

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

**ACHADOS PATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÃES
INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA**

LUCIANA SONNE

PORTO ALEGRE

2008

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

ACHADOS PATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÃES
INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA

LUCIANA SONNE

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: André Silva Carissimi

Co-orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE

2008

LUCIANA SONNE

**ACHADOS PATOLÓGICOS E IMUNOISTOQUÍMICOS DE CÃES
INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA**

Aprovada em 27 de fevereiro de 2008.

APROVADO POR:

Prof. Dr. André Silva Carissimi
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Claudio Severo Lombardo de Barros
Membro da Comissão

Prof. Dr. Aldo Gava
Membro da Comissão

Prof. Dra. Sandra Davi Traverso
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores Dr. André Silva Carissimi e ao Dr. David Driemeier pela oportunidade de realização deste mestrado. Ao David agradeço também por me propiciar fazer parte de sua equipe e por poder estar aprendendo com os seus conhecimentos.

Aos meus colegas de laboratório pela amizade e pelo aprendizado que vivenciamos juntos. Agradeço ao Eduardo (Dudes), Carol, Dj, Bezerra, Adri, Pedroso, Saulo, Nádia, Mauro, Pri, Dé, Ogro e Paulinho.

Aos estagiários Adri, Eloísa, Ju, Uruguaio, Vacaria, Marcelle, Giovana, Elisa Tesser e Elisa Teixeira.

Ao Dr. Luis Gustavo Corbellini pela ajuda na estatística.

Aos alunos da Biomedicina e da Veterinária por me mostrarem que mais do que ensinar é preciso aprender com os alunos.

As funcionárias Angela Belmonte e Marília Belmonte pelo carinho e pela ajuda na confecção das lâminas histológicas.

Ao Rafa pelo amor e por estar sempre perto nas horas alegres e tristes.

A minha mãe Carmen e ao meu irmão Leandro por estarem sempre ao meu lado, ao meu pai Vitor (*in memorian*) por sempre confiar em mim.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 <i>Paramyxoviridae</i>	12
2.2 Cinomose Canina	13
2.2.1 Histórico	13
2.2.2 Epidemiologia	14
2.2.3 Patogênese	14
2.2.4 Inativação do Vírus	15
2.2.5 Sinais Clínicos	16
2.2.6 Achados Patológicos	17
2.2.7 Tratamento e Prevenção	19
2.2.8 Infecções Secundárias	20
2.2.9 Métodos de Diagnóstico	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Procedimentos Gerais	23
3.2 Necropsias e Análises Histológicas	23
3.3 Imunoistoquímica	24
4. RESULTADOS	26
4.1 Dados Gerais	26
4.2 Resultados Macroscópicos	27
4.3 Resultados Microscópicos	29
4.4 Resultados Imunoistoquímicos	34
4.5 Resultados Bacteriológicos	44
5. DISCUSSÃO	45
6. CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição e frequência por raça de 54 caninos com diagnóstico de cinomose canina necropsiados no Setor de Patologia Veterinária - UFRGS.....	26
Tabela 2 - Achados macroscópicos observados durante a realização do exame externo em caninos infectados pelo vírus da cinomose canina.....	27
Tabela 3 - Achados macroscópicos observados no intestino dos animais com infecção pelo vírus da cinomose canina.	29
Tabela 4 - Avaliação histológica de 29 animais com lesões microscópicas no encéfalo causado pelo vírus da cinomose canina.	30
Tabela 5 - Alterações microscópicas dos órgãos linfóides nos caninos infectados pelo vírus da cinomose canina.	31
Tabela 6 - Resultados do teste imunoistoquímico anti-cinomose canina em diferentes órgãos nos 54 caninos analisados.....	35
Tabela 7 - Análise dos órgãos na imunoistoquímica para cinomose canina dos 51 caninos que obtiveram resultado positivo no teste.....	37
Tabela 8 - Principais lesões microscópicas e marcação imunoistoquímica anti-cinomose canina de 31 cães que apresentavam alterações histológicas e/ou imunoistoquímicas no encéfalo.	41
Tabela 9 - Agentes bacterianos isolados dos pulmões de 16 caninos com infecção bacteriana secundária à infecção pelo vírus da cinomose canina.	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Secreção ocular mucopurulenta em um canino Lhasa Apso, fêmea de 5 meses de idade infectado pelo vírus da cinomose canina.	27
Figura 2 - Hiperqueratose do coxim digital em um canino SRD, fêmea de 3 meses de idade com infecção pelo vírus da cinomose canina.	28
Figura 3 - Pulmão não colabado e de coloração avermelhada de um canino Poodle, macho de 5 meses infectado pelo vírus da cinomose canina com infecção secundária por <i>Bordetella bronchiseptica</i>	28
Figura 4 – Pneumonia intersticial em um canino infectado pelo vírus da cinomose. Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 20.	30
Figura 5 - Estômago de um canino infectado pelo vírus da cinomose canina com corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (no detalhe). Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 40.	32
Figura 6 - Bexiga de um cão, epitélio com degeneração hidrópica e corpúsculos eosinofílicos intracitoplasmáticos característicos de cinomose canina (no detalhe). Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 40.	32
Figura 7 - Cortes histológicos do conduto auditivo externo de caninos infectados pelo vírus da cinomose (coloração de PAS) A. Numerosas estruturas típicas de <i>Malassezia pachydermatis</i> . (obj. 20). B. Estruturas fúngicas compatíveis com <i>Candida</i> sp. (obj. 40).	34
Figura 8 - Marcação positiva do antígeno no epitélio escamoso estratificado do coxim digital (imunistoquímica anti-cinomose canina, obj. 20).	38
Figura 9 - Antígeno viral no epitélio do conduto auditivo de um canino (imunistoquímica anti-cinomose canina, obj. 10).	38
Figura 10 - Corpúsculos de inclusão viral marcados positivamente (em vermelho) na mucosa do estômago de um canino (imunistoquímica anti-cinomose canina, obj. 40).	39
Figura 11 - Antígenos virais no citoplasma de macrófagos alveolares (imunistoquímica anti-cinomose canina, pulmão, obj. 20).	39
Figura 12 - Corpúsculo intranuclear em astrócito com marcação positiva do antígeno (imunistoquímica anti-cinomose canina, cerebelo, obj. 100).	40
Figura 13 – Antígeno viral em neurônios (imunistoquímica anti-cinomose canina, cérebro, obj. 40).	42
Figura 14 - A. Imunistoquímica anti-cinomose canina do cerebelo de um canino (obj. 20). B. Imunistoquímica anti-GFAP na mesma área do cerebelo do canino (obj. 20).	42
Figura 15 - Marcação positiva nos centros foliculares (imunistoquímica anti-cinomose canina, linfonodo mesentérico, obj. 20).	43
Figura 16 - Células ganglionares da retina marcadas positivamente (imunistoquímica anti-cinomose canina, obj. 40).	43

RESUMO

A cinomose canina é uma doença viral e afeta principalmente os sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso. O presente trabalho analisou 54 cães com cinomose de um total de 760 cães necropsiados no período de julho de 2006 a outubro de 2007. As lesões macroscópicas observadas eram caracterizadas por secreção ocular e nasal mucopurulenta, hiperqueratose dos coxins digitais, pulmões de coloração avermelhada e não colabados, atrofia do timo, conteúdo intestinal diarréico e evidência das placas de Peyer. Os achados microscópicos caracterizavam-se principalmente por pneumonia intersticial, rarefação linfóide, desmielinização da substância branca, manguitos perivasculares e corpúsculos de inclusão viral na mucosa do estômago, epitélios da bexiga, brônquios e bronquíolos, pelve renal, coxins digitais, pálpebra e orelha, no sistema nervoso central (principalmente em astrócitos) e em células mononucleares dos linfonodos, baço e tonsilas. O teste de imunistoquímica foi positivo em 94,4% dos casos analisados. Os tecidos foram marcados pela técnica imunistoquímica utilizando o anticorpo monoclonal anti-cinomose canina (VMRD) na diluição de 1:400. O coxim digital se apresentou como o órgão com o maior número de casos marcados positivamente (67,4%), seguido pelo estômago com 62,7%. A utilização da imunistoquímica auxiliou na identificação do antígeno viral em diferentes tecidos e foi importante como diagnóstico complementar da cinomose canina.

Palavras-chave: cinomose canina, cães, imunistoquímica.

ABSTRACT

Canine distemper is a viral disease that affects mainly, respiratory, gastrointestinal and nervous system. The present study analyzed 54 dogs with canine distemper from total of 760 necropsies done in dogs between July 2006 to October 2007. The macroscopic lesion were characterized by mucopurulent oculonasal discharge, hyperkeratosis of footpads, red and not collapsed lungs, thymic atrophy, watery intestinal, hyperemia and Peyer's patches enlarged. The microscopic findings were characterized by interstitial pneumonia, lymphoid depletion, white matter demyelization, perivascular cuffs and viral inclusion bodies located in stomach mucosa, bladder, bronchial, renal pelvis, footpads, eyelid, skin of the ear epithelium, central nervous system (mainly in astrocytes) and mononuclear infiltrates in lymph nodes, spleen, and tonsils. The immunohistochemistry test was positive in 94,4% of analyzed cases. Tissues were stained by an immunohistochemical procedure with mouse monoclonal anti-canine distemper (VMRD) diluted 1:400. The footpads was the best tissue with majority of positive marked cases (67,4%), followed by stomach with 62,7%. This observation suggests that the immunohistochemistry technique aided to identify distemper virus antigens in different tissue making it an important test for complementary diagnostic of canine distemper.

Key words: canine distemper, dogs, immunohistochemistry

1. INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma importante doença viral que afeta diferentes espécies animais e causa lesões, principalmente, no sistema respiratório, gastrintestinal e no sistema nervoso central (APPEL; SUMMERS, 1995). A doença apresenta um padrão de distribuição mundial e causa alta mortalidade em cães e outros carnívoros. Segundo Appel (1969) a taxa de mortalidade de cães infectados pela cinomose é de 50%, após 3 a 4 semanas da exposição viral. Dependendo da espécie afetada e do status imunológico do indivíduo a mortalidade pode exceder 80% (HARDER; OSTERHAUS, 1997).

O vírus tem predileção por células epiteliais, linfóides e o tecido nervoso (ALVES *et al.*, 2006). Embora exista somente um sorotipo do vírus da cinomose canina, uma diversidade de biotipos, que variam na sua patogenicidade e tropismo tecidual, foram descritos. (OKITA *et al.*, 1997, ALVES *et al.*, 2006). Os cães jovens são os mais afetados embora possa ocorrer em todas as idades (JÓZWIK; FRYMUS, 2002). A queda de anticorpos maternos, a não utilização de vacinas e a falha vacinal são responsáveis pelo grande número de casos que ainda são observados (CHAPPUIS, 1995).

O diagnóstico *post mortem* é baseado nas alterações histológicas, caracterizadas principalmente pela visualização de corpúsculos de inclusão viral eosinofílicos intracitoplasmáticos e intranucleares localizados em células epiteliais, linfóides e no sistema nervoso central (SNC). Adicionalmente, técnicas como isolamento viral, imunofluorescência direta, reação de polimerase em cadeia (PCR) e a imunoistoquímica são amplamente utilizadas no diagnóstico complementar (APPEL; SUMMERS, 1999). A imunoistoquímica auxilia no diagnóstico principalmente quando na histologia não há corpúsculos de inclusão ou estes estão em pequeno número bem como quando já existe o processo de autólise.

As doenças virais têm uma grande importância dentre os diagnósticos de cães necropsiados no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS). Entre os anos de 2000 a 2006 foram realizadas 3.659 necropsias de caninos, dos quais em 582 (16%) o diagnóstico foi de doenças virais. Entre as doenças virais a cinomose foi responsável por 39% (227/582) dos diagnósticos. Em vista do grande número de cães necropsiados com cinomose se resolveu estudar melhor a doença. O presente trabalho teve por objetivo analisar os achados macroscópicos,

microscópicos, verificar o melhor método imunistoquímico, a distribuição do antígeno viral em tecidos selecionados por imunistoquímica e os achados bacteriológicos das pneumonias associadas com a cinomose canina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Paramyxoviridae*

Os vírus constituintes da família *Paramyxoviridae* são partículas pleomórficas, com 150 nm de diâmetro, contendo envelope, e um genoma de RNA de fita simples linear com peso molecular de $7,0 \times 10^6$ (ZEE, 2003). O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal de 13 a 18 nm de diâmetro e aparência característica de espinha de peixe (QUINN *et al.*, 2005). A replicação ocorre no citoplasma da célula do hospedeiro (ZEE, 2003). Os vírions são liberados por brotamento através da membrana celular em locais contendo proteínas do envelope viral. Estes vírions lábeis são sensíveis aos solventes lipídicos, calor, dessecação, e desinfetantes (QUINN *et al.*, 2005).

Os Paramixovírus têm uma estreita variedade de hospedeiros, infectando sobretudo aves e mamíferos. Após a transmissão por contato direto ou por aerossóis, onde ocorre a replicação primária no trato respiratório (QUINN *et al.*, 2005). A formação de sincícios e inclusões intracitoplasmáticas são características pela família *Paramyxoviridae* (NISHI *et al.*, 2004; QUINN *et al.*, 2005).

A família *Paramyxoviridae* é classificada em subfamília *Paramyxovirinae* e *Pneumovirinae*. A *Paramyxovirinae* é agrupada em 3 gêneros que são os *Respirovirus* (que compreende o vírus da parainfluenza bovina tipo 3), *Rubulavirus* (vírus da doença de Newcastle, paramixovírus aviário, vírus da parainfluenza canina tipo 2 e Rubulavírus suíno) e o gênero *Morbillivirus* (QUINN *et al.*, 2005). Este último agrupa os seguintes vírus: vírus da peste bovina, vírus da peste dos pequenos ruminantes, *Morbillivirus* de cetáceos, *Morbillivirus* dos equinos, vírus da cinomose das focas e o vírus da cinomose canina (KENNEDY *et al.*, 1992, BARRETT, 1999; BIRKUN *et al.*, 1999, QUINN *et al.*, 2005, DI GUARDO *et al.*, 2005).

2.2 Cinomose Canina

O vírus da cinomose canina pertence ao gênero *Morbillivirus* da Família *Paramyxoviridae*, ocasionando uma doença grave, contagiosa e muitas vezes fatal em caninos (KOUTINAS *et al.*, 2002). Possui variação quanto ao seu tamanho e forma, suas partículas virais são esféricas e medem entre 150 e 300 nm (ZEE, 2003; GREENE; APPEL, 2006). O ácido nucléico viral é um RNA de fita simples linear, e o capsídeo viral é composto por seis polipeptídeos principais. O polipeptídeo H glicosilado é responsável pela adsorção do vírus a sítios receptores das células suscetíveis e o polipeptídeo glicosilado F causa a fusão de células infectadas (BARRETT, 1999; ZEE, 2003). O vírus pode acometer além de membros da Família Canidae (como cães, raposas, lobos e coiotes), outros carnívoros como os da Família Felidae (leões, tigres, leopardos e onças), Mustelidae (furões e martas), Procyonidae (guaxinin), Ursidae (urso e panda gigante), Ailuridae (panda vermelho) e Viveridae (ALEXANDER; APPEL, 1994; APPEL; SUMMERS, 1995; ROELKE-PARKER *et al.*, 1996; CARPENTER *et al.*, 1998; DYER; SCHAMBER, 1999; MARTELLA *et al.*, 2002; STANTON *et al.*, 2003). Além de poder afetar mamíferos marinhos da ordem Pinnipedia e Família Phocidae (focas), bem como animais da ordem artiodactyla (Família Tayassuidae) como o caititu e primatas da Família Cercopithecidae (VAN MOLL *et al.*, 1995; HARDER; OSTERHAUS, 1997; FORSYTH *et al.*, 1998; KUIKEN *et al.*, 2006). Gatos domésticos e suínos são suscetíveis ao vírus, porém nestas espécies não há o desenvolvimento da doença clínica (APPEL *et al.*, 1974).

2.2.1 Histórico

O vírus foi primeiramente descrito por Carré (1905 *apud* APPEL; SUMMERS, 1995) em um contágio natural e mais tarde estudado profundamente por Laidlaw e Dunkin (1926 *apud* KRAKOWKA; HIGGINS; KOESTNER, 1980). As descobertas da imunofluorescência para o vírus foi um importante passo na descoberta de informações sobre a cinomose uma vez que puderam determinar a distribuição viral em diferentes tecidos (APPEL, 1969). Pesquisas revelaram que o furão (*Mustela putorius*) é um

animal suscetível à doença o que acabou definindo este como um animal experimental para estudos sobre o vírus da cinomose canina (APPEL, 1969).

O vírus da cinomose canina apresenta somente um sorotipo, mas existe uma variedade de biotipos que variam quanto ao seu tropismo tecidual com o sistema nervoso central (ALVES *et al.*, 2006). Em 1971, foi isolada uma linhagem chamada R252-CDV que produzia uma encefalite desmielinizante quando inoculado em cães gnotobióticos, enquanto que outra linhagem chamada Snyder-Hill produzia necrose neuronal e gliose sem desmielinização (KRAKOWKA; KOESTNER, 1977). Novos isolados virais como o Asia 1 e Asia 2 foram descobertos a partir dos genes H e P, porém não se observou diferença nos sinais clínicos e patológicos dos isolados (LAN *et al.*, 2007).

2.2.2 Epidemiologia

O contágio pelo vírus da cinomose ocorre por aerossóis ou por contato direto, sendo o período de incubação de aproximadamente 7 dias (APPEL; SUMMERS, 1995). Cães com infecção aguda apresentam o vírus nas secreções nasais e oculares durante todo o curso da doença (ZEE, 2003). Este também pode estar presente na urina de cães experimentalmente infectados como também nas fezes dos caninos (ZEE, 2003). A cinomose canina pode acometer cães de todas as idades, porém animais jovens (3 a 6 meses de idade) são mais suscetíveis principalmente quando há a diminuição dos anticorpos maternos (APPEL; SUMMERS, 1995; CHAPPUIS, 1995; GREENE; APPEL, 2006). Cães que se recuperaram da infecção são imunes por vários anos e provavelmente pela vida toda, não eliminando o vírus e não se mantendo persistentemente infectados (APPEL; SUMMERS, 1995).

2.2.3 Patogênese

O vírus da cinomose em cães expostos tanto por contato direto como por aerossóis entram em contato com o trato respiratório superior (GREENE; APPEL, 2006). No primeiro dia da exposição viral este é encontrado em macrófagos dos linfonodos brônquicos e tonsilas (APPEL, 1969). Em 2 a 5 dias há o aumento de

antígenos virais nas tonsilas, linfonodos brônquicos e retrofaríngeos, existindo um baixo número de partículas virais em outros tecidos linfóides (APPEL, 1969; BUSSELL, 1970). Quatro a seis dias após a exposição viral há a multiplicação em folículos linfóides do baço, da lâmina própria do intestino delgado e estômago, no linfonodo mesentérico e nas células de Kupffer (GRENNE; APPEL, 2006). Durante este período a lâmina própria nasofaríngeal e a mucosa conjuntival contém antígenos virais em células mononucleares (APPEL, 1969). De 6 a 8 dias depois da exposição viral os linfonodos ficam altamente infectados. A partir do 9º dia o tecido linfóide está com acentuada depleção linfóide (KRAKOWKA; HIGGINS; KOESTNER, 1980). Ao 14º dia os cães que possuem uma boa resposta celular e humoral muitas vezes não apresentarão sinais clínicos da cinomose canina, uma vez que os anticorpos específicos neutralizam o vírus e inibem a sua propagação. Em animais com resposta intermediária o vírus irá se espalhar pelo epitélio tecidual, podendo esta infecção ser resolvida quando os títulos de anticorpos aumentarem (GRENNE; APPEL, 2006). Por outro lado, quando não há uma resposta humoral, a infecção ocorre em múltiplos tecidos, os sinais clínicos são muitas vezes graves e se o vírus persistir pode levar a morte do animal (APPEL, 1969; GRENNE; APPEL, 2006).

No cérebro o vírus aparece inicialmente em macrófagos meníngeos e células mononucleares perivasculares depois em células do epêndima, células da glia e neurônios (APPEL, 1970; GREENE; APPEL, 2006). Em animais com infecção crônica, há antígenos virais restritos aos neurônios, células da substância branca, glândula pituitária, coxins digitais e em poucas células do epitélio de outros tecidos (APPEL, 1970).

A virulência é um parâmetro que indica a severidade, a extensão ou o tipo de doença clínica (ALVES *et al.*, 2006). Alguns isolados como o Snyder Hill, A75/17 ou o R252 possuem uma alta virulência e são neurotrópicos (KRAKOWKA; KOESTNER, 1977; AXTHELM; KRAKOWKA, 1998; RUDD; CATTANEO; VON MESSLING, 2006; BRUNNER *et al.*, 2007).

2.2.4 Inativação do Vírus

O vírus da cinomose canina é sensível aos fatores ambientais como temperaturas extremas, pH e a diferentes desinfetantes (MOHANTY; DUTTA, 1981; QUINN *et al.*,

2005). Este é inativado pela luz natural ou ultravioleta e pode ser destruído quando exposto a temperaturas de 50°C a 60°C por 30 minutos, em tecidos mortos sobrevive por 1 hora a 37°C e por 3 horas a 20°C (ZEE, 2003). Porém, em baixas temperaturas o vírus pode sobreviver por semanas, a uma temperatura de 0-4°C e a -65°C sobrevive por até 7 anos (GREENE; APPEL, 2006). A infectividade do vírus é perdida em pH acima de 10,4 ou abaixo de 4,4. O vírus pode ser inativado por desinfetantes como o clorofórmio, fenol (0,75%), amônio quaternário (0,3%) e solução de formalina (0,5%) (ZEE, 2003).

2.2.5 Sinais Clínicos

Os animais infectados pelo vírus da cinomose canina podem apresentar anorexia, desidratação, vômito, secreções oculonasais mucopurulentas, tosse e dispnéia (MOHANTY; DUTTA, 1981; SWANGO, 1997; PANDHER *et al.*, 2006). Podem ser observadas pústulas na pele do abdômen e, em alguns casos, hiperqueratose dos coxins digitais (GREENE; APPEL, 2006). Sinais de diarreia contendo ou não sangue podem estar presentes em alguns casos (JONES; HUNT; KING, 2000; APPEL, 1970). Em muitos desses a diarreia pode resultar em desidratação acentuada agravando ainda mais o quadro (JONES; HUNT; KING, 2000). Os caninos infectados podem apresentar sinais neurológicos como convulsões, demência, mudanças graves da personalidade, astenia, ataxia e mioclonias (FENNER, 1995). A manifestação neurológica pode ocorrer durante a fase aguda da infecção bem como várias semanas ou até meses depois (APPEL; SUMMERS, 1995). Os sinais neurológicos que se desenvolvem após os sinais respiratórios e gastrintestinais são tipicamente graduais no início com convulsões e desenvolvimento progressivo de paresia posterior (RAW *et al.*, 1992).

A encefalite multifocal desmilitarizante causada pelo vírus da cinomose como a encefalite do cão velho, embora sejam causadas pelo mesmo agente, demonstram diferentes lesões e sinais clínicos indicando diferenças na sua patogênese (VANDEVELDE *et al.*, 1980). Na encefalite do cão velho os sinais clínicos são relacionados com lesões corticais e subcorticais (VANDEVELDE *et al.*, 1980). Em geral estes sinais são deficiência visual, respostas bilaterais deficientes ao reflexo de ameaça, depressão, andar em círculo, mudança de personalidade e estupor (SWANGO, 1997).

2.2.6 Achados Patológicos

Achados macroscópicos

Os caninos infectados podem apresentar secreções nasais e oculares serosas, catarrais ou mucopurulentas (LÓPEZ, 2007). A dermatite pustular também pode ser observada nos animais infectados pelo vírus da cinomose canina (GREENE; APPEL, 2006). As alterações pulmonares se evidenciam como pulmões não colapsados, avermelhados e edemaciados (LÓPEZ, 2007). No intestino podem ocorrer enterite catarral ou hemorrágica (LAN *et al.*, 2006). O timo pode se apresentar com atrofia completa ou parcial, esta última foi observada por Appel (1969) após 9 dias da exposição viral por aerossóis. Os linfonodos podem estar ocasionalmente congestos ou hemorrágicos (APPEL, 1969). Nos coxins digitais o engrossamento desta estrutura é caracterizado na microscopia como uma hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica (GRÖNE; ENGELHARDT; ZURBRIGGEN, 2003; GRÖNE; DOHERR; ZURBRIGGEN, 2004; ENGELHARDT *et al.*, 2005). Cães infectados pelo vírus da cinomose canina antes da erupção dos dentes permanentes podem apresentar hipoplasia do esmalte dentário (DUBIELZIG, 1979; GELBERG, 2007). Com isso, há a exposição da dentina que na macroscopia é demonstrado por áreas de coloração amarelo a bege nos dentes permanentes (GELBERG, 2007).

Achados microscópicos

Os corpúsculos de inclusão são agregados de víriões e proteínas virais e apresentam um grande valor no diagnóstico na infecção pelo vírus da cinomose canina (WISNICKY; WIPF, 1942). Durante a replicação viral tem-se um excesso de proteínas não utilizadas pelo vírus, que se deposita em forma de corpúsculo de inclusão. Embora esses não estejam presentes em todas as doenças virais, eles são, em muitas delas, bem característicos (JONES; HUNT; KING, 2000). Na cinomose canina, em cortes de tecidos fixados em formalina e colorados por hematoxilina-eosina observam-se os corpúsculos eosinofílicos (PANDHER *et al.*, 2006) que se apresentam intracitoplasmáticos e/ou intranucleares com grande valor no diagnóstico desta enfermidade (WISNICKY; WIPF, 1942). Em cortes de tecido. As inclusões podem ser confundidas com eritrócitos, mas o tamanho, forma e localização dos corpúsculos de

inclusão permitem diferenciá-los dos eritrócitos (WISNICKY; WIPF, 1942). Corpúsculos de inclusão viral podem ser observados no estômago, bexiga, sistema nervoso central, na pelve renal, epitélio conjuntival, coxins digitais (DUCATELLE; COUSSEMENT; HOORENS, 1980; GRÖNE; ENGELHARDT; ZURBRIGGEN, 2003). No pulmão estes podem ser encontrados no epitélio de brônquios e bronquíolos como em macrófagos alveolares e células sinciciais multinucleadas (TOVAR *et al.*, 2007). A ocorrência de corpúsculo de inclusão em órgãos linfóides como baço linfonodos e tonsila é extremamente alta (KUBO *et al.*, 2007).

O pulmão pode apresentar pneumonia intersticial caracterizada por infiltrado de células mononucleares (PANDHER *et al.*, 2006). Além da presença de macrófagos espumosos, hiperplasia de pneumócitos tipo II e edema alveolar (PANDHER *et al.*, 2006; LÓPEZ, 2007). No intestino delgado pode ser observada enterite, com degeneração do epitélio, necrose linfóide e infiltração de linfócitos na lâmina própria (OKITA *et al.*, 1997).

Nos coxins digitais a histopatologia revela hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica, vacuolização de queratinócitos e a presença de corpúsculos de inclusão viral, sendo a hiperplasia epitelial raramente mencionada (HAINES *et al.*, 1999; GRÖNE; ENGELHARDT; ZURBRIGGEN, 2003).

No sistema nervoso central observam-se alterações tanto na substância branca como na substância cinzenta (SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). As lesões podem ser caracterizadas como degeneração neuronal, gliose, infiltrado linfoplasmocitário perivascular ocorrendo principalmente no córtex cerebral como cerebelar, no tálamo, núcleo basal e na medula espinhal (RAW *et al.*, 1992; SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). O infiltrado consiste principalmente de linfócitos e este achado é característico da infecção pelo vírus da cinomose o que difere da meningoencefalite granulomatosa (RAW *et al.*, 1992). Corpúsculos acidofílicos podem ser encontrados, porém com alguma dificuldade. Estes podem estar presentes no núcleo ou citoplasma de neurônios, astrócitos e células do epêndima (MCCANDLISH *et al.*, 1992; SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). Os neurônios podem apresentar núcleos picnóticos associados a satelitose e neuronofagia (SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). Desmielinização, astrocitose e astrogliose podem ser evidenciadas na substância branca (BLAKEMORE; SUMMERS; APPEL, 1989; SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). A presença de antígeno viral em oligodendrócitos é rara (ZURBRIGGEN *et al.*, 1998, D'INTINO *et al.*, 2006), sendo

este mais comumente encontrado na microglia e em astrócitos (BLAKEMORE; SUMMERS; APPEL, 1989; VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995; STEIN *et al.*, 2004) podendo ser visualizado também em neurônios (BRUNNER *et al.*, 2007). O mecanismo de desmielinização não está totalmente esclarecido. A regulação negativa da transcrição do gene de mielina, inibição da atividade enzimática específica dos oligodendrócitos e redução deste tipo celular em áreas de desmielinização sugerem os oligodendrócitos estarem envolvidos no processo de desmielinização (ZURBRIGGEN *et al.*, 1998; MORO *et al.*, 2004). A perda das proteínas da bainha de mielina pode ser evidenciada a partir da coloração de luxol fast blue (SUMMERS; CUMMING; LAHUNTA, 1995). Os astrócitos são as principais células do sistema nervoso atingidas pelo vírus e tudo indica que a infecção desta célula desempenhe um importante papel no mecanismo de desmielinização (MORO *et al.*, 2004). Os astrócitos podem expressar 3 tipos de filamentos intermediários, incluindo a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), vimentina e nestina (SEEHUSEN *et al.*, 2007). A GFAP pode ser detectada através de técnica imunoistoquímica marcando processos astrogliais e o corpo celular de astrócitos (VANDEVELDE *et al.*, 1983).

As encefalopatias causadas pela cinomose podem ser divididas de 3 formas: aguda, subaguda e crônica (ALLDINGER *et al.*, 2000). A fase aguda se caracteriza por desmielinização e ausência de manguito perivascular, diferindo-se da fase subaguda onde há desmielinização com células inflamatórias formando manguitos com 2 ou 3 camadas de células mononucleares (HEADLEY; SOARES; GRAÇA, 2001; SIPS *et al.*, 2007). A encefalopatia crônica é caracterizada por desmielinização e extenso infiltrado mononuclear perivascular (SCHOBESBERGER *et al.*, 1999; HEADLEY; SOARES; GRAÇA, 2001; SEEHUSEN *et al.*, 2007).

2.2.7 Tratamento e Prevenção

Não há tratamento específico com agentes antivirais ou quimioterápicos com valor prático para o tratamento da cinomose canina (SWANGO, 1997). O uso de antimicrobianos tem sido aplicado para o tratamento de infecções bacterianas (SWANGO, 1997). Líquidos eletrolíticos, vitaminas do complexo B e suplementos alimentares são utilizados como terapia de suporte (SWANGO, 1997; TOVAR *et al.*, 2007).

No início do século XX as vacinas inativadas eram amplamente utilizadas, porém a cinomose ainda ocorria em cães e animais de zoológico (APPEL; SUMMERS, 1995). A partir dos anos 60, com as vacinas atenuadas houve uma diminuição considerável na incidência da cinomose canina em todo mundo (LAN *et al.*, 2006, RIKULA; NUOTIO; SIHVONEN, 2007). Vacinas preparadas a partir de passagens em cultura de células de aves e embrião de galinha como em células de cães foram utilizadas amplamente, sendo que vacinas preparadas em cultivo de células de cães induziam imunidade em quase 100% dos caninos vacinados (APPEL; SUMMERS, 1995; PARDO *et al.*, 2007). A utilização de vacinas recombinantes (recCDV ou rD) tem sido realizada nos Estados Unidos da América desde 1997, tendo como benefício a não ocorrência de encefalite pós-vacinal (PARDO *et al.*, 2007).

O esquema vacinal mais recomendado é com primeira dose em filhotes a 5-7 semanas de idade, com doses adicionais a intervalos de 3 a 4 semanas, até que os filhotes completem 14 semanas de idade. Os reforços anuais são preconizados visto que o título de anticorpos terá declinado até níveis não protetores em até um terço dos cães (SWANGO, 1997).

2.2.8 Infecções Secundárias

O vírus da cinomose canina pode atingir diretamente o pulmão causando uma pneumonia viral devido ao seu efeito imunodepressor ou levando a associação com outros vírus como o adenovírus tipo 2 e o vírus da parainfluenza (DAMIÁN *et al.*, 2005; TOVAR *et al.*, 2007; CHVALA *et al.*, 2007) ou com infecções bacterianas secundárias (LÓPEZ, 2007). As pneumonias causadas por *Bordetella bronchiseptica* ou *Mycoplasma* sp. podem ser observadas como infecções primárias de pulmão e como secundárias em animais infectados pelo vírus da cinomose (CHALKER *et al.*, 2004; ERLES, 2004; LÓPEZ, 2007; CHVALA *et al.*, 2007). A infecção pulmonar pelo *Pneumocystis carinii* foi encontrada em animais com cinomose, sugerindo uma imunossupressão pelo vírus levando a infecção secundária pelo agente (DYER; SCHAMBER, 1999).

Infecções combinadas de cinomose canina com *Toxoplasma gondii* ou *Neospora caninum* têm ocasionado miosite e radiculoneurite (LEMBERGER *et al.*, 2005, MORETTI *et al.*, 2006, GREENE; APPEL, 2006).

2.2.9 Métodos de Diagnóstico

Os achados hematológicos incluem linfopenia causada pela depleção linfóide (KRAKOWKA; KOESTNER, 1977) e trombocitopenia que pode estar presente na fase inicial da cinomose (SWANGO, 1997).

A imunocitologia a partir da conjuntiva ocular, como em outras membranas mucosas, ou de esfregaços sanguíneos pode ser realizada utilizando-se teste de imunofluorescência direta. A não detecção do antígeno viral não exclui a possibilidade da infecção pelo vírus (SWANGO, 1997). A identificação de antígenos virais no estômago, duodeno, bexiga, pulmões, cérebro, conjuntiva palpebral, prepúcio e vagina por imunofluorescência direta foi demonstrada por Fairchild, Wyman e Donovan (1967).

A detecção de corpúsculos de inclusão pode ser realizada *in vivo* a partir de *swabs* oculares com posterior esfregaço em lâmina (MOHANTY; DUTTA, 1981). Este método de diagnóstico, apesar de extremamente simples, muitas vezes cursa com resultados falsos negativos (WISNICKY; WIPF, 1942; SWANGO, 1997).

O isolamento viral é possível a partir de cultivo em macrófagos alveolares e linfócitos em até 24 a 48 horas (GREENE; APPEL, 2006). Para o diagnóstico *ante mortem* pode ser utilizado sangue, *swab* nasal, conjuntival ou vaginal e líquido. No diagnóstico *post mortem* os principais tecidos são pulmões, cérebro, tecido linfático e bexiga (APPEL; PEARCE-KELLING; SUMMERS, 1992). A formação de sincícios é característica do efeito citopático do vírus da cinomose em muitas culturas de tecidos (NISHI *et al.*, 2004), podendo ser detectado dentro de 2 a 5 dias (GREENE; APPEL, 2006).

Testes sorológicos, como o ELISA, podem ser utilizados, porém na fase aguda da doença os títulos de anticorpos podem estar baixos devido à imunodepressão causada pelo vírus. Cães previamente vacinados podem ter uma alta titulação comparável aos dos animais doentes dificultando assim o diagnóstico através deste método (POTGIETER; AJIDAGBA, 1989; SOMA *et al.*, 2003).

A transcrição reversa (RT-PCR) tem sido realizada para a detecção do RNA do vírus da cinomose no sangue, soro, líquido e urina por alguns autores tendo um grande valor no diagnóstico *ante mortem* (GEBARA *et al.*, 2004; SAITO *et al.*, 2006;

AMUDE; ALFIERI; ALFIERI, 2007). A hibridização *in situ* tem detectado o mRNA do vírus da cinomose em tecidos como o cérebro (D'INTINO *et al.*, 2006), linfonodos (SCHOBESBERGER *et al.*, 2005) e coxins digitais (GRÖNE; DOHERR; ZURBRIGGEN, 2004).

A técnica de imunoistoquímica tem sido empregada para a detecção de antígenos da cinomose canina (MASUDA *et al.*, 2006). Haines *et al.* (1999) detectaram o antígeno no epitélio da mucosa nasal, dos coxins digitais e da pele, sugerindo a utilização desta técnica para o diagnóstico *ante mortem* da cinomose. Como diagnóstico *post mortem* utiliza-se órgãos como estômago, pulmão, bexiga, encéfalo, baço, linfonodos, tonsila, rim, intestino e coxins digitais (DUCATELLE; COUSSEMENT; HOORENS, 1980; KOUTINAS *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2007; WENZLOW *et al.*, 2007).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Procedimentos Gerais

Caninos necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS) foram analisados com base no histórico, lesões macroscópicas e microscópicas para seleção de casos de infecção pelo vírus da cinomose canina.

Os caninos utilizados no presente estudo morreram de forma natural ou foram eutanasiados devido à infecção pelo vírus da cinomose canina. Os animais eram provenientes do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS e de clínicas particulares da grande Porto Alegre. As necropsias foram realizadas entre julho de 2006 até outubro de 2007.

3.2 Necropsias e Análises Histológicas

Achados patológicos observados em infecções pelo vírus da cinomose canina foram identificados e analisados. Durante as necropsias selecionou-se caninos que apresentavam alterações macroscópicas como secreção nasal e/ou ocular mucopurulenta, pulmões não colapsados e de coloração avermelhada, hiperqueratose dos coxins digitais, pústulas abdominais, conteúdo intestinal diarréico, ou com suspeita clínica de cinomose. Para a microscopia eram coletados pulmões, bexiga, estômago, coxins digitais, tonsila, linfonodos mesentéricos, encéfalo, medula espinhal, medula óssea, coração, rins, baço, língua, timo, pálpebra, testículo/epidídimo, fígado, intestino delgado e grosso, orelha e olho. Os órgãos após coletados eram fixados em solução de formol 10% por 24 a 48 horas, e processados por técnicas rotineiras de histologia. Os tecidos eram cortados em 4 μ c e posteriormente corados com Hematoxilina-eosina (PROPHET *et al.*, 1992). Os cortes histológicos de orelha foram corados com coloração de PAS (ácido periódico de Schiff) conforme Prophet *et al.* (1992).

Para a preparação dos cortes histológicos de encéfalo utilizou-se as regiões cortical e subcortical do cérebro e do cerebelo e a ponte com pedúnculos cerebelares. A

medula espinhal foi seccionada na região cervical (C3-C6), torácica (porção média da medula espinhal torácica entre T6-T11) e lombar (na intumescência lombar). Fragmentos de pulmão foram coletados para realização de cultivo bacteriano aeróbico.

3.3 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada nos cortes histológicos de pulmões, bexiga, estômago, coxins digitais, tonsila, linfonodos mesentéricos, encéfalo, medula espinhal, medula óssea, coração, rins, baço, língua, timo, pálpebra, testículo/epidídimo, fígado, intestino delgado e grosso, orelha e olho. Como controle positivo da imunoistoquímica utilizava-se cortes de estômago de um canino infectado pelo vírus da cinomose. Novos cortes de estômago do animal controle foram feitos após 1 mês de fixação em solução de formalina 10% tamponada para testar se havia a perda da marcação positiva no teste imunistoquímico. As lâminas eram preparadas com solução de gelatina 0,3% ou Polilisina 10% (Sigma) e os cortes fixados em estufa a 60°C por 24 horas. Os cortes eram desparafinados em solução de xilol por 2 vezes durante 20 minutos cada, e após eram colocados em soluções decrescente de álcool (100%, 96%, 80% e 70%) por 2 minutos em cada. As lâminas eram então lavadas em água destilada. Para a imunoistoquímica utilizou-se 4 tipos de recuperações antigênicas: protease tipo XIV (Sigma), proteinase K (Dako), tripsina 0,1% (Gibco) e calor. Para a recuperação com as enzimas protease e proteinase K os cortes foram cobertos por 100µl de cada solução durante 15 minutos a temperatura ambiente. Na recuperação com tripsina os tecidos eram cobertos com a enzima por 10 minutos a temperatura de 37°C, sendo as lâminas colocadas posteriormente em 0,01M de tampão citrato de sódio (pH 6,0) no microondas durante 2 minutos. A recuperação antigênica por calor consistia na utilização de calor a 80-85°C (em banho-maria) por 2, 3, 5 e 10 minutos com a imersão das lâminas em 0,01M de tampão citrato de sódio (pH 6,0). Os cortes eram colocados em solução de soro suíno a 1% diluído em água destilada por 15 minutos, a fim de inibir reações inespecíficas. Após esta etapa as lâminas eram lavadas com água destilada, sendo colocado anticorpo monoclonal anti-cinomose (VMRD) na diluição de 1:200, 1:400, 1:500 ou 1:1000 diluído em solução de PBS (Tampão Fosfato Salino) por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4°C. Foi utilizado como método imunoistoquímico streptavidina-biotina, com isso se utilizou anticorpo secundário e streptavidina, esta ligada a uma molécula de

fosfatase alcalina (LSAB + System AP, DakoCytomation) bem como a utilização de streptavidina-biotina ligada a peroxidase (LSAB, DakoCytomation). Para o método de streptavidina-biotina peroxidase utilizou-se a inibição da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% por 15 minutos antes da recuperação antigênica. Os cortes eram cobertos pelo anticorpo secundário e após por streptavidina-biotina por 20 minutos cada. As lâminas eram então lavadas em água destilada e após eram preparadas as soluções reveladoras. Esta consistia do cromógeno Permanent Red (DakoCytomation) no qual era realizada a maceração de 1 pastilha do cromógeno em 3ml de tampão. Eram aplicados sobre as lâminas 100µl da solução por 15 minutos. Quando utilizado o método streptavidina-biotina peroxidase o cromógeno utilizado era o 3,3'diaminobenzidina (DAB-Dako). A solução de 0,6ml de DAB foi misturada em 0,4ml de PBS e 25µl de peróxido de hidrogênio e após colocadas sobre as lâminas durante 10 minutos a temperatura ambiente. As lâminas eram lavadas e contra-coradas por Hematoxilina de Harris por 40 segundos, sendo lavadas e após mergulhadas em álcool 70%, 80% e 100% e colocadas em xilol por 2 vezes de 20 minutos cada e montadas em resina sintética (Entellan Merck).

Para a análise de cérebro e cerebelo com lesões microscópicas realizou-se imunistoquímica anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio a 3% diluído em água destilada por 15 minutos. A recuperação antigênica utilizada foi de calor durante 10 minutos em banho-maria utilizando tampão Tris-EDTA (pH 9,0). Utilizou-se anticorpo monoclonal anti-GFAP (Dako) diluído em PBS (1:500), em câmara úmida a 37°C por 1 hora. Após a lavagem das lâminas foi utilizado um kit de anticorpo secundário e streptavidina ligada a peroxidase (LSAB DakoCytomation) por 20 minutos cada reagente. Realizou-se a revelação com o cromógeno 3,3'diaminobenzidina (DAB-Dako) durante 10 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem das lâminas estas foram contra coradas com Hematoxilina de Harris por 40 segundos, e com posterior desidratação com utilização de soluções de concentração crescente de álcool e xilol, e montadas em resina sintética.

4. RESULTADOS

4.1 Dados Gerais

No período de julho de 2006 a outubro de 2007 foram realizadas, no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV-UFRGS), 760 necropsias de caninos. Em 63 cães estabeleceu-se o diagnóstico de cinomose canina através do exame macroscópico e microscópico, dos quais 54 foram utilizados no presente trabalho.

A idade dos cães variou entre 2 meses a 8 anos. Em 51 animais a idade foi informada e em 3 animais não havia a informação deste dado, porém estes eram cães adultos. Dos animais com idade informada, 40 cães apresentavam idade que variava de 2 a 6 meses (78,5%), em 6 animais a idade variou entre 7 meses a 1 ano (11,1%), 3 tinham idade entre 1-4 anos (5,5 %) e 2 apresentavam idade de 4-8 anos (3,9%). Dos 54 animais analisados 32 eram machos (59,26%) e 22 fêmeas (40,74%).

Dentre 54 cães, 24 não tinham raça definida (SRD), 6 eram da raça Poodle, 4 Dachshund (Teckel) e 3 caninos eram Rottweiler conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição e frequência por raça de 54 caninos com diagnóstico de cinomose canina necropsiados no Setor de Patologia Veterinária - UFRGS.

Raça	Número de animais	Frequência (%)
Sem raça definida	24	44,44
Poodle	6	11,11
Dachshund (Teckel)	4	7,41
Rottweiler	3	5,56
Labrador	2	3,71
Yorkshire	2	3,71
Pastor Belga	2	3,71
Beagle	1	1,85
Border Collie	1	1,85
Dogue Alemão	1	1,85
Fila Brasileiro	1	1,85
Golden Retriever	1	1,85
Lhasa Apso	1	1,85
Pastor Alemão	1	1,85
Pinscher	1	1,85
Pit Bull	1	1,85
Pointer	1	1,85
Shih-Tzu	1	1,85
Total	54	100%

4.2 Resultados Macroscópicos

Os achados macroscópicos encontrados no exame externo dos animais necropsiados encontram-se na Tabela 2 e caracterizaram-se por secreção ocular (Figura 1) e nasal mucopurulentas, hiperqueratose dos coxins digitais (Figura 2), secreção ceruminosa no conduto auditivo externo e pústulas abdominais. A secreção do conduto auditivo dos caninos apresentava coloração que variava de amarelada ao marrom-escuro, apresentando em muitas das vezes um odor fétido.

Tabela 2 - Achados macroscópicos observados durante a realização do exame externo em caninos infectados pelo vírus da cinomose canina.

Achado macroscópico	Número de animais	Percentual (%)
Secreção ceruminosa no conduto auditivo	31	57,4
Secreção ocular	27	50,0
Secreção nasal	19	35,2
Hiperqueratose dos coxins digitais	19	35,2
Pústulas abdominais	12	22,2

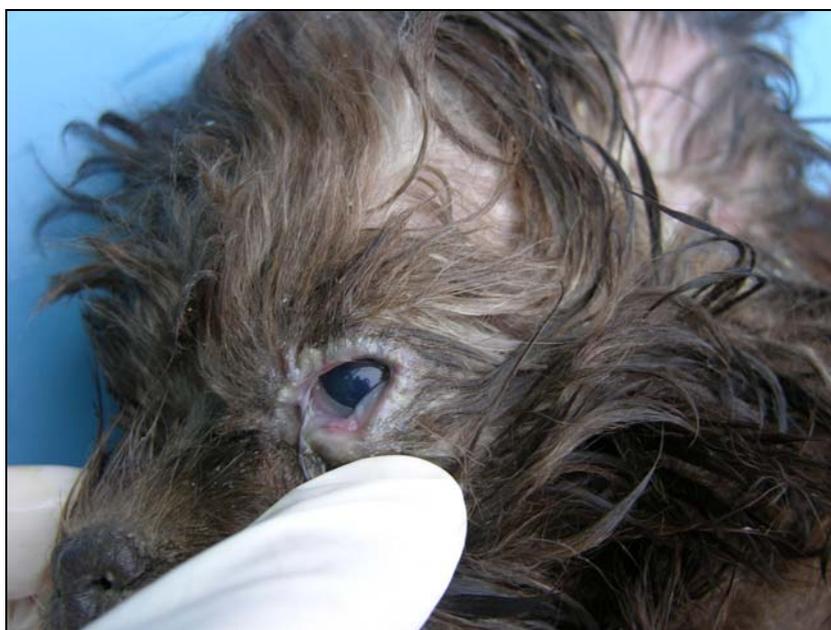


Figura 1 - Secreção ocular mucopurulenta em um canino Lhasa Apso, fêmea de 5 meses de idade infectado pelo vírus da cinomose canina.



Figura 2 - Hiperqueratose do coxim digital em um canino SRD, fêmea de 3 meses de idade com infecção pelo vírus da cinomose canina.

Os pulmões se mostravam não colabados, edemaciados e avermelhados (Figura 3) em 51 animais. O estômago apresentava mucosa hiperêmica em 19 cães e em 8 evidenciava-se a presença de erosões da mucosa gástrica.

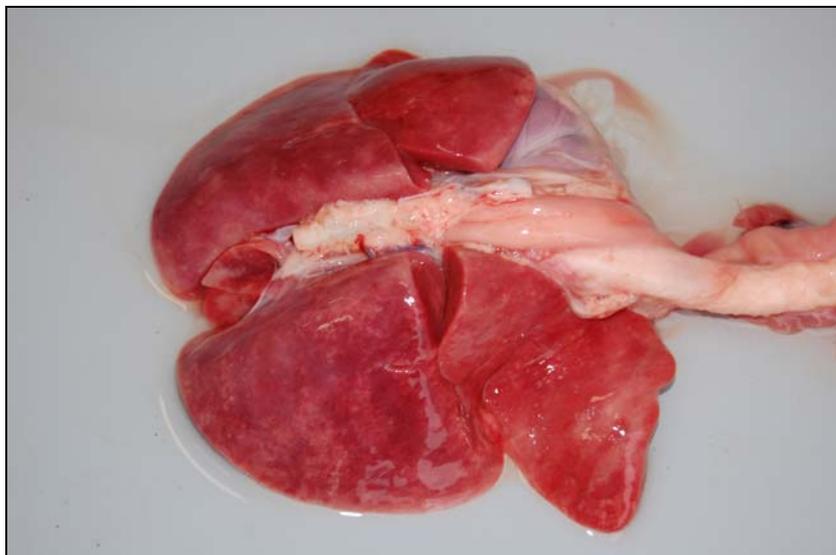


Figura 3 - Pulmão não colabado e de coloração avermelhada de um canino Poodle, macho de 5 meses infectado pelo vírus da cinomose canina com infecção secundária por *Bordetella bronchiseptica*.

No intestino delgado dos cães analisados foi visualizado hiperemia da mucosa e evidencição das placas de Peyer (Tabela 3). Em alguns animais havia conteúdo diarréico no intestino de coloração que variava de amarelado até avermelhado. Em oito animais (14,8%) infestações discretas por *Toxocara* sp., *Ancylostoma* sp. e/ou *Trichuris* sp. foram observadas no intestino.

Tabela 3 - Achados macroscópicos observados no intestino dos animais com infecção pelo vírus da cinomose canina.

Macroscopia	Número de animais	Percentual (%)
Conteúdo intestinal diarréico	26	48,1
Aumento das placas de Peyer	22	40,7
Hiperemia da mucosa	19	35,2

A análise de órgãos linfóides demonstrou atrofia do timo em 19 cães (35,2%), sendo considerado atrofia somente cães antes da maturidade sexual, uma vez que a atrofia deste órgão pode ser fisiológica. Os linfonodos mesentéricos encontravam-se aumentados em volume em 16 animais (29,6%).

Em um canino analisado observou-se placas fibrinonecróticas sobre a língua e no palato, este animal além destas lesões apresentava secreção ceruminosa no conduto auditivo e inúmeras pústulas abdominais.

Em dois caninos, um da raça Beagle de 3 meses de idade e outro da raça Shih-Tzu de 2 meses foi visualizada hidrocefalia.

4.3 Resultados Microscópicos

Na microscopia os pulmões apresentavam pneumonia intersticial (Figura 4) em 44,4% dos animais (24/54) e em 18,5% (10/54) a pneumonia broncointersticial foi evidenciada. Broncopneumonia supurativa, sem pneumonia intersticial, foi visualizada em 18,5% (10/54). Células sinciciais foram observadas em 9 caninos e edema alveolar em 28 animais. Corpúsculos de inclusão viral presentes no epitélio de brônquios e bronquíolos bem como no interior de células sinciciais foram visualizados em 15 caninos.

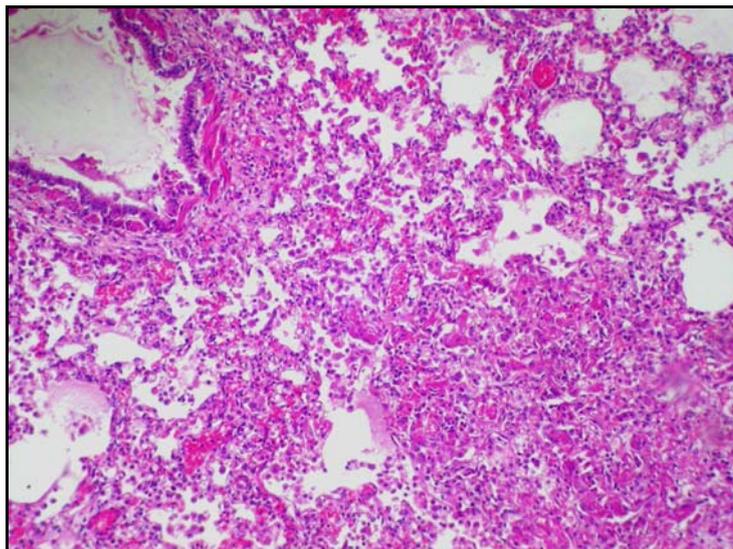


Figura 4 – Pneumonia intersticial em um canino infectado pelo vírus da cinomose. Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 20.

Quando analisado o encéfalo dos 54 cães observou-se que 29 deles apresentavam alguma lesão microscópica. Vacuolização principalmente da substância branca do cérebro e cerebelo foi visualizada, ficando esta mais evidenciada no cerebelo. Alterações como gliose focal, infiltrado perivascular linfoplasmocitário, corpúsculo de inclusão (principalmente intranucleares em astrócitos), neuronofagia, malacia e meningite mononuclear foram observadas conforme demonstra a Tabela 4. Dos animais analisados a encefalopatia foi classificada em 23 cães (79,3%) como aguda, 4 (13,8%) como subaguda e 2 (6,9%) como crônica.

Manguitos perivasculars (1/30), desmielinização (10/30), gliose (4/30), malacia (3/30) e corpúsculos de inclusão viral (4/30) foram visualizados em 15 animais com alterações microscópicas na medula espinhal de um total de 30 caninos.

Tabela 4 - Avaliação histológica de 29 animais com lesões microscópicas no encéfalo causado pelo vírus da cinomose canina.

Lesão microscópica	Número de animais	Percentual (%)
Desmielinização	26	89,6
Corpúsculo de Inclusão	7	24,1
Manguito Perivascular	6	20,7
Malacia	5	17,2
Gliose	3	10,3
Meningite Mononuclear	3	10,3
Neuronofagia	1	3,4

As alterações histológicas no baço foram caracterizadas por rarefação linfóide ou hiperplasia linfóide, infiltrado histiocitário, necrose centro-folicular, corpúsculos de inclusão viral e congestão. Na tonsila evidenciou-se corpúsculos de inclusão viral no epitélio como em folículos linfóides. Achados microscópicos como rarefação linfóide ou hiperplasia linfóide, necrose centro-folicular também ocorriam nas tonsilas dos cães analisados. A atrofia do timo, observada em cães antes da maturidade sexual, que se caracterizava pela perda de linfócitos do córtex bem como a congestão pôde ser observada em alguns dos animais. Nos linfonodos mesentéricos de 40 cães foi visualizada uma ou mais alterações microscópicas e em 11 animais não foi visualizada nenhuma alteração. A distribuição das principais alterações microscópicas em órgãos linfóides está listada na Tabela 5.

Tabela 5 - Alterações microscópicas dos órgãos linfóides nos caninos infectados pelo vírus da cinomose canina.

Órgão	Lesão microscópica	Percentual (%)
Baço	Rarefação linfóide	33,3% (17/51)
	Infiltrado histiocitário	23,5% (12/51)
	Necrose centro-folicular	21,6% (11/51)
	Hiperplasia linfóide	7,8% (4/51)
	Corpúsculo de inclusão	3,9% (2/51)
Timo	Rarefação linfóide	45,7% (16/35)
Tonsila	Corpúsculo de inclusão	30,0% (12/40)
	Rarefação linfóide	20,0% (8/40)
	Hiperplasia linfóide	7,5% (3/40)
Linfonodos mesentéricos	Rarefação linfóide	51,0% (26/51)
	Infiltrado histiocitário	27,5% (14/51)
	Hiperplasia linfóide	15,7% (8/51)
	Necrose na zona cortical	11,8% (6/51)
	Corpúsculo de inclusão	7,8% (4/51)

Na mucosa do estômago, 61,1% (33/54) dos cães apresentavam corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (Figura 5) e/ou intranucleares e em 8 animais observou-se erosões, com proliferação de tecido conjuntivo e infiltrado mononuclear discreto.

No epitélio da bexiga visualizou-se degeneração hidrópica em 13% dos animais (7/54) e em 27,7% (15/54) dos cães havia corpúsculos de inclusão viral (Figura 6). Em 14 animais o epitélio sofreu descamação e não foi possível a análise histopatológica do órgão. Na avaliação microscópica dos rins dos cães observou-se corpúsculos de

inclusão localizados no epitélio de transição da pelve renal 11,8% (6/51), com predomínio de corpúsculos intracitoplasmáticos.

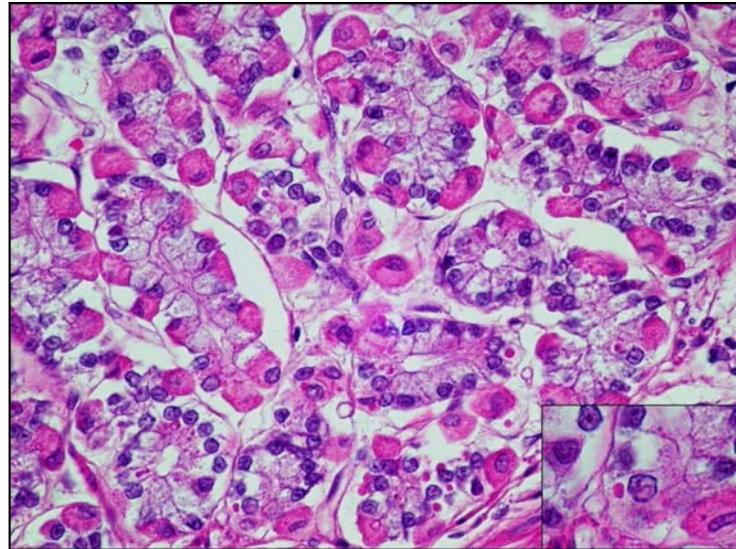


Figura 5 - Estômago de um canino infectado pelo vírus da cinomose canina com corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos (no detalhe). Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 40.

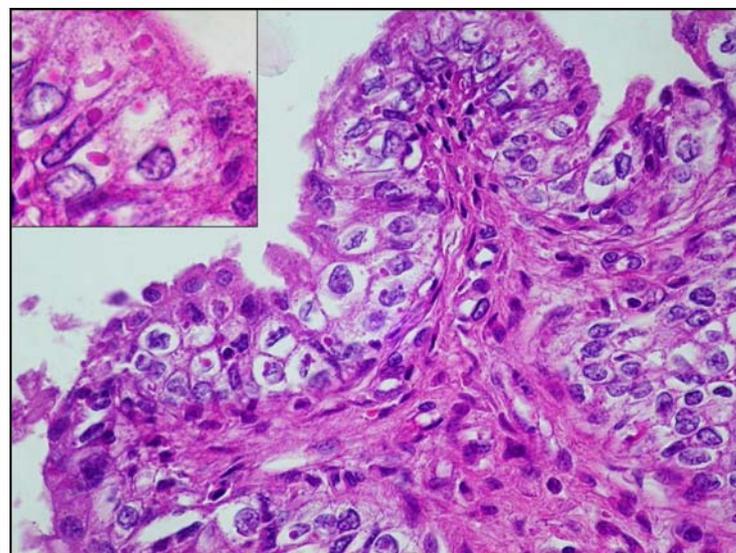


Figura 6 - Bexiga de um cão, epitélio com degeneração hidrópica e corpúsculos eosinofílicos intracitoplasmáticos característicos de cinomose canina (no detalhe). Coloração de Hematoxilina-eosina, obj. 40.

No intestino delgado observou-se enterite mononuclear em 11,8% dos animais (6/51) e em 3,9% (2/51) foi visualizado infiltrado histiocitário nas placas de Peyer. No intestino grosso não foram evidenciadas alterações microscópicas significativas.

Quando analisado os coxins digitais, a hiperqueratose ortoqueratótica ocorreu em 63,3% dos cães analisados (31/49), a degeneração hidrópica do epitélio dos coxins em 34,7% (17/49) e os corpúsculos de inclusão viral (em sua maioria intracitoplasmática) em 26,5% (13/49). Em alguns dos animais observou-se infiltrado polimorfonuclear na derme com necrose do epitélio. Na análise das pálpebras havia corpúsculo de inclusão em 21,7% (10/46) e degeneração hidrópica em 15,2% (7/46) dos cães. Em alguns cães havia infiltrado inflamatório neutrofílico associado a grumos bacterianos e, em 5 casos, estruturas fúngicas com morfologia compatível com *Malassezia pachydermatis* foram visualizadas.

Na língua visualizou-se degeneração hidrópica (15/49), e infiltrado de neutrófilos no epitélio (5/49) ou infiltrado mononuclear (2/49). Em um dos cães foi observado uma área de necrose do epitélio dorsal da língua.

A análise microscópica de orelhas de cães demonstrava degeneração hidrópica (13/33) e em alguns casos corpúsculos de inclusão puderam ser encontrados no epitélio (8/33). Estruturas fúngicas compatíveis com *Malassezia pachydermatis* foram encontradas em 12 cães (Figura 7A). A otite fúngica foi considerada somente em cães no qual a contagem de mais de 5 estruturas fúngicas por campo (obj. 40) foi observada, conforme Gross, Ihrke e Walder (1992). Hifas septadas com morfologia compatível com *Candida* sp. foram encontradas no epitélio da orelha de um canino associadas a infiltrado piogranulomatoso (Figura 7B). Infiltrado neutrofílico com a presença ou não de colônias bacterianas foi observado em 7 casos, porém, nesses casos, não houve a realização de cultivo bacteriano para a identificação do agente.

No testículo e epidídimo visualizaram-se corpúsculos de inclusão em 23,8% dos cães analisados (5/21).

Não foram observadas alterações microscópicas significativas no coração, fígado, olho e medula óssea dos animais analisados.

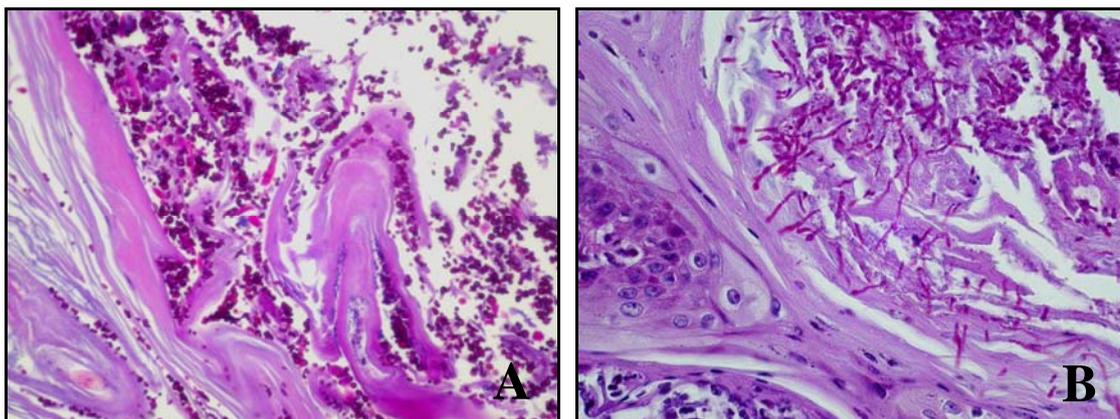


Figura 7 - Cortes histológicos do conduto auditivo externo de caninos infectados pelo vírus da cinomose (coloração de PAS) **A.** Numerosas estruturas típicas de *Malassezia pachydermatis*. (obj. 20). **B.** Estruturas fúngicas compatíveis com *Candida* sp. (obj. 40).

4.4 Resultados Imunoistoquímicos

O teste imunoistoquímico demonstrou marcação positiva quando utilizada a recuperação antigênica por calor com as lâminas mergulhadas em 0,01M de tampão citrato de sódio (pH 6,0). O tempo que demonstrava a melhor marcação positiva foi de 3 minutos em calor de 80°C a 85°C. A melhor diluição do anticorpo monoclonal anti-cinomose foi de 1:400 e o método de streptavidina-biotina-fosfatase alcalina se mostrou mais eficiente. Cortes de estômago utilizados como controle positivo no teste perderam sua marcação imunoistoquímica positiva quando fixados por mais de 1 mês em solução de formalina 10% tamponada.

A análise macroscópica e microscópica dos tecidos de 54 caninos sugeriu a infecção pelo vírus da cinomose. Quando realizados testes imunoistoquímicos nos 24 órgãos citados anteriormente 51 animais obtiveram marcação positiva em pelo menos 1 órgão e em 3 animais não se obteve marcação em nenhum dos órgãos analisados (Tabela 6). Com isso a técnica de imunoistoquímica demonstrou marcação positiva em 94,4% dos animais com diagnóstico macroscópico e microscópico de cinomose canina.

A marcação positiva ficou evidenciada principalmente em coxins digitais, estômago, pálpebra, orelha, tonsila, linfonodo, língua e cerebelo. A frequência de órgãos positivos para o teste imunoistoquímico, bem como o índice de confiança mínimo e máximo (90%) de cada órgão encontram-se na Tabela 7.

Tabela 6 - Resultados do teste imunoistoquímico anti-cinomose canina em diferentes órgãos nos 54 caninos analisados.

	EST	ID	IG	FÍG	BEX	RI	PUL	LG	COX	PAL	OR	BA	LIN	TO	TI	MO	OL	CÉR	CBL	MC	MT	ML	T/E	CO
1	+	+	+	-	-	Ø	+	Ø	+	+	Ø	+	+	Ø	Ø	-	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø	+	-
2	+	+	Ø	Ø	+	+	-	-	+	+	Ø	-	-	-	Ø	-	Ø	+	+	-	Ø	Ø	Ø	-
3	+	-	-	-	+	-	-	Ø	+	+	Ø	-	+	+	+	-	Ø	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-
4	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	F	-
5	+	-	-	-	+	+	+	+	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	+	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	+	-
6	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	F	-
7	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-
8	-	Ø	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	Ø	-	-	+	+	Ø	Ø	Ø	F	-
9	-	+	Ø	Ø	-	-	-	-	+	+	Ø	-	Ø	Ø	+	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
10	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	Ø	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Ø	-	-	Ø	-	+	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-
12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	Ø	-	+	-	+	-	-	Ø	-	
13	-	+	-	-	-	-	-	+	+	Ø	+	-	+	-	-	Ø	-	-	+	Ø	Ø	Ø	F	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	+	Ø	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	Ø	Ø	Ø	-
15	-	-	Ø	-	-	-	-	-	Ø	+	+	-	-	Ø	-	-	Ø	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
16	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	F	-
17	+	-	-	-	-	-	-	+	Ø	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-
18	+	+	-	-	-	-	-	+	+	Ø	+	-	+	Ø	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
19	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	F	-
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	+	-	-	-	Ø	-
21	+	Ø	Ø	-	-	-	+	-	Ø	Ø	Ø	+	-	+	Ø	-	Ø	-	+	Ø	Ø	Ø	F	Ø
22	-	-	-	Ø	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	-	Ø	-	-	-	-	+	-	-	-	F	-
24	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-
25	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	Ø	+	-	-	-	+	-	-	+	F	-
27	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	Ø	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
28	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	F	-
29	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-
30	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	Ø	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	F	-
32	+	-	-	Ø	+	Ø	-	-	+	-	+	-	-	-	Ø	-	+	-	-	-	-	-	Ø	Ø
33	-	+	-	-	-	-	+	-	+	Ø	Ø	-	+	-	-	-	Ø	-	-	-	-	+	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	Ø	+	+	+	+	+	+	-

	EST	ID	IG	FÍG	BEX	RI	PUL	LG	COX	PAL	OR	BA	LIN	TO	TI	MO	OL	CÉR	CBL	MC	MT	ML	T/E	CO	
35	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	F	-	
36	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	Ø	-	-	-	-	+	+	+	+	F	-	
37	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	Ø	+	-	Ø	-	+	+	+	+	Ø	-	
38	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	Ø	-	+	+	+	-	+	-	-	Ø	-	-	F	-	
39	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
40	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
41	-	Ø	-	-	-	-	-	Ø	-	-	Ø	-	+	-	Ø	-	Ø	-	+	Ø	Ø	Ø	F	Ø	
42	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	Ø	-	Ø	-	+	Ø	Ø	Ø	-	-	
43	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	Ø	-	+	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	F	-
44	+	-	Ø	-	+	-	+	+	+	Ø	Ø	+	+	+	+	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	F	-
45	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	-	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	Ø	-	-
46	-	-	-	Ø	-	Ø	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Ø	-	F	Ø	
47	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	F	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
49	+	+	-	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Ø	-	
50	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	Ø	-	+	+	Ø	-	-	-	+	Ø	Ø	Ø	+	-	
51	+	-	-	-	-	-	-	Ø	+	+	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	+	-	Ø	Ø	Ø	F	-	
52	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	Ø	-	-	+	Ø	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	F	-	
53	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	Ø	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
54	+	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-	+	-	-	Ø	-	+	-	-	-	-	-	

1-40 cães com idade de 2 meses a 6 meses; 41-46 caninos de 7 meses a 1 ano; 47-49 cães de 1,1 anos a 4 anos; 50-51 caninos de 4,1 anos a 8 anos; 51-54 cães adultos com idade não informada. Ø (não coletado), F (fêmea), + (imunoistoquímica anti-cinomose com marcação positiva), - (sem marcação imunoistoquímica), EST (estômago), ID (intestino delgado), IG (intestino grosso), FÍG (fígado), BEX (bexiga), RI (rim), PUL (pulmão), LG (língua), COX (coxim digital), PAL (pálpebra), OR (orelha), BA (baço), LIN (linfonodo), TO (tonsila), TI (timo), MO (medula óssea), OL (olho), CÉR (cérebro), CBL (cerebelo), MC (medula cervical), MT (medula torácica), ML (medula lombar), T/E (testículo e epidídimo), CO (coração).

Tabela 7 - Análise dos órgãos na imunoistoquímica para cinomose canina dos 51 caninos que obtiveram resultado positivo no teste.

Órgão	Animais positivos	Total analisado	Frequência de positivos	Índice de confiança (90%)	
				Mín.	Máx.
Coxim	31	46	67,4%	56%	79%
Estômago	32	51	62,7%	52%	74%
Pálpebra	23	42	53,5%	41%	66%
Orelha	17	31	53,1%	39%	68%
Tonsila	19	37	51,4%	38%	65%
Linfonodo	24	48	50,0%	38%	62%
Língua	22	46	47,8%	36%	60%
Cerebelo	23	51	45,1%	34%	57%
Timo	12	33	36,4%	23%	50%
Bexiga	17	51	33,3%	23%	44%
Pulmão	17	51	33,3%	23%	44%
Test./Epid.	6	19	31,6%	14%	49%
Int. delgado	15	47	31,3%	20%	42%
Med. tor.	8	26	30,8%	16%	46%
Baço	14	48	29,2%	18%	40%
Med. lomb.	7	26	26,9%	13%	41%
Med. cerv.	6	27	22,2%	9%	35%
Int. grosso	6	45	13,3%	5%	22%
Olho	5	39	12,8%	4%	22%
Rim	6	48	12,5%	5%	20%
Cérebro	6	51	11,8%	4%	19%
Med. óssea	3	49	6,1%	1%	12%
Fígado	2	45	4,4%	0%	10%
Coração	0	47	0,0%	0%	0%

Mín. (mínimo), Máx. (máximo), Test./Epid. (testículo e epidídimo), Med. (medula), lomb. (lombar), tor. (torácica), cerv. (cervical).

O coxim digital foi o órgão que apresentou a maior frequência de casos positivos na imunoistoquímica. Nos coxins digitais, pálpebra e orelha a marcação do antígeno viral ocorreu principalmente nos queratinócitos (Figura 8 e 9) além de que em alguma das vezes ocorreu marcação em glândulas sebáceas e sudoríparas. Corpúsculos de inclusão viral intracitoplasmáticos e intranucleares foram marcados positivamente, quando estes estavam presentes.

A marcação imunoistoquímica do antígeno viral foi visualizada nas células da mucosa gástrica (Figura 10), sendo o estômago o segundo órgão com maior número de marcações positivas nos órgãos analisados. Em alguns animais havia a presença de autólise no órgão, porém mesmo com essa alteração se evidenciou marcação positiva na mucosa do estômago.

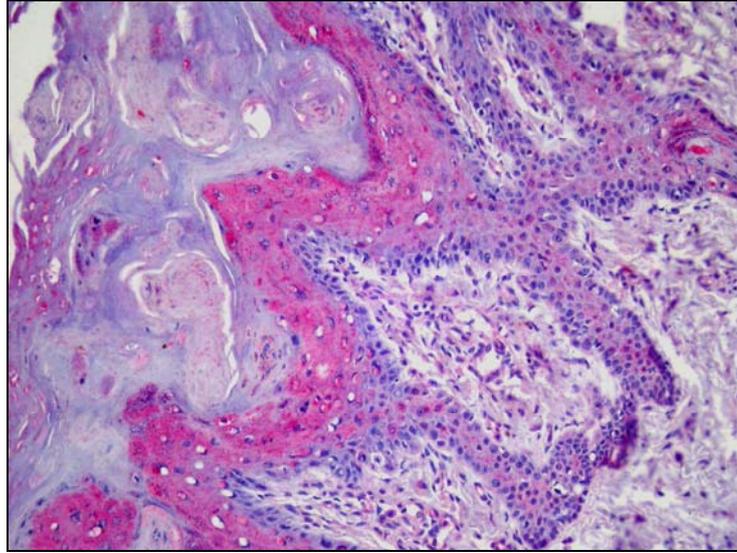


Figura 8 - Marcação positiva do antígeno no epitélio escamoso estratificado do coxim digital (imunohistoquímica anti-cinomose canina, obj. 20).

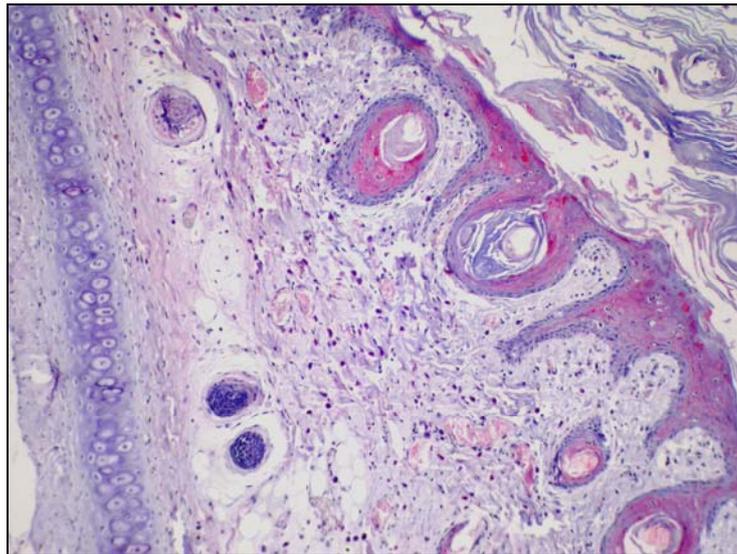


Figura 9 - Antígeno viral no epitélio do conduto auditivo de um canino (imunohistoquímica anti-cinomose canina, obj. 10).

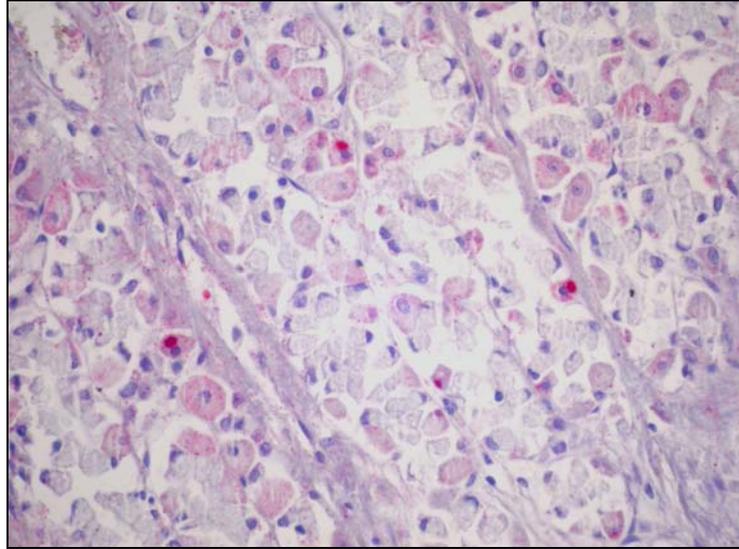


Figura 10 - Corpúsculos de inclusão viral marcados positivamente (em vermelho) na mucosa do estômago de um canino (imunohistoquímica anti-cinomose canina, obj. 40).

No pulmão, corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose canina foram observados principalmente no epitélio de brônquios e bronquíolos bem como em macrófagos alveolares e em células sinciciais (Figura 11).

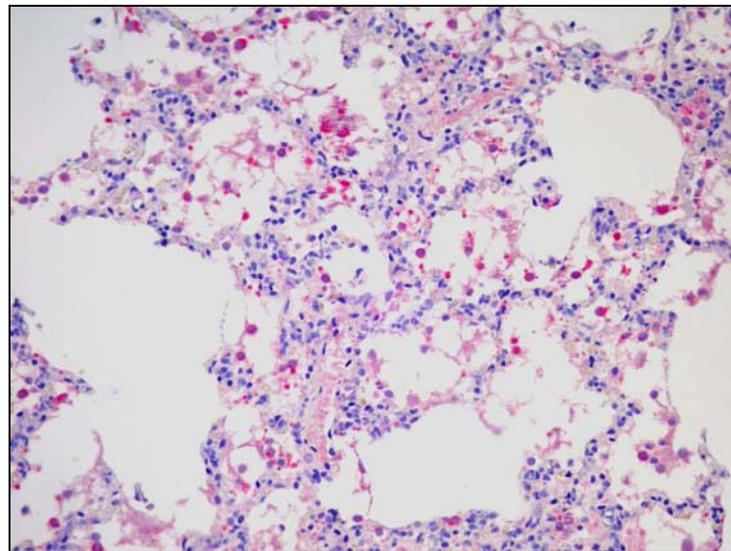


Figura 11 - Antígenos virais no citoplasma de macrófagos alveolares (imunohistoquímica anti-cinomose canina, pulmão, obj. 20).

Corpúsculos de inclusão viral foram marcados na técnica imunohistoquímica no epitélio da pelve renal e da bexiga. No intestino a marcação ocorreu principalmente no centro das placas de Peyer e no epitélio do intestino delgado. No intestino grosso foi

evidenciada marcação em células mononucleares dos folículos linfóides e no epitélio intestinal, porém a marcação positiva ocorreu em menor quantidade quando comparado ao intestino delgado.

No cerebelo, cérebro e medula espinhal a marcação positiva para a cinomose canina se evidenciou principalmente em astrócitos (Figura 12), células da microglia, como em células do epêndima e em neurônios (Figura 13). Em animais onde os manguitos perivascularares eram evidentes, a marcação do antígeno foi próxima a estas áreas. Obteve-se a confirmação da marcação positiva do antígeno viral em astrócitos através da imunistoquímica anti-GFAP (Figura 14A e 14B). A marcação imunistoquímica dos animais com alterações no encéfalo e suas principais lesões microscópicas estão demonstradas na Tabela 8. Em 2 animais não se observou alterações microscópicas no cérebro e cerebelo, porém o antígeno viral foi visualizado através do teste imunistoquímico.

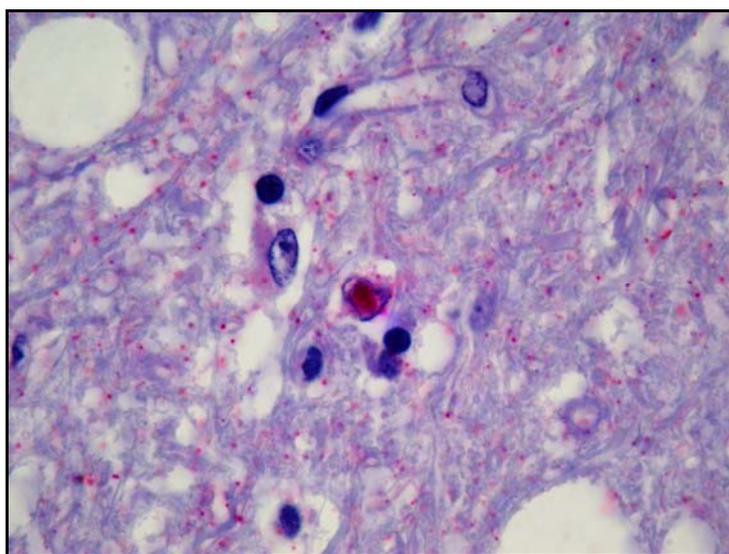


Figura 12 - Corpúsculo intranuclear em astrócito com marcação positiva do antígeno (imunistoquímica anti-cinomose canina, cerebelo, obj. 100).

Tabela 8 - Principais lesões microscópicas e marcação imunoistoquímica anti-cinomose canina de 31 cães que apresentavam alterações histológicas e/ou imunoistoquímicas no encéfalo.

Nº do cão	CÉREBRO				CEREBELO			
	D	MP	CI	IHQ	D	MP	CI	IHQ
1	+	+	-	+	+	+	-	+
2	+	-	-	+	+	-	-	+
5	+	-	-	-	+	-	-	-
8	+	-	-	+	+	-	-	+
10	-	-	-	+	-	-	-	+
12	+	-	-	-	+	-	-	+
13	-	-	-	-	+	-	-	+
14	-	-	-	-	+	-	+	+
18	+	-	-	-	+	-	-	-
19	+	-	-	-	-	-	+	-
20	-	-	-	-	+	-	-	+
21	+	-	-	-	+	-	-	+
23	-	-	-	-	+	-	-	+
26	-	-	-	-	+	-	-	+
27	-	-	-	-	+	-	-	+
28	-	-	-	-	+	-	+	+
29	+	-	-	-	+	-	-	-
30	+	-	-	+	+	-	-	+
31	-	-	-	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	+	-	+	-
34	+	-	-	+	+	-	-	+
36	-	-	-	-	+	-	-	+
37	-	-	+	-	-	-	-	+
41	+	-	-	-	+	+	-	+
42	-	-	-	-	+	-	-	+
45	+	-	-	-	+	+	-	-
46	-	-	-	-	+	-	+	+
48	-	+	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	+	-	-	+
52	-	+	+	-	-	+	+	-
54	-	+	-	-	+	+	-	+

D (Desmielinização), MP (Manguito Perivascular), CI (Corpúsculos de Inclusão Viral), IHQ (Imunoistoquímica).

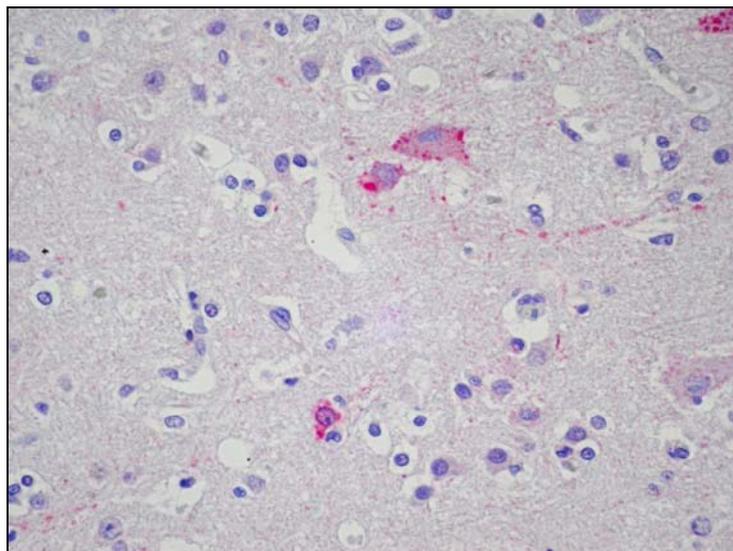


Figura 13 – Antígeno viral em neurônios (imunoistoquímica anti-cinomose canina, cérebro, obj. 40).

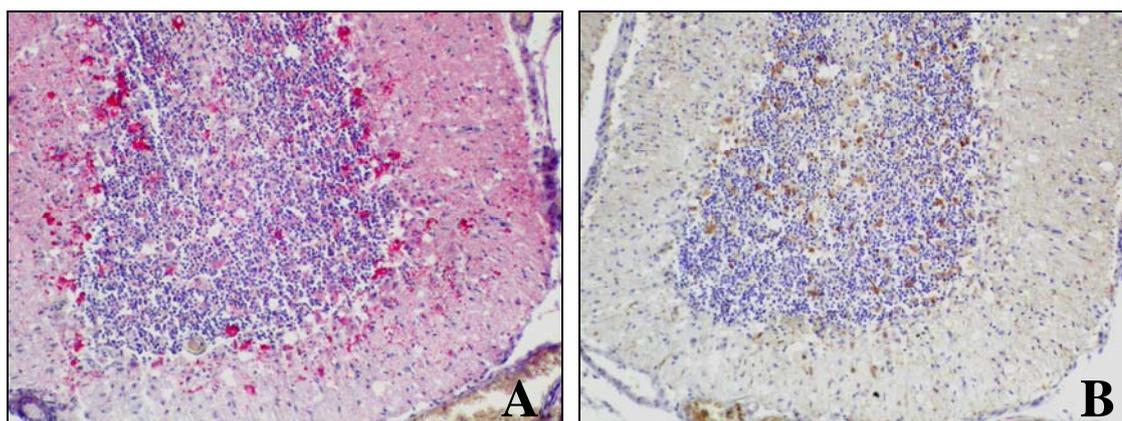


Figura 14 - A. Imunoistoquímica anti-cinomose canina do cerebelo de um canino (obj. 20). **B.** Imunoistoquímica anti-GFAP na mesma área do cerebelo do canino (obj. 20).

A língua apresentou marcação positiva com a identificação do antígeno viral no epitélio escamoso estratificado principalmente na região dorsal e raramente na porção ventral da língua.

Nas tonsilas, o antígeno viral foi visualizado nos corpúsculos de inclusão presentes no epitélio, além de poder ser observada em histiócitos e linfócitos do tecido linfóide. Timo, linfonodos mesentéricos e baço apresentaram marcação positiva em linfócitos e histiócitos no tecido linfóide. Nos linfonodos mesentéricos foi evidenciada marcação principalmente nos centros foliculares (Figura 15) e no baço no centro dos folículos linfóides (polpa branca).

No olho, a marcação do antígeno viral foi visualizada nas células ganglionares da retina em 12,8% (5/39) dos caninos (Figura 16).

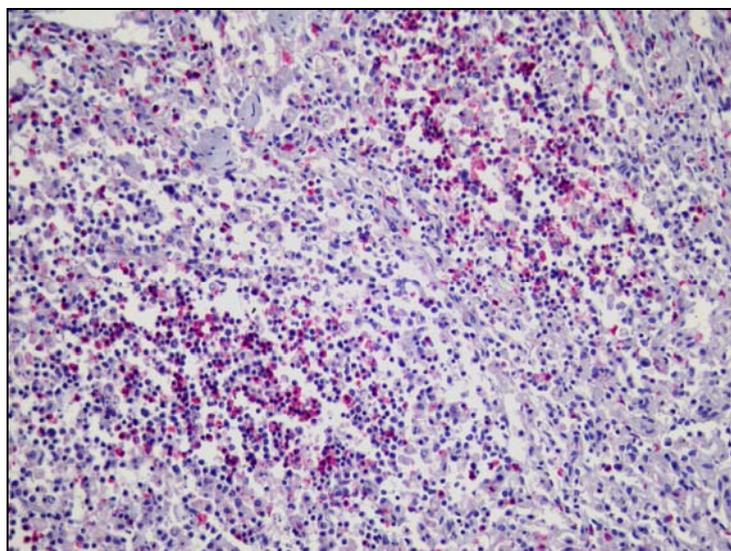


Figura 15 - Marcação positiva nos centros foliculares (imunohistoquímica anti-cinomose canina, linfonodo mesentérico, obj. 20).

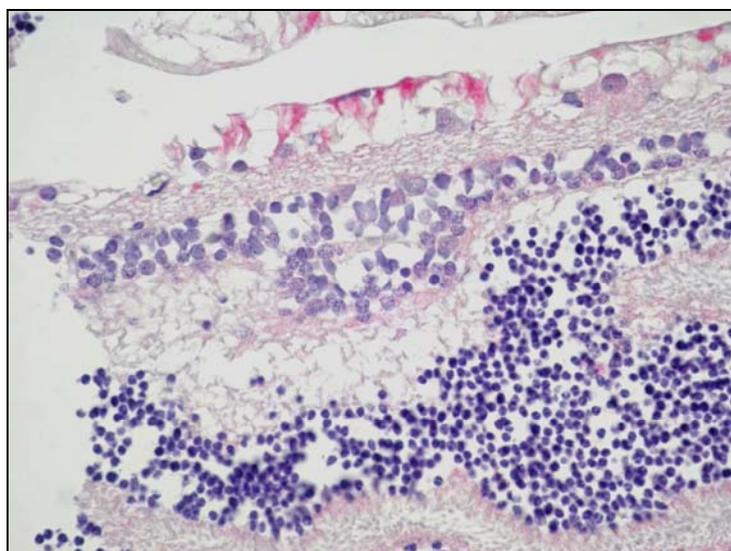


Figura 16 - Células ganglionares da retina marcadas positivamente (imunohistoquímica anti-cinomose canina, obj. 40).

No fígado a marcação do antígeno em células de Kupffer ocorreu em 2 casos dos 45 analisados. Na medula óssea a marcação positiva foi visualizada no citoplasma de células mononucleares.

No testículo e epidídimo, a marcação do antígeno viral foi evidenciada em 31,6% dos casos, sendo este principalmente visualizado no epitélio do epidídimo. No coração não foi observada marcação em nenhum dos animais analisados.

4.5 Resultados Bacteriológicos

De 54 pulmões analisados durante a necropsia, 30 foram submetidos para cultivo bacteriano aeróbico. Dos 30 pulmões analisados, 16 (53,3%) obtiveram crescimento bacteriano significativo. Os microorganismos isolados no cultivo dos pulmões estão relacionados na Tabela 7. Em três dos animais houve crescimento bacteriano de mais de um agente. Dois animais apresentavam pneumonia bacteriana por *Escherichia coli* e *Staphylococcus* sp., e em um dos animais havia infecções pulmonar concomitante por *Streptococcus* sp., *E. coli* e *Staphylococcus* sp.

Tabela 9 - Agentes bacterianos isolados dos pulmões de 16 caninos com infecção bacteriana secundária à infecção pelo vírus da cinomose canina.

Microorganismo isolado	Número de cães afetados
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3
<i>Staphylococcus</i> sp.	3
<i>Klebsiella</i> sp.	2
<i>Streptococcus</i> sp.	1
<i>Aeromonas</i> sp.	1
<i>Pasteurella haemolytica</i>	1

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho demonstra que animais entre 2 a 6 meses de idade (78,5%) foram mais predispostos a se infectarem pelo vírus da cinomose canina, resultado este relatado por outros autores (JÓZWIK; FRYMUS, 2002; GREENE; APPEL, 2006). Apesar do vírus poder afetar todas as idades, os filhotes são mais predispostos, principalmente pela queda da imunidade materna, não utilização de vacinas e a realização de programas de imunização incorretos (SWANGO, 1997). Embora tenha sido observado o sexo masculino (59,26%) como o mais acometido e entre as raças encontrado o maior percentual de animais sem raça definida (44,44%), seguido da raça Poodle (11,11%), nenhuma predisposição sexual ou racial é comprovada na cinomose canina (HEADLEY; GRAÇA, 2000; GREENE, APPEL *et al.*, 2006).

Alterações macroscópicas como secreção ocular e nasal, hiperqueratose dos coxins digitais e pulmões não colabados, edemaciados e de coloração avermelhada foram encontradas no presente trabalho, como também observadas por outros autores (KOUTINAS *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2007). A hiperemia da mucosa do intestino, evidencição das placas de Peyer e o conteúdo intestinal diarréico foram achados macroscópicos importantes, embora em oito cães a verminose discreta poderia ter sido a responsável pelo aparecimento de lesões intestinais. A atrofia do timo foi visualizada em 45,7% dos casos, um achado importante também descrita em outros estudos (KRAKOWKA; HIGGINS; KOESTNER, 1980; MORO *et al.*, 2003).

A hidrocefalia esteve presente em dois casos. Entretanto, em ambos, lesões histológicas sugestivas de cinomose não foram observadas. Adicionalmente antígenos virais de cinomose não foram detectados no teste de imunoistoquímica realizado. A hidrocefalia pode ser congênita, associada a malformações, ou adquirida, devido a processos inflamatórios ou pela compressão por abscessos ou neoplasias (MANDARA; PAVONE; VITELLOZZI, 2007). Com isso acredita-se que a hidrocefalia neste caso fosse proveniente de alterações congênitas.

A presença de *Malassezia pachydermatis* no conduto auditivo externo esteve presente em 12 dos animais analisados e a *Candida* sp. em um dos cães. As otites fúngicas neste caso podem estar relacionadas com a imunodepressão juntamente com a utilização de antimicrobianos como tratamento sintomático da cinomose canina. Segundo Cafarchia *et al.* (2005) animais de orelha pendular apresentam uma maior

predisposição a infecções fúngicas pela *M. pachydermatis*. No presente estudo, dos 13 cães com otite fúngica 10 apresentavam orelha pendular. Embora não tenha sido possível associar a otite fúngica com a infecção causada pelo vírus da cinomose, não se descarta a possibilidade da otite estar associada à infecção viral ou ao uso de antimicrobianos no tratamento suporte da cinomose. Em 31 cães com secreção ceruminosa otológica 20 apresentaram alterações histológicas compatíveis com otites bacterianas e fúngicas, entretanto em 11 cães nenhum agente infeccioso foi encontrado. Este resultado pode estar relacionado à prévia utilização de medicamentos.

A presença de placas fibrinonecroticas sobre a língua e palato observada em um dos animais foi relacionada à infecção por *Candida* sp. A infecção por este microorganismo geralmente é relacionada ao tratamento com antimicrobianos que matam a flora microbiana normal, bem como o processo de imunodepressão (GELBERG, 2007).

Kubo *et al.* (2007) encontrou inclusões virais na bexiga de caninos infectados pelo vírus da cinomose em 73% dos casos. Esse dado difere do encontrado no presente estudo onde, apenas 27,7% dos animais apresentaram corpúsculos de inclusão na bexiga. Estes resultados sugerem que a descamação observada no epitélio da bexiga contribua de forma negativa na visualização dos corpúsculos de inclusão. A degeneração hidrópica do epitélio da bexiga encontrada em sete animais do estudo, também foi relatada por outros autores como um achado microscópico em cães com cinomose (LIANG *et al.*, 2007).

As principais alterações microscópicas encontradas em órgãos linfóides foram à depleção linfóide e necrose centro-folicular, sendo estas alterações descritas por outros autores (LAN *et al.*, 2006). Corpúsculos de inclusão viral em folículos linfóides foram visualizados, porém sua distinção de restos celulares é difícil como também relatado por Krakowka, Higgins e Koestner (1980).

No encéfalo, principalmente no cerebelo, a principal lesão microscópica evidenciada foi a desmielinização que ocorreu em 89,6% dos casos. Resultado este semelhante ao encontrado por Silva *et al.* (2007) no qual a desmielinização foi encontrada em 89,4% dos cães. Observou-se infiltrado perivascular somente em 20,7% dos animais analisados, resultado este diferente do relatado por outros autores (RAW *et al.*, 1992; KOUTINAS *et al.*, 2002). Silva *et al.* relata que 46,8% dos animais apresentavam desmielinização e manguitos perivasculares enquanto que em 9,2% dos cães foi observado somente manguitos perivasculares. A diferença entre os resultados

encontrados pode ser explicada pelo tipo de cepa viral, uma vez que algumas cepas apresentam tropismo pelos neurônios causando necrose laminar cortical, enquanto outras têm tropismo por astrócitos e oligodendrócitos causando desmielinização e outras causam infecções persistentes no sistema nervoso central (KOUTINAS *et al.*, 2002).

No intestino delgado a principal alteração microscópica observada foi a enterite mononuclear encontrada em 11,8% dos animais analisados, alteração também observada por Okita *et al.* (1997).

Na análise do método imunoistoquímico a melhor recuperação antigênica foi quando utilizado calor conforme já demonstrado por Ramos-Vara (2000) com o tempo em 3 minutos. O método de streptavidina-biotina ligada a fosfatase foi melhor que o método streptavidina-biotina ligada a peroxidase, demonstrando uma marcação mais evidente. O cromógeno Permanent Red favoreceu a visualização da marcação positiva principalmente em órgãos como pálpebra e coxins digitais no qual a presença de melanina pode confundir com a marcação em marrom pelo cromógeno DAB.

O tempo de fixação da amostra se mostrou importante, uma vez que os órgãos fixados em formalina 10% tamponada por mais de um mês demonstraram perder a marcação positiva. Em um dos animais onde os tecidos tiveram tempo de fixação de uma semana não houve a marcação dos corpúsculos de inclusão que se apresentavam no estômago, podendo esta não marcação estar relacionada ao tempo de fixação. Ramos-Vara (2005) relata que a fixação em formaldeído causa mudanças conformacionais nas macromoléculas que pode tornar a ligação com o anticorpo mais difícil ou até impossível. Um dos cães, que apresentou marcação imunoistoquímica positiva para cinomose em órgãos como coxins digitais, apresentava no estômago numerosos corpúsculos de inclusão que não obtiveram marcação, podendo esta estar relacionada com a especificidade e sensibilidade do teste.

Os órgãos que obtiveram maior número de marcações foram os coxins digitais demonstrando ser este um bom órgão para a detecção do vírus da cinomose canina pela técnica de imunoistoquímica. Segundo Koutinas *et al.* (2004) os coxins digitais mesmo quando não apresentam corpúsculos de inclusão viral podem apresentar marcação imunoistoquímica intensa no epitélio. Haines *et al.* (1999) relatou que os coxins digitais bem como a mucosa nasal e a pele podem ser bons órgãos para a realização da técnica inclusive como diagnóstico *ante mortem*.

O estômago é um dos órgãos de eleição para o diagnóstico histológico e imunoistoquímico da cinomose canina devido ao fato deste geralmente conter um

grande número de corpúsculos de inclusão viral (DUCATELLE; COUSSEMENT; HOORENS, 1980), sendo resultados similares também observados no presente trabalho. Órgãos como pálpebra, orelha e língua demonstraram bons resultados na análise imunistoquímica, podendo a orelha, por exemplo, ser utilizada tanto no diagnóstico *ante mortem* como *post mortem* da cinomose canina.

A marcação imunistoquímica em órgãos linfóides ocorreu no citoplasma de histiócitos e na superfície de linfócitos, resultados similares também relatados por outros autores (IWATSUKI *et al.*, 1995; KUMAGAI *et al.*, 2004). A marcação foi evidenciada principalmente nos folículos linfóides de baço, linfonodo e tonsila. Segundo Iwaysuki, Okita e Ochikubo (1995) tanto linfócitos T como B podem ser susceptíveis a infecção natural pelo vírus da cinomose canina. Na tonsila a presença de antígeno marcado positivamente também ocorreu no epitélio.

Na imunistoquímica do intestino delgado houve marcação positiva em 31,3% dos casos, sendo o antígeno viral detectado tanto no epitélio intestinal como em linfócitos e histiócitos nas placas de Peyer e folículos linfóides. Em alguns animais onde não se observou enterite, a detecção do antígeno ocorreu somente em células mononucleares do tecido linfóide. A autólise da mucosa intestinal esteve presente em alguns dos animais, porém a marcação do antígeno ainda pôde ser visualizada. Antígenos virais da cinomose canina também foram visualizados por Okita *et al.* (1997) no epitélio intestinal de animais com sinais clínicos de gastrenterite.

A marcação positiva no cérebro, cerebelo e medula espinhal ocorreu principalmente em astrócitos, esta localização pôde ser confirmada pela utilização da imunistoquímica anti-GFAP. O antígeno viral também estava presente em células da microglia bem como em células do epêndima e neurônios, porém estes últimos observados em poucos animais. Em 2 casos não houve alterações microscópicas no cérebro e cerebelo, porém o antígeno foi visualizado quando realizado o teste imunistoquímico. Na histologia do encéfalo de 4 cães observou-se corpúsculo de inclusão viral, porém quando realizado a imunistoquímica estes corpúsculos, que estavam em pequeno número, não foram mais visualizados e não houve marcação nestes órgãos. O antígeno viral foi encontrado predominantemente no cerebelo e menos frequentemente no cérebro dos caninos analisados. Van Moll *et al.* (1995) encontrou resultados semelhantes, no cerebelo o autor observou a presença do antígeno na camada molecular em processos das células da glia e em células adjacentes a leptomeninge.

Em 3 casos onde havia alterações macroscópicas e microscópicas compatíveis com cinomose canina, não houve marcação do antígeno da cinomose canina. Em 2 dos casos a presença de manguitos perivasculares com variável desmielinização demonstravam serem formas mais crônica da doença. Alldinger *et al.* (2000) relata que o antígeno da cinomose encontra-se ausente ou restrito as áreas de lesões em casos mais crônicos. Com isso a não marcação do antígeno nestes casos pode ser explicada.

No exame imunoistoquímico do olho dos animais analisados observou-se em 5 cães (12,8%) a presença do antígeno viral nas células ganglionares da retina. Corpúsculos de inclusão ocorrem em 30 a 40% dos casos sendo estes encontrados nas células ganglionares ou em células da glia (WILCOCK, 1992). Summers, Cumming e Lahunta (1995) relatam que animais com a doença na fase neurológica podem apresentar coriorretinite. Wilcock (1992) relata que a esta alteração ocorreu em 25% dos animais submetidos à análise histológica, resultado diferente do que o descrito neste trabalho no qual não foi observado alteração microscópica do olho.

No fígado, observou-se o antígeno viral nas células de Kupffer em somente 4,4% dos animais, sendo que outros autores também relatam a presença do antígeno nestas células (JONES; HUNT; KING, 2000).

Na medula óssea o antígeno foi visualizado em células mononucleares em 6,1% dos animais, Mee *et al.* (1995) utilizou cultivo viral em células da medula óssea demonstrando o antígeno nestas células.

O antígeno viral foi observado no testículo e epidídimo em 31,6% dos animais analisados, sendo o antígeno encontrado principalmente no epidídimo, conforme também demonstrado por Appel (1969).

No cultivo bacteriano 53,3% dos pulmões obtiveram crescimento bacteriano significativo, porém em 4 animais que foi visualizado a presença de infiltrado purulento e não houve crescimento bacteriano significativo. Este resultado pode estar relacionado ao tratamento com antimicrobianos utilizado na terapia suporte da cinomose. A imunossupressão causada pelo vírus pode ocasionar associações com outros vírus e com *Bordetella bronchiseptica* e *Mycoplasma* sp. (DAMIÁN *et al.*, 2005; ERLES *et al.*, 2004). Pneumonias bacterianas causadas por invasores oportunistas são comuns, sendo os isolados mais comumente encontrados: *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Klebsiella* sp. (HAWKINS, 1995), resultado este similar ao que encontramos no presente estudo.

6. CONCLUSÕES

A secreção nasal e ocular, espessamento dos coxins digitais, pulmões não colabados e de coloração avermelhada, atrofia do timo e conteúdo intestinal diarréico com aumento das placas de Peyer foram os principais achados macroscópicos encontrados.

A presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmático e intranuclear do vírus da cinomose canina foi um achado microscópico importante para o diagnóstico da cinomose canina. Porém em alguns órgãos a sua detecção pode ser difícil como ocorre, por exemplo, em órgãos linfóides.

O melhor método imunistoquímico encontrado foi com streptavidina-biotina ligada a fosfatase alcalina, com a utilização de calor por 3 minutos na recuperação antigênica e anticorpo monoclonal anti-cinomose canina na diluição de 1:400.

Os coxins digitais, estômago, pálpebra, orelha, tonsila e linfonodos foram os melhores órgãos para a detecção do antígeno viral da cinomose canina pelo teste imunistoquímico.

No sistema nervoso central a imunistoquímica é um bom método para a detecção do antígeno do vírus da cinomose, uma vez que corpúsculos de inclusão viral não são facilmente visualizados nestes órgãos.

A imunistoquímica é um importante método auxiliar no diagnóstico da cinomose canina, permitindo a visualização do antígeno viral em locais onde estes não são observados facilmente e inclusive em tecidos com autólise.

Os agentes bacterianos mais comumente isolados de pulmões de cães com cinomose foram *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus* sp. e *Klebsiella* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, K. A.; APPEL, M. J. G. African wild dogs (*Lycaon pictus*) endangered by a canine distemper epizootic among domestic near the Masai Mara National Reserve, Kenya. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 30, n. 4, p. 481-485, 1994.
- ALLDINGER, S. *et al.* Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. **Acta Neuropathologica**, v. 99, p. 138-146, 2000.
- ALVES, C. M. *et al.* Morphometric analysis of the thymus of puppies with the Snyder Hill Strain of canine distemper virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 472-479, 2006.
- AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v. 82, p. 416-422, 2007.
- APPEL, M. J. G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 7, p. 1167-1182, 1969.
- APPEL, M. J. G. Distemper pathogenesis in dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1681-1684, 1970.
- APPEL, M. *et al.* Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, n. 6, p. 803-806, 1974.
- APPEL, M. J. G.; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B. A. Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 4, p. 258-263, 1992.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 187-191, 1995.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine distemper: current status. **International Veterinary Service**, 1999. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel/ivis.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2008.

AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S. Experimental old dog encephalitis (ODE) in gnotobiotic dog. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 527-534, 1998.

BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 3-13, 1999.

BLAKEMORE, W. F.; SUMMERS, B. A.; APPEL, M. G. J. Evidence of oligodendrocytes infection and degeneration in canine distemper encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, v. 77, p. 550-553, 1989.

BRUNNER, J. *et al.* Canine distemper virus infection of primary hippocampal cells induces increase in extracellular glutamate and neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, p. 1184-1195, 2007.

BUSSELL, R. H. Comments on pathogenesis of canine distemper. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1684-1686, 1970.

CAFARCHIA, C. *et al.* Occurrence and population size of *Malassezia* spp. In the external ear canal of dogs and cats both healthy with otitis. **Mycopathologia**, v. 160, p. 143-149, 2005.

CARPENTER, M. A. *et al.* Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, p. 259-266, 1998.

CHALKER, V. J. *et al.* Mycoplasmas associated with canine infections respiratory disease. **Microbiology**, v. 150, p. 3491-3497, 2004.

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

CHVALA, S. *et al.* Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection is a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 508-512, 2007.

DAMIÁN, M. *et al.* Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 289-293, 2005.

DI GUARDO, G. *et al.* Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. **Journal of Veterinary Medicine A**, v. 52, p. 88-93, 2005.

D'INTINO, G. *et al.* A molecular study of hippocampus in dogs with convulsion during canine distemper virus encephalitis. **Brain Research**, v. 1098, p. 186-195, 2006.

DUBIELZIG, R. R. The effect of canine distemper virus on the ameloblastic layer of the developing tooth. **Veterinary Pathology**, v. 16, p. 268-270, 1979.

DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W.; HOORENS, J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody – enzyme method. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 11, p. 1860-1862, 1980.

DYER, N. W.; SCHAMBER, G. J. Pneumocystosis associated with canine distemper virus infection in a mink. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 40, p. 577-578, 1999.

ENGELHARDT, P. *et al.* Canine distemper virus associated proliferation of canine footpad keratinocytes in vitro. **Veterinary Microbiology**, v. 107, p. 1-12, 2005.

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.

FAIRCHILD, G. A.; WYMAN, M.; DONOVAN, E. F. Fluorescent antibody technique as a diagnostic test for canine distemper infection: detection of viral antigen in epithelial tissue of experimentally infected dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 28, n. 124, p. 761-768, 1967.

FENNER, W. R. Moléstias do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4^a ed., 1995, v. 1, cap. 82, p. 819- 889.

FORSYTH, M. A. *et al.* Canine distemper virus in a Caspian seal. **Veterinary Record**, v. 143, p. 662-664, 1998.

GEBARA, C. M. S. *et al.* Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 2, p.168-174, 2004.

GELBERG, H. B. Alimentary System In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 301-391.

GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper In: **Infections disease of the dog e cat**. 3th ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006, p. 25-41.

GRÖNE, A.; ENGELHARDT, P.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection: proliferation of canine footpad keratinocytes. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 574-578, 2003.

GRÖNE, A.; DOHERR, M. G.; ZURBRIGGEN, A. Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. **Veterinary Dermatology**, v. 15, p. 159-167, 2004.

GROSS, T. L.; IHRKE, P. J; WALDER, E. J. In_____. **Veterinary dermatopathology**. St. Louis: Mosby Year Book, 1992. cap. 6, p. 68-110.

HAINES, D. M. *et al.* Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection, **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, p. 396-399, 1999.

HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus – a morbillivirus in search of new host? **Trends in Microbiology**, v. 5, p. 120- 124, 1997.

HAWKINS, E. C. Afecções do sistema respiratório inferior. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4^a ed., 1995, v. 1, cap. 82, p. 819- 889.

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, p. 83-86, 2000.

HEADLEY, S. A.; SOARES, I. C.; GRAÇA, D. L. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) – immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v.125, p. 90-97, 2001.

IWATSUKI, K. *et al.* Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs old dogs naturally infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, p. 185-190, 1995.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Relation of Clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 47-56, 2002.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 2-9, 2004.

KRAKOWKA, S.; KOESTNER, A. Comparison of canine distemper virus strain in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissue. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 12, p. 1919- 1922, 1977.

KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R. J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissue. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 2, p. 284- 292, 1980.

KUBO, T. *et al.* Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 5, p. 527-529, 2007.

KUIKEN, T. *et al.* The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors. **Veterinary Pathology**, v. 43, p. 321-338, 2006.

KUMAGAI, K. *et al.* Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 2, p. 175-181, 2004.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia veterinária**. 6. ed. Barueri: Manole. 2000, 1415p.

JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 49, p.413-414, 2002.

LAN, N. T. *et al.* Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 115, p. 32-42, 2006.

LAN, N. T. *et al.* Comparison of molecular and growth properties for two different canine distemper virus clusters, Asia 1 and 2, in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 7, p. 739-744, 2007.

LEMBERGER, K.Y. *et al.* *Neospora caninum* infection in a free-ranging raccoon (*Procyon lotor*) with concurrent canine distemper virus infection. **The Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 960-961, 2005.

LIANG, C. T. *et al.* A non-biotin polymerized horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, p. 57-64, 2007.

LÓPEZ, A. Respiratory System In: MCGAVIN, M. D; ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 4th ed. St. Louis: Mosby Elsevier, 2007. p. 463-542.

MANDARA, M. T.; PAVONE, S.; VITELOZZI, G. Internal hydrocephalus and associated periventricular encephalitis in a young fox. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 713-716, 2007.

MARTELLA, V. *et al.* Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. **Molecular and Cellular Probes**, v. 16, p. 77-83, 2002.

MASUDA, M. *et al.* Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 29, p. 157-165, 2006.

MCCANDLISH, I. A. P. *et al.* Distemper encephalitis in pups after vaccination of the dam. **Veterinary Record**, v. 130, p. 27-30, 1992.

MEE, A. P. *et al.* Canine bone marrow cell cultures infected with canine distemper virus: an in vitro model of Paget's disease. **Bone**, v. 17, n. 4, p. 461-466, 1995.

MOHANTY, S. B.; DUTTA, S. K. **Veterinary Virology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1981, 372p.

MORETTI, L.A. *et al.* *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and Ehrlichiosis Rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 359-363, 2006.

MORO, L. *et al.* Apoptosis in canine distemper. **Archives of Virology**, v. 148, p. 153-164, 2003.

MORO, L. *et al.* Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). **Biosciense Journal**, v. 20, n.2, p. 171-178, 2004.

NISHI, T. *et al.* Involvement of apoptosis in syncytial cell death induced by canine distemper virus. **Comparative Immunology, Microbiology & Infections Disease**, v. 27, p. 445-455, 2004.

OKITA, M. *et al.* Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. **Journal of Comparative Pathology**, v. 116, p. 403-408, 1997.

PANDHER, K. *et al.* Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 201-204, 2006.

PARDO, M. C. *et al.* Immunization of puppies in the presence of maternally derived antibodies against canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, p. 70-75, 2007.

POTGIETER, L. N. D; AJIDAGBA, P. A Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, p. 110-115, 1989.

PROPHET, E. B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: American Registry of Pathology, 1992. 274p.

QUINN, P. J. *et al.* *Paramyxoviridae*. In :_____. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 65, p. 372-379.

RAMOS-VARA, J. A.; BEISSENHERZ, M. E. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: experience with 63 markers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, p. 307-311, 2000.

RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 405-426, 2005.

RAW, M. E. *et al.* Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs. **Veterinary Record**, v. 130, p. 291-293, 1992.

RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Vaccine coverage, herd immunity and occurrence of canine distemper from 1990-1996 in Finland. **Vaccine**, v. 25, p. 7994-7998, 2007.

ROELKE-PARKER, M. E. *et al.* A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v. 379, n. 1, p. 441-445, 1996.

RUDD, P. A.; CATTANEO, R.; VON MESSLING, V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. **Journal of Virology**, v. 80, n. 19, p. 9361-9370, 2006.

SAITO, T. B. *et al.* Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 116-119, 2006.

SCHOBESBERGER, M. *et al.* Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis? **Acta Neuropathologica**, v. 97, p. 279-287, 1999.

SCHOBESBERGER, M. *et al.* Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, p. 33-44, 2005.

SEEHUSEN, F. *et al.* Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesion? **Acta Neuropathologica**, v. 114, p. 597-608, 2007.

SILVA, M. C. *et al.* Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 215-220, 2007.

SIPS, G. J. *et al.* Involvement of Morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 223-244, 2007.

SOMA, T. *et al.* Detection of canine distemper virus antigen in canine serum and its application to diagnosis. **Veterinary Record**, v. 153, p. 499-501, 2003.

STANTON, J. B. *et al.* Immunohistochemical analysis of two strains of lion (*Panthera leo*) – adapted canine distemper virus in ferret (*Mustela putorius furo*). **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 464-467, 2003.

STEIN, V. M. *et al.* Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. **Journal of Neuroimmunology**, v. 153, p. 122-131, 2004.

SUMMERS, B. A.; CUMMING, J. F.; LAHUNTA, A. Inflammatory disease of the central nervous system In: _____. **Veterinary neuropathology**. St. Louis: Mosby, 1995, chap.3, p. 95-188.

SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed., 1997, v. 1, cap. 82, p. 819- 889.

TOVAR, L. E. R. *et al.* Combined distemper adenoviral pneumonia in a dog. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 48, p. 632-634, 2007.

VAN MOLL, P. *et al.* Distemper in wild carnivores: An epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, p. 193-199, 1995.

VANDEVELDE, M. *et al.* Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs. **Veterinary Pathology**, v. 17, p. 17-29, 1980.

VANDEVELDE, M. *et al.* Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 59, p. 269-276, 1983.

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

WENZLOW, N. *et al.* Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. **Veterinary Pathology**, v. 44, p. 943-948, 2007.

WILCOCK, B. P. The eye and ear In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1992. chap. 4, p. 441-529.

WISNICKY, W.; WIPF, L. Significance of inclusion bodies of distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v. 3, p. 285-288, 1942.

ZEE, Y. C. *Paramyxoviridae*. In: HIRSH, D. C., ZEE, Y. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 374-378.

ZURBRIGGEN, A. *et al.* Oligodendroglial pathology in canine distemper. **Acta Neuropathologica**, v. 95, p. 71-77, 1998.