

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE A RAIVA E A CINOMOSE CANINA EM AMOSTRAS DE CÉREBRO DE CÃES EXAMINADAS NO PERÍODO DE 1998 A 2001 NA REGIÃO DE ARAÇATUBA, SP, BRASIL

L.H. Queiroz da Silva, C.K. Morinishi, C.M. Nunes

Universidade Estadual Paulista, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, CP 341, CEP 16050-680, Araçatuba, SP, Brasil. E-mail: lhqsilva@fmva.unesp.br

RESUMO

O controle da raiva humana depende do controle da raiva, principalmente, em áreas urbanas, fazendo-se necessário implementar a vigilância epidemiológica da raiva canina. Em cães, uma das enfermidades que resulta em sintomatologia nervosa, como incoordenação motora, convulsões e ataxia, é a cinomose, a qual pode ser confundida com a raiva. No período de 1998 a 2001 o Laboratório de Raiva da UNESP / Araçatuba avaliou 1.866 amostras de sistema nervoso central (SNC) de cães, para diagnóstico de raiva. Destas, 248 amostras que apresentaram resultado negativo para raiva e eram provenientes de animais que apresentaram alterações do SNC foram analisadas pela técnica da imunofluorescência direta (IFD) para diagnóstico diferencial com cinomose. Resultados positivos foram observados em 18,9% (47 / 248) das amostras, sendo que os antígenos virais foram detectados uniformemente em todas as porções analisadas do sistema nervoso central (córtex, cerebelo e hipocampo), não tendo sido observada correlação estatística na localização preferencial do vírus.

PALAVRAS-CHAVE: Raiva canina, cinomose, diagnóstico diferencial, imunofluorescência direta.

ABSTRACT

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS BETWEEN RABIES AND CANINE DISTEMPER IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM SAMPLES FROM 1998 TO 2001 IN ARAÇATUBA REGION, SP, BRAZIL. Human rabies control could not be achieved without rabies control in dogs and the dog rabies surveillance is one of the most important measures for this goal. Some neurological symptoms of canine distemper are similar to rabies and usually they are sent for examination to rabies laboratories. A total of 1,866 canine central nervous system fragment received by the Rabies Laboratory of UNESP / Araçatuba, SP, from 1998 to 2001, were evaluated for rabies diagnosis, and 248 negative samples were submitted to differential diagnosis for canine distemper by the fluorescent antibody test. Positive results were observed in 18.9% (47 / 248) of the samples and virus antigen was detected by fluorescent antibodies uniformly in all the central nervous system areas examined (cerebral cortex, cerebellum and hippocampus), therefore, the evaluation of any fragment will be useful for the diagnosis of canine distemper.

KEY WORDS: Dog rabies, canine distemper disease, diagnosis, fluorescent antibody test.

INTRODUÇÃO

O cão continua sendo o principal reservatório do vírus rábico para seres humanos, além da principal espécie responsável pelos agravos que resultam em tratamento para a profilaxia da raiva humana, em vários os países (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004). Em áreas epidêmicas de raiva canina, o diagnóstico diferencial desta com outras doenças que provocam sintomas semelhantes apresenta particular importância quando houver o envolvimento de seres humanos envolvidos na interação com animais suspeitos (QUEIROZ DA SILVA *et al.*, 1999). A cinomose é uma destas

enfermidades, pois provoca alterações neurológicas, expressas por mioclonias, convulsões, ataxia e incoordenação motora (APPEL & SUMMERS, 1999).

Na primeira metade do século XX, a cinomose foi uma das doenças fatais mais comuns em cães em todo o mundo. Posteriormente, a partir dos anos 60 e com o surgimento de vacinas específicas, este quadro modificou-se. Atualmente, a mortalidade ainda é comum em animais não vacinados ou naqueles vacinados, em que se observa qualquer problema de falha vacinal (APPEL & SUMMERS, 1999). O agente causal da doença é um vírus RNA da família Paramixoviridae, gênero *Morbillivirus* (GREENE & APPEL, 1990). Uma das

características desta infecção é a formação de corpúsculos de inclusão eosinofílicos, denominados de corpúsculos de Lentz (BEER, 1998), que podem ser intranucleares ou intracitoplasmáticos e que são encontrados em vários tecidos, além do SNC, como nas células epiteliais da bexiga e do trato respiratório (SUREAU *et al.*, 1991). A detecção destes corpúsculos pode ser feita por meio de métodos diretos de diagnóstico, como as técnicas de coloração por hematoxilina e eosina (HE) e Sellers e a imunofluorescência direta - IFD (QUEIROZ DA SILVA *et al.*, 1999) ou de métodos indiretos, como o ELISA (POTGIETER & AJIDAGBA, 1989), a imunofluorescência indireta - IFI (SIMON VALENÇA *et al.*, 1987), a inibição da imunofluorescência indireta com uso de anticorpos monoclonais (ORWELL *et al.*, 1990) e a imunoistoquímica (NIETO *et al.*, 1987; SCHMIDT *et al.*, 1989).

No Brasil, descrições sobre a ocorrência de cinomose na espécie canina (GOUVEIA *et al.*, 1987; HEADLEY & GRAÇA, 2000) e em espécies silvestres susceptíveis (REGO *et al.*, 1997) utilizaram preferencialmente técnicas de diagnóstico histopatológico como a coloração por HE.

O diagnóstico laboratorial da raiva tem sido feito por meio da IFD e da prova biológica de inoculação em camundongos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996). A primeira técnica, descrita por DEAN & ABELSETH (1996), baseia-se na detecção, por anticorpos fluorescentes, de partículas antigênicas localizadas em diferentes porções do sistema nervoso central (SNC) de animais acometidos. Estas partículas antigênicas aparecem na forma de corpúsculos, denominados de corpúsculos de Negri, localizados no citoplasma das células ou no exterior das mesmas, quando estas se romperam.

O objetivo do presente trabalho foi realizar o diagnóstico diferencial entre a raiva e a cinomose canina, em amostras do SNC de animais suspeitos e encaminhados ao Laboratório de Diagnóstico de Raiva (LDR) da UNESP / Araçatuba, SP, no período de 1998 a 2001.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sistema nervoso central

Dentre 1866 amostras de SNC de cães enviadas ao LDR, foram selecionadas 248 negativas para raiva e cujas fichas epidemiológicas descreviam sintomas de alterações de SNC e/ou outros compatíveis com a cinomose.

Imunofluorescência direta

A técnica de IFD utilizada tanto para raiva quanto para cinomose, foi realizada conforme descrito por

QUEIROZ DA SILVA *et al.* (1999). As lâminas para IFD de raiva foram preparadas com impressões de tecido nervoso, provenientes do hipocampo e coradas segundo DEAN & ABELSETH (1996). Para a cinomose, foram feitas impressões do hipocampo ou Corno de Amon (CA), cerebelo (CE) e córtex (CT). Depois de fixadas em acetona por 30 minutos, foram coradas com conjugado para cinomose, preparado pelo LDR, a partir de soro hiperimune de cão, gentilmente cedido pelo Laboratório BIOVET®, diluído em PBS contendo 0,02% de azul de Evans.

Prova biológica

Realizada segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (KOPROWSKI, 1996), para o diagnóstico da raiva.

Análise estatística

Foi utilizado o Teste do Qui-Quadrado (ZAR, 1992), por meio do programa estatístico SAS, para verificar a associação entre os resultados positivo e negativo para cinomose e o tipo de fragmento do SNC examinado.

RESULTADOS

Do total de amostras (1.866) enviadas para o laboratório para o diagnóstico de raiva, no período de 1998 a 2001, 248 (13,3%) eram procedentes de animais que apresentaram sintomatologia compatível com alterações do SNC. Apenas 2 amostras foram positivas para raiva (0,1%), sendo uma no ano de 1998 e uma, em 2000. Dentre as amostras analisadas para cinomose, 18,95% (47/248) resultaram positivas (Tabela 1). As amostras positivas para cinomose pela técnica de IFD apresentaram inclusões intranucleares ou intracitoplasmáticas de forma arredondada, enquanto que para a raiva, estas inclusões apresentavam formatos e tamanhos variáveis, como mostra a Figura 1. As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência, em aumento de 400 vezes, e após a ampliação das fotos estes aumentos corresponderam, respectivamente, a 1.800 (a) e 1.600 vezes (b).

Tabela 1 - Diagnóstico diferencial entre a raiva e a cinomose canina, no período de 1998 a 2001. Araçatuba, 2004.

Resultado	Positivo		Negativo		Total
	N ^a	%	N ^a	%	
Raiva	2	0,11	1.864	99,89	1.866
Cinomose	47	18,95	201	81,05	248

Tabela 2 - Resultado da IFD para cinomose em SNC cães, segundo o número e tipo de fragmento analisado.

Nº e tipo de fragmentos analisados	Amostras positivas (%)	Amostras negativas (%)	Total
3 (CA, CO e CE)	32 (18,3)	143 (81,7)	175
2 (CA / CO; CA / CE ou CE / CO)	11 (20,0)	44 (80,0)	55
1 (CA, CE ou CO)	4 (22,2)	14 (77,8)	18
TOTAL	47 (18,9)	201 (81,1)	248

CA = Corno de Ammon ou Hipocampo; CE = cerebelo; CO = córtex.

Teste do Qui-Quadrado: $p = 0,8980$.

Tabela 3 - Resultado da IFD para cinomose em cães, segundo o fragmento do SNC analisado.

Tipo de fragmentos analisados	Amostras positivas (%)	Amostras negativas (%)	Total
Hipocampo ou Corno de Ammon (CA)	33 (14,8)	190 (85,2)	223
Cerebelo (CE)	29 (14,9)	166 (85,1)	195
Córtex (CT)	31 (13,2)	204 (86,8)	235
TOTAL	47 (18,9)	201 (81,1)	248

CA = Corno de Ammon ou Hipocampo; CE = cerebelo; CO = córtex.

Teste do Qui-Quadrado: $p = 0,8470$.

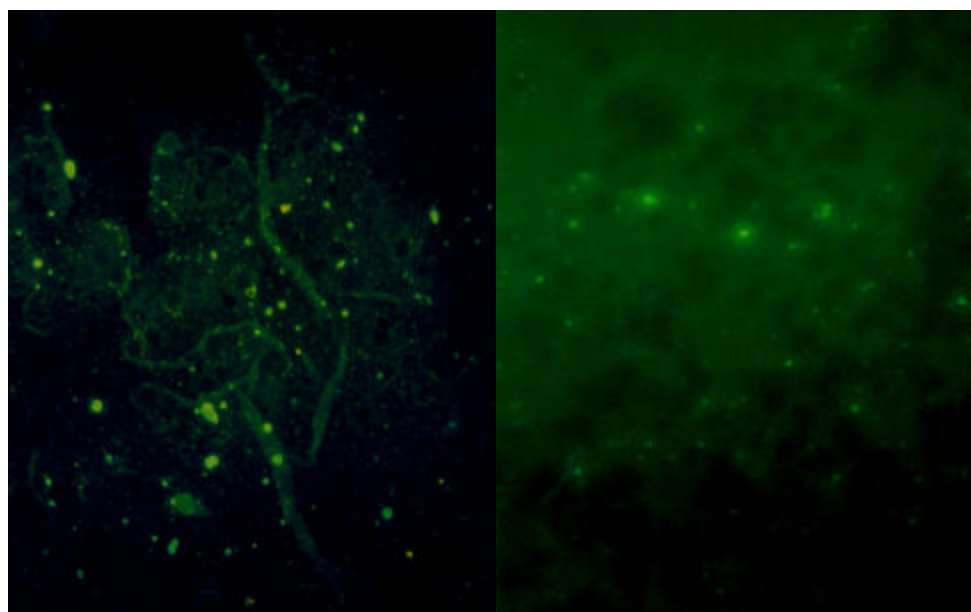


Fig. 1 - Fragmento de SNC de cão com presença de inclusões características de raiva (a) e cinomose (b), após imunofluorescência direta.

A Tabela 2 mostra os resultados das amostras analisadas, de acordo com o número de fragmentos do sistema nervoso central submetidos a IFD. Observa-se que das 175 amostras das quais foram examinados 3 fragmentos diferentes de SNC, 18,3% resultaram positivas. Em 55 amostras foi possível analisar apenas 2 fragmentos, resultando 11 amostras positivas (20%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,8980$) entre o resultado obtido e o número de fragmentos submetidos a IFD.

Considerando-se a avaliação de cada fragmento do SNC separadamente (Tabela 3), observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,8470$) entre a porcentagem de amostras positivas e o tipo de fragmento analisado.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A IFD tem sido preconizada pela OMS (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1996) como técnica de eleição para o diagnóstico da raiva, tendo sido indicada por vários autores também para o diagnóstico da cinomose (KRISTENSEN & VANDEVELDE, 1978; RAMIREZ, 1989; SIMON-VALENCIA *et al.*, 1987), mostrando-se altamente sensível e específica (ORTEGA-RODRIGUES *et al.*, 1989). No Brasil, sua utilização para o diagnóstico da cinomose foi citada por GOUVEIA *et al.* (1987) e a primeira descrição de que se tem registro foi feita por KOTAIT *et al.* (1990) e posteriormente por QUEIROZ DA SILVA, *et al.* (1999) tendo sido considerada uma técnica de grande utilidade para ser empregada na rotina laboratorial, como diagnóstico diferencial da raiva.

A ocorrência da cinomose canina entre as amostras de SNC enviadas para diagnóstico da raiva, na região de Araçatuba, no período analisado foi de 18,9% (47/248), quando considerados apenas os animais com sintomatologia compatível com a doença. Em trabalho realizado com amostras examinadas no Estado de São Paulo, num período de 10 anos (1981 a 1991), a porcentagem de amostras positivas pelas técnicas de coloração de Sellers e IFD, foi de 5,4% (87/1610), sendo que todas as amostras recebidas foram submetidas ao exame de cinomose, independente da suspeita clínica (QUEIROZ DA SILVA et al., 1999). Os resultados aqui obtidos são semelhantes ainda aos observados em cães com suspeita clínica de raiva no México, para os quais 19% deles foram positivos para cinomose (RAMIREZ, 1989).

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul (HEADLEY & GRAÇA, 2000), entre 250 cães submetidos à necropsia no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no período de 1985 a 1997, 11,70% (250/2136) apresentaram lesões e corpúsculos de Lentz. Pelas citações acima, observa-se que quando são examinados apenas animais com sintomas de alterações de SNC e/ou outros compatíveis com a cinomose, a porcentagem de positivos é maior que a obtida quando se examinam todos os animais encaminhados para exame, sem discriminação de sintomatologia.

Com a utilização da IFD, antígenos do vírus da cinomose foram detectados em pelo menos um dos três fragmentos de SNC examinados (córtex, cerebelo e hipocampo), não tendo sido detectada diferença significativa ($p > 0,05$) entre a porcentagem de positivos observada para cada um dos fragmentos e, tampouco, uma localização preferencial do vírus.

AGRADECIMENTO

À Profa. Dra. Sílvia Helena Venturolli Perri pela análise estatística e aos auxiliares Cristiano de Carvalho e Devani Mariano Pinheiro pela colaboração no diagnóstico laboratorial da raiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Canine distemper current status. In: CARMICHAEL, L.E. (Ed.). *Documento n.A0103.1199, Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. [Online] International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 1999. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/appel/chapter_frm.asp> Acesso em: 21 abr. 2004.
- BEER, J. *Doenças infecciosas em animais domésticos*. São Paulo: Livraria Roca, 1998. v.1, 457p.
- DEAN, D.J.; ABELSETH, M.K.; ATANASIU, P. The fluorescent antibody test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWISK, H. (Eds.). *Laboratory techniques in rabies*. 4.ed. Geneva: WHO, 1996. 476p.
- GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H.; RIBEIRO, A.L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.39, n.4, p.539-555, 1987.
- GREENE, E.G. & APPEL, M.J. Canine distemper. In: GREENE, E.G. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and the cat*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990. p.226-241.
- HEADLEY, S.A. & GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, [online], v.37, n.2, p.00-00, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200009&lng=em&nrm=iso> Acesso em: 16 jun 2004.
- KOPROWISK, H. The mouse inoculation test. In: MESLIN, F.X.; KAPLAN, M.M.; KOPROWISK, H. (Eds.). *Laboratory techniques in rabies*. 4.ed. Geneva: WHO, 1996. 476p.
- KOTAIT, I.; PEIXOTO, Z.M.; QUEIROZ, L.H.; CUNHA, E.M.S.; CORREA, L.S.B. Diagnóstico diferencial da raiva e cinomose pela histopatologia e imunofluorescência direta. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 5., 1990, São Lourenço, MG. *Anais*. São Lourenço: 1990, p.107
- KRISTENSEN, B. & VANDEVELDE, M. Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin embedded tissue. *Am. J. Vet. Res.*, v.39, n.6, p.1017-1021, 1978.
- NIETO, J.M.; RUEDA, A.; TOETUERO, E.; PIZARRO, M. Aportaciones al diagnostica del moquilo canino mediante demonstracion citologica del antígeno viral por metodos histológicos e imunohistoquímicos. *Med. Vet.*, v.4, n.1, p.29-33, 1987.
- ORVELL, C.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P. Immunological relationships between phocid and canine distemper virus studied with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, v.71, n.9, p.2085-2092, 1990.
- POTGIETER, L.N. & AJIDAGBA, P.A. Quantification of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.1, n.2, p.110-115, 1989.
- QUEIROZ DA SILVA, L.H.; PEIXOTO, Z.M.P.; CUNHA, E.M.S.; SOUZA, M.C.A.M.; KOTAIT, I.; CORRÊA, L.B.; NILSON, M.R. Emprego das técnicas de coloração de Sellers e imunofluorescência direta no diagnóstico diferencial da raiva e da cinomose em amostras de origem canina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.21, n.6, p.232-236, 1999.
- RAMIREZ, R.I. Diagnostico del moquillo canino por inmunofluorescencia directa em perros diagnosticados clinicamente como rabiosos. *Vet. México*, v.20, n.2, p.161-167, 1989.
- REGO, A.A.M.S.; MATUSHIMA, E.R.; PINTO, C.M.; BIASIA, I. Distemper in Brazilian wild canidae and mustelidae: case report. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.34, n.3, p.156-158, 1997.
- SCHMIDT, P.; HAFNER, A.; REUBEL, G.H.; WANKE, R.; FRANKE, V.; LOSCH, U.; DAHME, E. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for

- immunohistochemistry. *J. Vet. Med.* –série B, v.36, n.9, p.661-668, 1989.
- SIMON-VALENCIA, M.C.; GARCIA-SANCHEZ, J.; GIRONES-PUNETO, O.; NEGREDO-VILLALTA, M.P.; MUZQUIZ-MORACHO, J.L.; ORTEGA-DIEZ, C. Contribucion al estudio del diagnostico del moquillo en el perro. 1. Imunofluorescencia directa y detección de cuerpos de inclusión en frotis del animal vivo. *Med. Vet.*, v.4, n.4, p.211-218, 1987.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Laboratory techniques in rabies*. 4.ed. Geneva, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Human rabies surveillance and control activities at WHO*. Disponível em: <<http://www.who.int/emc/diseases/zoo/rabies.html>> Acesso em: 5 mai 2004.
- ZAR JH. *Biostatistical analysis*. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1992.

Recebido em: 28/6/04

Aceito em: 6/8/04