

Diagnóstico de cinomose canina por RT-PCR em amostras de cães do estado de São Paulo enviadas para o diagnóstico laboratorial da raiva

Canine distemper diagnosis by RT-PCR in dog samples from São Paulo State submitted to rabies laboratory diagnosis

Resumo

A cinomose canina (CD) é uma das doenças infecciosas mais importantes dos cães domésticos. No Brasil é ainda a principal causa de mortalidade de cães em algumas populações urbanas. Embora sequências de diferentes genes do vírus sejam utilizadas como alvo para detecção do vírus da cinomose canina (CDV), o gene N parece ser o melhor para a amplificação de todas as suas linhagens. Utilizando-se a técnica de RT-PCR direcionada ao gene N do CDV, foram analisadas 190 amostras de sistema nervoso central (SNC) de cães do estado de São Paulo com quadros sugestivos de encefalite e que foram encaminhadas ao Instituto Pasteur para o diagnóstico da raiva, durante o ano de 2014. A positividade foi superior a 50% indicando que a cinomose continua a ser uma importante causa de mortalidade canina.

Summary

Canine distemper (CD) is one of the most important infectious diseases in domestic dogs. In Brazil, CD is still the principal cause of mortality of dogs in some urban populations. Although different viral gene sequences have been identified for detecting the canine distemper virus (CDV), the N gene appears to be a better target for the amplification of specific fragments from all CDV strains. Using RT-PCR targeted to the CDV N gene, during the year 2014 we analyzed 190 central nervous system (CNS) samples of dogs from the state of São Paulo, Brazil, with symptoms suggestive of encephalitis and sent them to the Pasteur Institute for the diagnosis of rabies. Positivity for CD was over 50%, indicating that the disease remains an important cause of canine mortality.

Recebido em 22 de julho de 2015 e aprovado em 8 de setembro de 2015

Carla Isabel Macedo¹,
 Zélia Maria Pinheiro Peixoto¹
 Juliana Galera Castilho¹
 Rafael de Novaes Oliveira¹
 Adriana Cândido Rodrigues²
 Samira Maria Achkar¹



Palavras-chave

Cinomose canina. RT-PCR.
 Encefalite. Diagnóstico.

Keywords

Canine Distemper. RT-PCR.
 Encephalitis. Diagnosis.

A cinomose canina (CD- do inglês *canine distemper*) é uma doença viral multissistêmica altamente contagiosa, de distribuição mundial, que afeta diversas espécies de mamíferos pertencentes às famílias *Canidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Felidae* e *Viverridae* (ARNS et al., 2012). Entretanto, os cães são os principais reservatórios, particularmente os cães jovens, resultando em elevada mortalidade (APPEL, 1987; BRASIL, 2008). O agente etiológico é um vírus RNA, envelopado classificado na ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbillivirus* (KING et al., 2011).

O principal diagnóstico é baseado nas manifestações clínicas dos cães. No entanto, a apresentação clínica variável pode dificultar o diagnóstico da doença principalmente nos casos de manifestação neurológica focal, quando outros sintomas sistêmicos, prévios ou concomitantes estão ausentes (GALANTE, 2009; LATHA et al., 2007; SHIN et al., 2004). Embora o número de casos de CD no mundo tenha sido significativamente reduzido com a introdução, nos anos, das vacinas atenuadas e subsequente uso extensivo, no Brasil a enfermidade ainda é endêmica em diversas áreas urbanas do país (BIAZZONO; HAGIWARA; CORRÊA, 2001; HEADLEY et al., 2012).

A cinomose não é uma zoonose, entretanto, durante os últimos 15 anos, o Instituto Pasteur (IPA), Laboratório de Referência para a Raiva no estado de São Paulo, tem realizado o diagnóstico diferencial da CD em amostras de sistema nervoso central (SNC) provenientes de cães com sintomatologia compatível com encefalite, por meio do diagnóstico histopatológico, utilizando-se o Método de Sellers (SELLERS; FELLOW, 1927).

¹ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Esta metodologia foi utilizada até o ano de 2013, como forma de triagem das amostras encaminhadas para o diagnóstico da Raiva, permitindo a visualização dos Corpúsculo de Negri e Corpúsculos de Lentz, nos casos de raiva ou cinomose, respectivamente. Embora essa técnica permita a diferenciação dos dois vírus, devido à sua baixa sensibilidade, um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção (ARNS et al., 2012).

Atualmente, a técnica de RT-PCR para o diagnóstico da CD tem sido amplamente utilizada (ARNS et al., 2012) tem sido incorporada à rotina laboratorial do IPA em 2014. O objetivo deste trabalho foi relatar os resultados obtidos com esta nova tecnologia.

Material e Métodos

Amostras

No período de janeiro a dezembro de 2014, foram analisadas 190 amostras de SNC de cães que apresentaram quadro indicativo de encefalite, provenientes de diferentes municípios do estado de São Paulo (Tabela 1).

RT-PCR

O RNA foi extraído de 0,6g das amostras de SNC utilizando-se Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Como controles positivos foram utilizados o antígeno da Vacina Lederle® e amostras de campo, previamente sequenciadas (CASTILHO et al., 2007) e, como controles negativos, amostras SNC de camundongos não infectados e água ultrapura foram incluídas em todos os ensaios. As reações de RT e PCR foram realizadas conforme descrito por Castilho et al. (2007), utilizado-se os oligonucleotídeos CDV e CDVS direcionados à região 5' do gene N descritos por Castilho et al. (2007).

Resultados e discussão

Das 190 amostras analisadas, 104 foram positivas para o vírus da cinomose pela técnica de RT-PCR, tendo-se observado a amplificação do fragmento de DNA de 480pb, em eletroforese em gel de agarose (Figura 1, Tabela 1).

As técnicas de PCR e Nested RT-PCR tem sido utilizadas para o diagnóstico antemortem e postmortem da cinomose. Embora diferentes genes tenham sido utilizados para o diagnóstico e caracterização das sequências obtidas, o gene N, altamente conservado, parece ser o melhor alvo para a amplificação de todas as espécies de CDV (ALCALDE et al., 2013; CALDERON et al., 2007; CASTILHO et al., 2007; DI FRANCESCO et

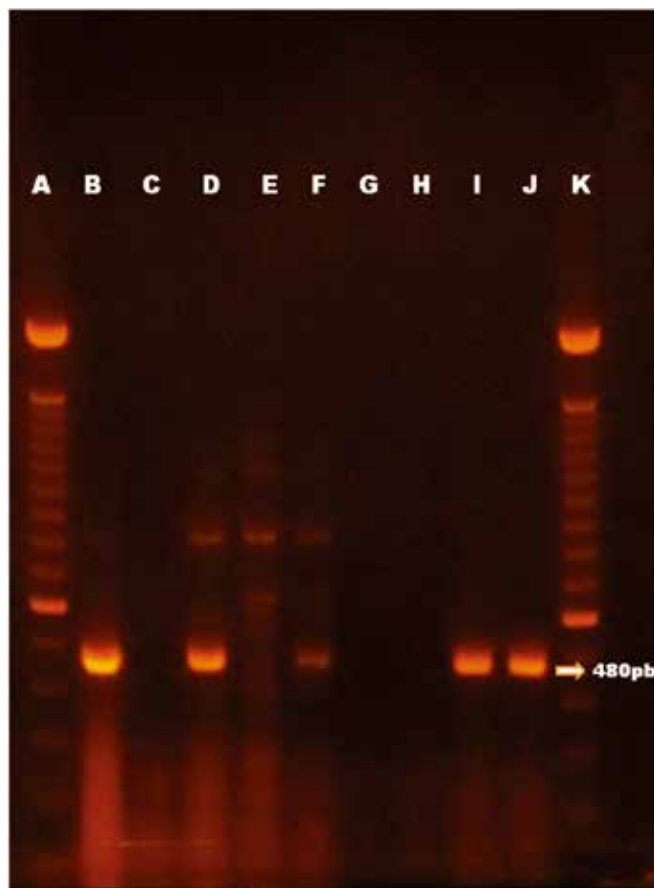


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Amplificação de DNA, por PCR, de fragmento de DNA do gene N do vírus da cinomose canina. Marcador de peso molecular em escada de 100pb ladder (A e K), amostras positivas (B, D e F), amostras negativas (C e E), controles negativos (G e H) e controles positivos (I e J). Fonte: Arquivo do Instituto Pasteur, São Paulo – SP.

al., 2012; GÁMIZ et al., 2011; KIM et al., 2006; YI et al., 2013; WANG et al., 2011) porque outros genes, menos conservados, podem possuir alterações que impeçam a ligação dos primers gerando resultados falso negativos. Esse fato faz com que muitos autores que trabalham com outros genes para melhor identificar diferentes linhagens circulantes utilizem primeiro o gene N para triagem das amostras (DI FRANCESCO et al., 2012; GÁMIZ et al., 2011; NEGRÃO et al., 2013).

Utilizando-se a técnica de RT-PCR direcionada ao gene N, este estudo demonstrou que o vírus da cinomose estava presente e pode ter sido responsável pela morte de 54,7% dos cães com quadros sugestivos de encefalite e que foram encaminhados ao Instituto Pasteur para o diagnóstico diferencial com a raiva.

Embora o objetivo desse estudo não tenha sido a realização de uma análise epidemiológica da cinomose no estado de São Paulo, podemos notar que a enfermidade é enzoótica no estado.

Conclusão

Os resultados obtidos sugerem que a cinomose continua a ser uma importante causa de mortalidade canina no estado de São Paulo. A cinomose canina deve ser incluída no diagnóstico diferencial de enfermidades que causam sintomatologia neurológica, sendo os testes laboratoriais essenciais para confirmar a infecção. 📧

Referências

ALCALDE, R. et al. Canine distemper virus: detection of viral RNA by nested RT-PCR in dogs with clinical diagnosis. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 50, n. 1, p. 74-76, 2013.

APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: APPEL, M. J. G. (Ed.). *Virus infections of carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 133-159.

ARNS, C. W. et al. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. (Org.). *Virologia veterinária: virologia geral e doenças víricas*. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 759-793.

BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. *Bra. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 38, n. 5, p. 245-250, jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de diagnóstico laboratorial da raiva*. Brasília, DF, 2008.

CALDERON, M. G. et al. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.*, Amsterdam, v. 15, n. 125, p. 341-349, Dec. 2007.

CASTILHO, J. G. et al. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arquivo Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 654-659, jun. 2007.

DI FRANCESCO, C. E. et al. Detection by hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and genetic characterization of wild type strains of Canine distemper virus in suspected infected dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Thousand Oaks, CA, v. 24, n. 1, p. 107-115, jan. 2012.

GALANTE, A. C. *Imunocromatografia, observações clínica, hematológica e bioquímica sérica de cães (Canis familiaris) com suspeita de cinomose*. 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2009.

GAMIZ, C. et al. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Vet. Res. Commun.*, [Amsterdam], v. 35, n. 6, p. 381-390, Aug. 2011.

HEADLEY, S. A. et al. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infection in Brazil: a review. *Semina: ciênc. agrárias*, Londrina, v. 33, n. 5, 1945-1978, set./out. 2012.

KIM, D. et al. Comparison of tissue and fluid samples for early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, Tokyo, v. 68, n. 8, p. 877-879, Aug. 2006.

KING, A. M. Q. et al. (Ed.). *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. New York: Academic Press, 2011.

LATHA, D. et al. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, [Amsterdam], v. 119, n. 15, p. 278-286, Oct. 2007.

NEGRÃO, F. J. et al. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. *Genet. Mol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 12, n. 3, p. 2549-2555, July 2013.

SELLERS, T. F.; FELLOW, A. P. H. A. A new method for staining Negri Bodies of Rabies. *Am. J. Public Health*, v. 17, n. 10, p. 1080-1081, 1927.

SHIN, Y. J. et al. Comparison of one-step RT-PCR and nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust. Vet. J.*, New South Wales, v. 82, n. 1-2, p. 83-86, Feb. 2004.

YI, L. et al. Complete nucleotide sequence of canine distemper virus CDV-PS, isolated from dogs in China. *Genome Announc.*, Washington, DC, v. 1, n. 3, e00232-13, May 2013.

WANG, F. et al. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in China. *Viol. J.*, [London], v. 8, p. 85, Feb. 2011.