contra as amostras de CDV e CPIV utilizadas. Estes resultados indicam que o CDV e o CPIV aparentemente não circulam entre as populações de felinos silvestres amostradas.

**Palavras-chave:** cinomose; parainfluenza canino; felinos silvestres; soroneutralização; prevalência.

**Abstract**

Canine distemper virus (CDV) and canine parainfluenza virus (CPIV), are paramyxoviruses with broad host ranges. CDV has recently been detected as a cause of morbidity and mortality in large felids in Africa, North America and Asia. However, no information is available on the occurrence of CDV infections in Brazilian wild felids. Regarding CPIV, no records have been made to date on evidences of infection in wild felids. In this study, a serological survey was carried out aiming to determine the prevalence of antibodies to CDV and CPIV in sera of 84 captive felids of six native species of Brazilian captive wild felids (*Leopardus tigrinus*, *Puma concolor*, *Leopardus wiedii*, *Herpailurus yaguarondi*, *Panthera onca*), from different regions of Brazil. All examined samples were negative for neutralizing antibodies to CDV and CPIV. These results indicate that CDV and CPIV seem not to circulate within the examined populations of wild felids.

**Key words:** canine distemper virus; canine parainfluenza virus; wild felids; sero neutralization; prevalence

## Introdução

O vírus da cinomose canina (CDV) pertence à família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus*, é altamente contagioso, sendo transmitido predominantemente por aerossóis (APPEL & SUMMERS, 1995). Conhecido por causar uma doença potencialmente letal em membros das famílias *Canidae*, *Mustelidae* e *Procionidae*, o CDV foi recentemente detectado como causa de morbidade e mortalidade em membros da família *Felidae*, como leões e tigres (APPEL et al., 1994) e vários outros animais (HARDER & OSTERHAUS, 1997; LEDNICKY et al., 2004). Muitos autores têm reportado a ocorrência de infecções por CDV em grandes felinos, como leões, tigres, leopardos e onças na África e em diferentes zoológicos nos Estados Unidos, causando doença neurológica e muitas vezes fatal (BLYTHE et al., 1983; APPEL et al., 1994; ROELKE-PARKER et al., 1996). Em 1994, uma epidemia causada pelo CDV matou um terço dos leões (*Panthera leo*) do Serengeti, na África (MORELL, 1994; ROELKE-PARKER et al., 1996). Logo em seguida, o CDV foi novamente implicado como causador de mortalidade de grandes felinos em cativeiro na América do Norte (APPEL et al., 1994; HARDER et al., 1996). Em outro estudo, foi revelado que pequenos felinos asiáticos, domésticos e silvestres, eram suscetíveis ao CDV, sendo que a prevalência de anticorpos anti-CDV era variável de acordo com a região e, em alguns casos, com a potencial exposição a cães (IKEDA et al., 2001). Estes surtos de cinomose demonstraram que o vírus circulante em carnívoros não-felinos domésticos e silvestres pode atravessar barreiras entre espécies para hospedeiros felinos (HARDER et al., 1995). Porém, o CDV não é uniformemente letal nas distintas espécies. Ao contrário da situação com leões, gatos domésticos (*Felis sylvestris catus*) podem ser infectados por CDV e apresentar apenas um aumento da temperatura corporal, sendo a patogênese ainda pouco clara (APPEL et al., 1974; HARDER et al., 1995; IKEDA et al., 2001).

O outro agente abordado no presente estudo, o vírus parainfluenza canino (CPIV), pertence ao gênero *Paramyxovirus* da família *Paramyxoviridae* (KINGSBURY, 1973; SOUTHERN et al., 1991). O CPIV atinge uma enorme variedade de hospedeiros, incluindo vários roedores (HSIUNG, 1972), sendo altamente contagioso entre cães (BINN & LAZAR, 1970). Os gatos apresentaram-se suscetíveis em infecção experimental por CPIV (SAONA-BLACK & LEE, 1970). Os principais sinais clínicos causada pelo CPIV são bronquite e pneumonia intersticial (FORD & VADEN, 1998). Nenhuma referência, entretanto, foi encontrada na literatura com relação à ocorrência de CPIV em felinos silvestres.

No Brasil, embora haja apenas oito espécies diferentes de felinos silvestres reconhecidas, são escassas as informações sobre prevalência de infecções virais nestes animais, tanto nos de vida livre como nos que vivem em cativeiro (CATROXO et al, 2004; BATISTA et al., 2005). Da mesma forma, não existem referências disponíveis sobre ocorrência de CDV e CPIV em felinos silvestres brasileiros. O objetivo do presente estudo foi verificar a presença de anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV em soros de seis espécies de felinos silvestres brasileiros mantidos em cativeiro.

## **Materiais e métodos**

### **Células**

Células da linhagem VERO (ATCC CCL-81) foram cultivadas em meio mínimo essencial de Eagle (E-MEM) suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB; Nutricell). As células foram multiplicadas segundo procedimentos usuais, em intervalos de 2 a 5 dias (BUTLER & DAWSON, 1992). Tais células foram utilizadas nos procedimentos de cultivo das amostras de vírus vacinais e testes de soroneutralização.

### **Soros**

Foram coletados soros de 84 felinos silvestres de cativeiro de seis diferentes espécies nativas do Brasil em quatorze diferentes Estados pela Associação Mata Ciliar (AMC, Jundiaí, São Paulo, Brasil). As espécies de felinos silvestres das quais as amostras de soro foram coletadas foram: gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, 6 amostras), onça-parda (*Puma concolor*, 33 amostras), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*, 5 amostras), jaguatirica (*Leopardus pardalis*, 11 amostras), jaguarundi (*Herpailurus yaguarondi*, 7 amostras) e onça-pintada/onça-preta (*Panthera onca*, 22 amostras). Os soros obtidos foram devidamente armazenados, identificados e conservados a -20 °C até o momento da realização dos testes.

### **Amostras de Vírus**

A amostra de CDV utilizada neste trabalho, denominada Rockborn (ROCKBORN, 1958; CORNWELL & THOMPSON, 1982), foi originalmente isolada de casos naturais de CDV e atenuada por inúmeras passagens em células de linhagem de mamíferos (ROCKBORN, 1958; STEWART et al., 1968; HAMBURGER et al., 1991).

A amostra de CDV Rockborn foi multiplicada em células VERO seguindo-se procedimentos usuais. Quando o efeito citopático (ECP) tornava-se evidente em 90 a 100 % do tapete celular (em torno de 3 a 5 dias após a inoculação), os cultivos eram congelados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , descongelados, clarificados por centrifugação e o sobrenadante armazenado. Após 7 a 8 passagens, o título infeccioso obtido situava-se usualmente na faixa de  $10^{5,5}$  doses infectantes para 50 % dos cultivos celulares ( $\text{DICC}_{50}$ ).

A amostra de CPIV V660 foi obtida de um surto de “tosse dos canis” (RIJSEWIJK et al., 1998). A mesma foi inoculada em células VERO e os cultivos incubados por sete dias. Após este período, mesmo sem visualização de ECP, os cultivos eram congelados  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  e processados como a amostra de CDV Rockborn acima. Os estoques de vírus assim produzidos, após seis passagens, atingiram títulos de aproximadamente  $10^{4,5}$   $\text{DICC}_{50}$ .

#### Soroneutralização (SN)

As amostras de soros de felinos silvestres foram testadas pela técnica de soroneutralização (SN) frente à amostra CDV Rockborn e à amostra CPIV V660. Cada soro diluído de 1:16 a 1:2048 em E-MEM (os soros testados em diluições menores que 1:16 foram tóxicos para as células) e colocado em microplacas de cultivo celular, foi misturado com  $100\text{ DICC}_{50}$  de cada um dos vírus em estudo. Após incubados por 1 hora em estufa a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foi adicionada uma suspensão de células VERO ( $10^{5,8}$  a  $10^6$  células/mL) e incubados novamente a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . As células foram observadas por até 7 dias em busca do ECP característico (CDV), ou coradas por imunoperoxidase (CPIV), como descrito previamente (KRAMPS et al. 1994), exceto que o anticorpo primário utilizado foi um soro canino policlonal anti-CPIV, e o anticorpo secundário utilizado foi um conjugado peroxidase/anti-IgG canina (Serotec). Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos como a recíproca da maior diluição do soro capaz de inibir completamente o ECP (CDV) ou inibir a coloração associada à presença do vírus nas células (CPIV). Soros com títulos de anticorpos neutralizantes  $\geq 16$  foram considerados positivos.

## Resultados

Todos as 84 amostras de soros das seis espécies de felinos silvestres (*Leopardus tigrinus*, *Puma concolor*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus pardalis*, *Herpailurus yaguarondi*, *Panthera onça*) apresentaram-se negativas quanto à presença de anticorpos neutralizantes frente à amostra de CDV Rockborn (Tabela1).

Igualmente, os mesmos 84 soros foram tituladas por SN para CPIV. Os mesmos resultados foram encontrados, ou seja, todos apresentaram-se negativos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV em soros de diferentes espécies de felinos silvestres brasileiros mantidos em cativeiro.

Espécies	Número de soros (n)	Títulos de anticorpos neutralizantes	
		CDV	CPIV
<i>Leopardus tigrinus</i>	6	≤ 16*	≤ 16
<i>Puma concolor</i>	33	≤ 16	≤ 16
<i>Leopardus wiedii</i>	22	≤ 16	≤ 16
<i>Leopardus pardalis</i>	11	≤ 16	≤ 16
<i>Herpailurus yaguarondi</i>	7	≤ 16	≤ 16
<i>Panthera onca</i>	5	≤ 16	≤ 16
<b>Total</b>	<b>84</b>		

\*Títulos de anticorpos ≤ 16 foram considerados negativos (vide Material e Métodos).

## Discussão

Os resultados negativos obtidos pela pesquisa de anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV nos soros de felinos silvestres brasileiros examinados no presente estudo indicam que estes vírus aparentemente não circulam nas populações de felinos silvestres aqui estudadas. É possível que tais espécies não sejam suscetíveis a infecções por estes agentes. Entretanto, em função da reportada ocorrência de CDV em felinos silvestres de vida livre ou cativos na África, Ásia e América do Norte (BLYTHE et al., 1983; APPEL et al., 1994; ROELKE-PARKER et al., 1996; IKEDA et al., 2001), assim como relatos indicando a possibilidade de infecção de gatos domésticos com CDV (APPEL et al., 1974; HARDER et al., 1995; IKEDA et al., 2001), havia uma razoável probabilidade de que felinos silvestres brasileiros fossem igualmente susceptíveis a infecção por CDV. Os surtos de cinomose que atingiram leões do Serengeti na África, foram atribuídos a contatos com cães domésticos infectados pelo CDV (CLEAVELAND et al., 2000). Em outro estudo, guaxinins (*Procyon lotor*), foram responsabilizados por epizootias de CDV em carnívoros de cativeiro em zoológicos e reservas animais (SEDGWICK & YOUNG, 1968; APPEL et al., 1974; LEDNICKI et al., 2004). Assim, é provável que a população de felinos de cativeiro amostrada neste estudo seja sensível ao CDV, embora ainda não tenha entrado em contato com o vírus. Provavelmente, isto se deve ao fato de os animais potenciais transmissores destas infecções não circularem nos zoológicos de onde foram coletadas as amostras.

Gatos podem ser infectados experimentalmente por CPIV e cães e roedores podem transmiti-los (SAONA-BLACK & LEE, 1970; HISIUNG, 1972; UELAND, 1990). Assim, embora até o presente não existam relatos de infecções por CPIV em felinos silvestres, não obstante é muito provável que estes animais sejam também suscetíveis ao CPIV, podendo ser infectados com este agente, desde que em contato com transmissores contaminados. Os resultados negativos encontrados neste estudo revelam que tal infecção não ocorreu nas populações amostradas. É importante salientar que estes felinos são de hábitos solitários, de certa forma limitando as possibilidades de transmissão de infecções (LEUTENEGGER et al., 1999; BATISTA et al., 2005). Animais que vivem em grupo, como os leões, podem difundir a infecções virais com maior facilidade em função do contato próximo com outros indivíduos potencialmente contaminados (LEUTENEGGER et al., 1999).

No presente estudo, quanto aos resultados encontrados pela pesquisa de anticorpos neutralizantes anti-CDV e anti-CPIV, não é possível precisar se a

inexistência de evidências de infecção se deu em função da não susceptibilidade destas espécies ao vírus ou em função da inexistência de uma espécie transmissora contaminada. A confirmação da sensibilidade dessas espécies ao vírus implicaria em experimentos envolvendo inoculação experimental de animais silvestres, o que traria outras implicações que fogem ao objetivo do trabalho aqui apresentado. Não obstante, é interessante o fato de que tais felinos mostraram-se soronegativos a este agente.

As enfermidades podem ser fatores decisivos na extinção ou não de determinada espécie (BATISTA et al, 2005). Recentes epizootias virais têm demonstrado que pequenas populações de espécies altamente ameaçadas podem ficar sob risco de extinção quando afetadas (HARDER & OSTERHAUS, 1997). Estudos visando a determinação da ocorrência de infecções em animais silvestres devem ser ampliados a fim de se evitar possíveis perdas, principalmente pelo fato de que muitas espécies se encontram incluídas na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, instituída pelo IBAMA, como é o caso da onça-parda (CATROXO et al., 2004). Desta forma, mesmo com os resultados sorológicos negativos obtidos, mais estudos devem ser realizados a respeito da prevalência destas infecções, assim como das patologias a elas associadas, com mais amostras de soros de felinos silvestres brasileiros de cativeiro e, se possível, de vida livre.

### **Agradecimentos**

Este estudo foi apoiado por CNPq e FAPERGS. P.M. Roehle é um pesquisador do CNPq. Agradecemos ao Dr. Frans Rijsewijk (Animal Sciences Group, Lelystad, The Netherlands) pela amostra de CPIV V660.

## Referências Bibliográficas

APPEL, M.J.G. et al. Canine distemper virus in domestic cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p. 803-806, 1974.

APPEL, M.J.G. et al. 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. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v.44, p.187-191, 1995.

BATISTA, H.B.C.R. et al. Neutralizing antibodies against feline herpesvirus type 1 in captive wild felids of Brazil. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.36, p.447-450, 2005.

BINN L.N., LAZAR, E.C. Viral antibody patterns in laboratory dogs with respiratory disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.697-702, 1970.

BLYTHE, L.L. et al. Chronic encephalomyelitis caused by canine distemper virus in Bengal tiger. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1159-62, 1983.

BUTLER, M.; DAWSON, M. **Cell Culture Labfax (LabFax)**. Oxford: Bios Scientific Publisher Limited, 1992. V.1, p.240-241.

CATROXO et al. Determinação morfológica da associação de coronavírus e astrovírus em fezes de felinos (onça-parda, *Felis concolor*) com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, p.498-501, 2004.

CLEAVELAND, S et al. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v.72, p.217-227, 2000.

CORNWELL, H.J.C.; THOMPSON, H. Vaccination in the dog. **In Practice**, v.5, p.151-158, 1982.

DAMIÁN, M. et al. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v.10, p.1-5, 2005.

HAMBURGER, D. et al. Loss of virulence of canine distemper virus is associated with a structural change recognized by a monoclonal antibody. **Experientia**, v.47, p.842-845, 1991.

HARDER, T.C. et al. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Seringeti's lions. **Vaccine**, v.13, p. 521-523, 1995.

HARDER, T.C. et al. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. **Journal of General Virology**, v.77, p.397-405, 1996.

HARDER, T.C.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, v.5, p120-124, 1997.

HISIUNG, G. D. Parainfluenza-5 virus. Infection of man and animals. **Progress in Medical Virology**, v.14, p.241-274, 1972.

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

KRAMMPS, J.A. et al. A simple, specific, and highly sensitive blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine herpesvirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, p.2175-2181, 1994.

KINGSBURY, D.W. Paramyxovirus replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p.59, p.1-33, 1973.

LEDNICKY, J.A. et al. Genetically distant american canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with some with different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. **Virology Journal**, v.1, p.1-2 ,2004.

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

RIJSEWIJK, F. et al. Report on the study: Validation of CPI-5 challenge. **ID-DLO report 98.014**, 1998.

ROCKBORN, G. Further studies on viraemia and neutralizing antibodies in naturally acquired distemper in dogs. **Archive fur die Gesamte Virusforschung**, v.8, p.500-510, 1958.

ROELKE-PARKER et al. Canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v.379, p.441-445, 1996.

SAONA-BACK, L.; LEE, K.M. Infection of dogs and cats with a canine parainfluenza virus and the application of a conglutination-complement-absorption test on cat serums. **Cornell Veterinary**, v.60, p.120-134, 1970.

SEDGWICK, C.J.; YOUNG, W.A. Distemper outbreak in a zoo. **Modern Veterinary Practice**, v.47, p.39-44, 1968.

SOUTHERN, J.A. et al. Identification of an epitope in the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. **Journal of General Virology**, v.72, p.1551-1557, 1991.

STEWART, D.L. et al. International standard for anti-canine distemper serum. **World Health Organization**, v.39, p.917-924, 1968.

UELAND, K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. **Veterinary Record**, v.126, p.481-483, 1990.

### 3. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES GERAIS

#### **Presença de anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV em soros de cães**

O presente estudo foi desenvolvido visando aprofundar os conhecimentos sobre a prevalência de CDV e CPIV em soros de cães. Isto porque o CDV e o CPIV encontram-se distribuídos mundialmente, sendo importantes agentes infecciosos dentro das populações caninas (GOUVEIA et al., 1996; HEADLEY e GRAÇA, 2000). Além disso, em nosso meio, são escassas as informações sobre prevalência de infecções pelo CDV e, particularmente, pelo CPIV (GOUVEIA et al., 1987; HEADLEY e GRAÇA, 2000). O CDV causa uma doença infecciosa sistêmica que pode ser letal em cães. Este vírus causa grave imunossupressão, que pode facilitar a entrada de outros agentes (SUMMERS e APPEL, 1994). Já o CPIV, produz uma traqueobronquite limitante, com sinais clínicos mais discretos (APPEL e BINN, 1987). Entretanto, doença clinicamente evidente com lesões mais severa, pode ocorrer nas infecções concomitantes com outros patógenos, sendo freqüente o sinergismo com CDV (APPEL e BINN, 1987; FORD e VADEN, 1998). Estes relatos reforçam a importância do conhecimento da prevalência destes dois agentes, nas populações caninas amostradas.

Os animais estudados eram cães de rua, com histórico de vacinação desconhecido, mantidos em centros de recolhimento de animais dos municípios de Porto Alegre e Novo Hamburgo. Os soros dos cães foram testados frente a duas amostras vacinais de CDV e frente a uma amostra de CPIV, através da técnica de soroneutralização. Os resultados revelaram que apenas 16,7 % (20 de 173 cães) dos animais apresentaram anticorpos neutralizantes contra alguma das duas amostras de CDV utilizadas nos testes (Rockborn e Snyder Hill). Também, foi encontrado que apenas 2,46 % (3) dos animais tinham anticorpos neutralizantes contra as duas amostras, o que é um indício de pouca reatividade cruzada entre as mesmas. Esta variabilidade antigênica aqui evidenciada pode ser um reflexo de diferenças antigênicas entre amostras de CDV (GEMMA et al., 1996; HAAS et al., 1997). Segundo alguns autores, vacinas produzidas com amostras de CDV, como Rockborn e Snyder Hill, adequadamente atenuadas, seriam capazes de induzir imunidade protetora nos animais vacinados (CORNWELL e THOMPSON, 1982; GREENE, 1990). Contudo, estudos têm questionado sobre a ocorrência de variantes de CDV que teriam permitido sua expansão para novos hospedeiros e desafiado a proteção por vacinas usuais contra CDV

(BLIXENKRONE-MØELLER et al., 1993; ROELKE-PARKER et al., 1996; HARDER e OSTERHAUS, 1997).

Por outro lado, um grande número de animais, não apresentou anticorpos neutralizantes contra nenhuma das amostras utilizadas. Estes achados, levando-se em conta o método utilizado, indicam que estes cães de rua não foram vacinados ou não tiveram contato prévio com o CDV, talvez devido à alta taxa de mortalidade causada por este vírus, diminuindo sua transmissão entre as populações caninas. JÓZWIK et al. (2004) já haviam encontrado resultados similares em que somente 19 % dos cães com histórico de vacinação desconhecido, possuíam títulos de anticorpos significativos (ou seja,  $\geq 100$ ) contra cinomose, enquanto a maioria (81 %) não apresentou anticorpos detectáveis por SN. Outra possibilidade é que o método diagnóstico utilizado no presente estudo talvez não detecte outros tipos de anticorpos circulantes.

Quanto ao CPIV, mais da metade dos cães testados (51,4%) apresentaram-se positivos quanto à presença de anticorpos neutralizantes para CPIV, corroborando com estudos prévios que evidenciaram altas prevalências de anticorpos contra o CPIV em populações caninas (THOMPSON et al., 1975; BAUMGÄRTNER, 1985). Segundo alguns autores, em estudos sobre vacinação, parece não haver uma correlação entre os títulos de anticorpos neutralizantes e proteção frente a infecções com o CPIV, pois observaram que mesmo após a vacinação as infecções continuaram ocorrendo (PAIUL et al., 2003; ERLES et al., 2004). Este fato pode ser explicado devido à forma de vacinação utilizada. As vacinas de administração intra-muscular ou subcutânea precisam ser capazes de provocar uma resposta imune humoral exacerbada para que anticorpos neutralizantes cheguem à mucosa respiratória, enquanto as vacinas de administração intranasal induzem imunidade mais rápida e localizada (mucosa) através da estimulação de IgA (KONTOR et al., 1981; SWANGO, 1997; EDIMBORO et al., 2004). Baseado nestes estudos pode-se concluir que a presença de anticorpos neutralizantes circulantes evidenciada na maior parte da população estudada, não é um indicativo de que estes animais estejam agora protegidos contra a infecção com o CPIV, mas sim que este vírus encontra-se circulando entre estes grupos.

Este estudo revelou que o CPIV parece circular entre as populações de cães de rua amostradas nos municípios de Novo Hamburgo e Porto Alegre, com maior prevalência que o CDV. Com estes resultados obtidos, fica evidente que mais estudos devem ser realizados a respeito da prevalência destas infecções, para que medidas mais direcionadas de prevenção e controle, possam ser tomadas por profissionais da área.

### **Ausência de anticorpos neutralizantes contra CDV e CPIV em soros de felinos silvestres em cativeiro**

Devido ao CDV e CPIV afetarem uma ampla variedade de hospedeiros, o presente estudo foi desenvolvido visando aprofundar os conhecimentos sobre a prevalência destes vírus em soros de felinos silvestres brasileiros. O CDV foi recentemente detectado como causa de morbidade e mortalidade em grandes felinos na África, América do Norte e Ásia (APPEL et al., 1994; ROELKE-PARKER et al., 1996; IKEDA et al., 2001; LEDNICKY et al., 2004). No Brasil, não existem relatos disponíveis sobre a ocorrência de CDV e CPIV em felinos silvestres. Em relação ao CPIV, não existem referências sobre a sua presença em felinos silvestres, todavia, como gatos podem ser infectados experimentalmente por CPIV (SAONA-BLACK e LEE, 1970), é possível que estes animais possam também ser suscetíveis ao CPIV e, portanto, possam ser infectados com este agente. Entretanto, todas as amostras de soros das seis espécies de felinos silvestres brasileiros, mantidos em cativeiro, testados pela técnica de soroneutralização contra CDV e CPIV, apresentaram-se negativas.

Os resultados encontrados no presente estudo, levando-se em conta o método diagnóstico utilizado, indicam que estes vírus não circulam nas espécies estudadas. Outra possibilidade, é que tais espécies não sejam sensíveis a infecções com estes agentes. Entretanto, como existem relatos da ocorrência de CDV em felinos silvestres de vida livre ou cativos, assim como relatos indicando a possibilidade de infecção de gatos domésticos com CDV, havia uma probabilidade de que felinos silvestres brasileiros fossem, da mesma forma, susceptíveis a infecção por CDV (BLYTHE et al., 1983; APPEL et al., 1994; HARDER et al., 1995; IKEDA et al., 2001). Cães domésticos e guaxinins (*Procyon lotor*), foram responsabilizados por epizootias de CDV em carnívoros de cativeiro em zoológicos e reservas animais (SEDGWICK & YOUNG, 1968; APPEL et al., 1974; CLEVELAND et al., 2000; LEDNICKI et al., 2004). Assim, é possível que a população de felinos de cativeiro amostrada neste estudo ainda não tenha entrado em contato com o CDV, provavelmente devido ao fato de que os animais potenciais transmissores destas infecções não circulem nos zoológicos de onde foram coletadas as amostras. Quanto ao CPIV, da mesma forma não é impossível precisar se a ausência de evidências de infecção se deu em função de que estas espécies não sejam

susceptíveis ao vírus, ou em função da inexistência de uma espécie transmissora contaminada.

Muitas espécies de felinos silvestres, aqui estudadas, encontram-se incluídas na lista oficial de espécies da fauna brasileira ameaçada de extinção, instituída pelo IBAMA, como é o caso da onça-parda (CATROXO et al., 2004). Devido a este fato, mesmo que os resultados sorológicos encontrados no presente estudo tenham revelado que o CDV e o CPIV não circulam na população amostrada, estudos com felinos cativos e, se possível de vida livre, visando à determinação da ocorrência destas e de outras infecções, devem ser ampliados a fim de evitar possíveis perdas.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELUS-NEVAU, F.; SAINT GERAND, A.L.; FAYET, G. canine distemper. Conclusions from an outbreak in France. **Praktizierenden Tierarztliche**, v.72, p.866-871. 1991

AIJIKI ,M.; TAKAMURA, K.; HIRAMATSU, K.; NAKAI, M. SASAKI, N.; KONISHI, S. Isolation and characterization of parainfluenza 5 from a dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.44, p.607-618. 1982

ALEX, P.C.; DHANAPHALAN, P. Distemper encephalitis in dogs: incidence, symptomatology and electroencephalographic findings. **Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v.25, p.127-31. 1994

ANDREWES, C.H.; PEREIRA, H.G.; PORTERFIELD, J.S. **Andrews' Viruses of Vertebrates**. 5.ed. London: Baillière Tindall, 1989. P.95-120.

APPEL, M.J.G. Pathogenesis of canine distemper virus. **American Journal Veterinary Research**, v.30, p.1167-1182, 1968.

APPEL, M.J.G. Canine distemper virus. In: HORZINEK, M., ed: **Virus infections of carnivores I- Virus infections of vertebrates**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, p.133-159. 1987

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

APPEL, M.J.G.; SHEK, W.R.; SUMMERS, B.A. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. **Infection and Immunity**, v.37, p.592-600. 1982

APPEL, M.J.G.; MENDELSON, S.G.; HALL, W.W. Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. **Journal of Virology**, v.51, p.643-649. 1984a

APPEL, M.J.G.; SHEK, W.R.; SHESBERADARAN, H.; NORRBY, E. Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. **Archives of Virology**, v.82, p.73-82. 1984b

APPEL, M.J.G.; BINN, L.N. Canine infectious tracheobronchitis short review: kennel cough. In: APPEL, M.J.G. (ed). **Virus infections of carnivores**. 1 ed., Amsterdam:Elsevier Science Publishers, 1987. P. 201-211.

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 enzootic in lions, tigers and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.277-88, 1994

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

AXTHELM, M.A.; KRAKOWKA, S. canine distemper virus-induced thrombocytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.1269. 1987.

BLIXENKRONE-MØELLER, M. et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, 37:163-73. 1993

BAUMGÄRTNER, W.K. Canine parainfluenza virus. In: OLSEN, R.G.; KRAKOWKA, S.; BLAKESLEE, J.R. (ed). **Comparative Pathobiology of Viral Diseases**. Flórida: CRC press, 1985. V.2, p.77-83.

BAUMGÄRTNER, W.K.; METZLER; A.E., KRAKOWKA, S. In vitro identification an characterization of a virus isolated from a dog with neurological dysfunction. **Infection and Immunity**, v.31, p.1177-1183. 1981

BAUMGÄRTNER, W.K; KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A.; EVERMANN, J. Acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. **Veterinary Pathology**, v.19, p.79-92. 1982

BERNARD, S.L.; SHEN, D.T.; GORHAM, J.R. Antigen requeriments and specificity of enzyme-linked immunoabsorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. **American Journal of Veterinary Research**, v.43, p.2266-2269. 1982

BEY, R.F.; SHADE, F.J.; GOODNOW, R.A.; JOHNSON, R.C. Intranasal vaccination of dogs with live avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correlation with serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against ezperimnetally induced infectious tracheobronchitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.42, p.1130-1132. 1981

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

BIBRACK, B.; BENARY. F. Seroepizootologische utersuchugen über die bedeutung von parainfluenza-2-infektionen beim zwingerhusten in Deutschland. **Zentralblatt fur Veterinärmedizin**, v. 22, p.610-614, 1975.

BINN, L.N. A review of viruses recovered from dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.156, p.1672-1677. 1970

BINN, L.N.; EDDY, G.A.; LAZAR, E.C.; HELMS, J.; MURNANE, T. Viruses recoverd from laboratory dogs with respiratory disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.126, p.140-145. 1967

BINN L.N., LAZAR, E.C. Viral antibody patterns in laboratory dogs with respiratory disease. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.697-702. 1970

BLIXENKRONE-MØELLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ÖRVELL, C.; APPEL, M.; PEDERSEN, I.R.; DIETZ, H.H.; HENRIKSEN, P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, 37:163-73. 1993

BLYTHE, L.L.; SCHMITZ, J.A.; ROELKE, M.; SKINNER, S. Chronic encephalomyelitis caused by canine distemper virus in Bengal tiger. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1159-62. 1983

BÜCHEN-OSMOND, C. Taxonomy and classification of viruses. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A.; YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 8 ed, Washington: ASM Press v.2, p. 1217-1226. 2003

BUETTI, E.; CHOPPIN, P.W. The transcriptase complex of the paramyxovirus SV5. **Virology**, v.82, p.493-508. 1977

CABASSO, V.J.; KISER, K.; STEBBINS, M.R.; COOPER, H.K. Canine distemper vaccine of tissue culture origin. **American Journal of Veterinary Research**, v.23, p.394-402. 1962

CHERPILLOD, P.; TIPOLD, A.; GRIOT-WENK, M. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. **Vaccine**, v.18, p.2927-2936. 2000

COLLINS, P.L.; CHANOK, R.M.; McINTOSH, K., Parainfluenza virus. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOELEY, P.M. **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. P.1205-124

CORNWELL, H.J.C.; CAMPBELL, R.S.F.; VANTSIS, J.T.; PENNY, W. Studies in experimental canine distemper. I. Clinicopathological findings. **Journal of Comparative Pathology**, v.75, p.3-17. 1965

DAMIÁN, M.; MORALES, E.; TRIGO F.J. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v.10, p.1-5. 2005

DE VRIES, P.; UYTDEHAAG, F.C.G.M.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Canine distemper virus (CDV) immunestimulating complexes (ISCOMs) but not measles virus ISCOMs protect dogs against CDV infection. **Journal of General Virology**, v.69, p.2071-2083. 1988

DENZEGRINI, R. **Anticorpos contra o vírus da cinomose, parvovirus e adenovirus canino em cães não-vacinados de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertation - Course of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, 2005. 44p.

DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: JUBB, K.B.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. Academic Press, v.2, p.617-624. 1993

DURCHEFELD, B.; BAUMGÄRTNER, W.; KRAKOWKA, S. Intranasal infection of ferrets (*Mustela putorius furo*) with canine parainfluenza virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.38, p. 504-512. 1991

EDIMBORO, C.H.; WARD, M.P.; GLICKMAN, L.T. A placebo-controlled trial of two intranasal vaccines to prevent tracheobronchitis (kennel cough) in dogs entering a humane shelter. **Preventive Veterinary Medicine**, v.62, p.89-99. 2004

EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Veterinary Record**, v.141, p.380-3. 1997

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

EVERMANN, J.F.; LINCOLN, J.D.; MCKIERNAN, A.J. Isolation of a paramyxovirus from the cerebrospinal fluid of a dog with posterior paresis. **Journal of the American Medical Association**, v.177, p.1132-1134, 1980.

EVERMANN, J.F.; KRAKOWKA, S.; MCKEIRNAN, A.J.; BAUMGÄRTNER, W. Properties of an encephalitogenic canine parainfluenza virus. **Archives of Virology**, v.68, p.165-172, 1981.

FISHER, L.; TRONEL, J.P.; PARDO-DAVID, C. Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. **Vaccine**, v.20, p.3485-3497. 2002

FISHER, L.; TRONEL, J.P.; MINKE, J.; BARZU, S.; BAUDU, P.; AUDONNET, J.C. Vaccination of puppies with a lipid-formulated plasmid vaccine protects against a severe canine distemper virus challenge. **Vaccine**, v.21, p.1099-1102. 2003

FORD, R.B.; VANDEN, S.L. Canine infectious tracheobronchitis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog cat**. 2. ed., Philadelphia: Saunders, p.33-38.1998

FRIEDLANDER, J.M.; SUMMERS, B.A.; APPEL, M.J.G. Persistence of virulent canine distemper virus in lymphoblastoid cell lines. **Archives of Virology**, v.86, p.47-62. 1985

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

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; OLIVEIRA, D.B.; BELONI, S.N.E.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.480-487. 2004

GELATT, K.N.; WHITLEY, R.D.; SAMUELSON, D.A.; GARCIA-SANCHEZ, G. Ocular manifestations of viral diseases in small animals. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.7, p.968-976. 1985

GEMMA, T.; WATARI, T.; AKIYAMA, K.; MIYASHITA, N.; SHIN, Y.S.; IWATSUKI, K.; KAI, C.; MIKAMI, T. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokio area. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.58, p.547-550. 1996

GORE, T.C.; LAKSHMANAN, N.; DUNCAN, K.L.; COYNE, M.J.; LUM, M.A.; STERNER, F.J. Three-year duration of immunity in dogs following vaccination against canine adenovirus type-1, canine parvovirus, and canine distemper virus. **Veterinary Therapeutics**, v.6, p.5-14. 2005

GOULD, D.H.; FENNER, W.R. Paramyxovirus-like nucleocapsids associated with encephalitis in a captive Siberian tiger. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.183, p.1329-22, 1983.

GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, J.T.; RIBEIRO, A.L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.39, p.539-45. 1987

GREENE, C.E. Canine distemper. In: GREENE, C.E.(ed). **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1984. P.286.

GREENE, C.E.; APPEL, M.J.G. Canine distemper. In GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1998. P. 9-22.

GRIOT-WENK, M.E.; CHERPILLOD, P.; KOCH, A.; ZURBRIGGEN, R.; BRUCKNER, L. ; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A. The humoral immune response to recombinant nucleocapsid antigen of canine distemper virus in dogs vaccinated with attenuated distemper virus or DNA encoding the nucleocapsid of wild-type virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p. 295. 2001

HAIG, D.A. Canine distemper – immunization with avianized virus. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.27, p.19-53. 1956

HALBROOKS, R.D.; SWANGO, L.J.; SCHNURRENBERGER, P.R., MICHELL, F.A.; HILL, E.P. Response of gray foxes to modified live-virus canine distemper vaccines. **Journal American of the Veterinary Medical Association**, v.179, p.1170-1174. 1981

HARDER, T.C.; OSTERHAUS, A.D.M.E. Canine distemper virus- a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, v.5, p120-124, 1997.

HASS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAIEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D.; 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.

HIRAMA, K.; TOGASHI, K.; WAKASA, C.; YONEDA, M.; NISHI, T.; ENDO, Y.; MIURA, R.; TSUKIYAMA-KOHARA, K.; KAI, C. Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p. 109-112. 2003

JONES, C.T.; HUNT, D.H.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine**, v.49, p. 413-414. 2004

KAI, C.; OCHIKUBO, F.; OKITA, M.; IINUMA, T.; MIKAMI T.; F. KOBUNE, AND K. YAMANOUCHI. Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v.55, p.1067-1070. 1993

KINGSBURY, D.W. (1973) Paramyxovirus replication. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p.59, p.1-33. 1973

KONTOR, E.J.; WEGRZYN, R.J.; GOODNOW, R.A. Canine infection tracheobronchitis: effects of an intranasal live canine-parainfluenza-*Bordetella bronchiseptica* vaccine on viral shedding and clinical tracheobronchitis (kennel cough). **American Journal of Veterinary Research**, v.42, p.1694-1698. 1981

KRAKOWKA, S. Mechanisms of *in vitro* immunosuppression in canine distemper virus infection. **Journal of Clinical and Laboratory Immunology**, v.8, p.187-196. 1982

KRAKOWKA, S; KOESTNER, A. Age-related susceptibility to canine distemper virus infection in gnotobiotic dogs. **Journal of Infections Diseases**, v.134, p.629-632. 1976

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

LAYOR, R.; PORAKISHVILI, N.; DESOUSA, J.B.; PLAYFAIR, J.H.; DELVES, P.J.; LUND, T. DNA vaccination favors memory rather than effector B cells responses. **Clinical Experimental Immunology**, v.117, p. 106-112. 1999

LEDNICKY, J.A.; DUBACH, J.; KINSEL, M.J.; MEEHAN, T.P.; BOCCHETTA, M.; HUNGERFORD, L.L.; SARICH, N.A.; WITECKI, K. E.; BRAID, M.D.; PEDRAK, C.; HOUDE, C.M. Genetically distant american canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. **Virology Journal**, v.1, p.2-15. 2004

LÓPEZ, A. Respiratory system, thoracic cavity, and pleura. In: MCGIVEN, D.M.; CARTON, W.W.; ZACHARY, J.F. **Thompson's Special Veterinary Pathology**, 3. ed., Mosby, 2001. P.125-195.

MACARTNEY, L.; CORNWELL, H.J.C.; McCANDLISH, I.A.P.; THOMPSON, H. Isolation of a novel paramyxovirus from a dog with enteric disease. The **Veterinary Record**, v.117, p.205-207, 1985

MAMAEV, L.V.; DENIKINA, N.N.; BELIKOV, S.I.; VOLCHKOV, V.E.; VISSER, I.K.G.; FLEMING, M.; KAI, C.; HARDER, T.C.; LIESS, B.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; BARRETT, T. Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca siberica*). **Veterinary Microbiology**, v.44, p.251-259, 1995.

MAZANEC, M.B.; KAETZEL, C.S.; LAMM, M.E.; FLETCHER, D.; NEDRUD, J.G. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.89, p.6901-6905. 1992

MESSLING, von V.; HARDER, T.C.; MOENNING, V.; RAUTEMBERG, 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, p. 1049-1056. 1999

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

MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURU, 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, p.2936-2942. 1999

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

NORRBY, E.; UTTER, G.; ORVELL, C.; APPEL, M.J.G. Protection against canine distemper in dogs after immunization with isolated fusion protein. **Journal of Virology**, v.58, p.536-541. 1986

PARDO, M.C.; BAUMAN, J.E.; MACKOWIAK, M. Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.833-836. 1997

POSTON, R.P.; ENGLAND, J.J. Canine distemper. In: CASTRO, A.C., HEUSCHELE, W.P. **Veterinary Diagnostic Virology – A Practitioner's Guide**. 1992. P.135-138.

RANDALL, R.E.; YOUNG, D.F.; GOSWAMI, K.K.; RUSSEL, W.C. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates. **Journal of General Virology**, v.68, p.2769-2780. 1987

RENEGAR, K.B.; SMALL, P.A. Immunoglobulin A mediation of murine nasal anti-influenza virus immunity. **Journal of Virology**, v.65, p.2146-2148. 1991

RIMA, B.K. The proteins of morbilliviruses. **Journal of General Virology**, v.64, p.1205-1219. 1983

ROCKBORN, G. A preliminary report on efforts to produce a living distemper vaccine in tissue culture. **Journal of Small Animal Practices**, v.1, p.53. 1960

ROSEMBERG, F.J. et al. Studies of canine respiratory viruses. I. Experimental infection of dogs with an SV-5-like canine parainfluenza agent. **American Journal of Epidemiology**, v.94, p.147-165. 1971

SAONA-BACK, L.; LEE, K.M. Infection of dogs and cats with a canine parainfluenza virus and the application of a conglutination-complement-absorption test on cat serums. **Cornell Veterinary**, v.60, p.120-134. 1970

SHAPSHAK, P.; GRAVES, M.C.; IMAGAWA, D.T. Polypeptides of canine distemper virus strains derived from dogs with chronic neurological diseases. **Virology**, v.122, p.158-170. 1982

SHEK, W.R.; SCHULTZ, R.D.; APPEL, M.J.G. Natural and immune cytolysis of canine distemper virus-infected target cells. **Infections and Immunology**, v.28, p.724-734. 1980

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

SOMA, T.; ISHII, H.; HARA, M.; YAMAMOTO, S.; YOSHIDA, T.; KINOSHITA, T.; NOMURA, K. Comparison of immunoperoxidase plaque staining and neutralizing tests for canine distemper virus. **Veterinary Research Communications**, v.25, p.311-325. 2001

SOUTHERN, J.A.; PRECIOUS, B.; RANDALL, R.E. Two nontemplated nucleotide additions are required to generate the P mRNA of parainfluenza type 3 since the RNA genome encodes protein V. **Virology**, v.177, p.388-390. 1990

SUMMERS, B.A.; GREISON, H.A.; APPEL, M.J.G. Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with canine distemper virus. **Lancet**, v.11, p.187-189, 1978.

SUMMERS, B.A.; GREISON, H.A.; APPEL, M.J.G. Does virus persist in the uvea in multiple sclerosis, as in canine distemper encephalomyelitis? **Lancet**, v.1, 372-375, 1983

SUMMERS, B.A.; GREISEN, H.A.; APPEL, M.J.G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology**, v.94, p.65-75. 1984

SUMMERS, B.A.; APPEL, M.J.G. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.20, p.525-534, 1994.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. **Veterinary Neuropathology**. New York: Mosby, 1994. 527p.

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

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W.; BARLOUGH, J.E. **Hagan and Brunner's microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8 ed. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1992. 951p.

THOMPSON, H.; WRIGTH, N.G.; CORNWELL, H.J.C. Contagious respiratory disease in dogs. **Veterinary Bulletin**, v.45, p.479-488. 1975

TSAI, S.C.; SUMMERS, B.A.; APPEL, M.J.G. Interferon in cerebrospinal fluid. A marker for viral persistence in canine distemper encephalomyelitis. **Archives of Virology**, v.72, p.257-265. 1982

UELAND, K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. **Veterinary Record**, v.126, p.481-483. 1990

WAGNER, J.S.; MINNICH, L.; SOBONYA, L.M.; TAUSSIG, C.G.; RAY, C.G.; FULGINITI, V. Parainfluenza type II infection in dog: a model for viral lower respiratory tract infection in humans. **American Review of Respiratory Disease**, v.127, p.771-775. 1983

WAGNER, J.S.; SOBONYA, R.; MINNICH, L.; TAUSSIG, L.M. Role of canine parainfluenza virus and *Bordetella Bronchiseptica* in kennel cough. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, p.1862-1866. 1984

WINTERS, K.A.; MATHES, L.E.; KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.G. Immunoglobulin class response to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.5, p.209-215. 1984