

## Comunicação

[Communication]

### **Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção *ante mortem* do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados**

[Evaluation of the urine and leucocytes as biological samples for ante mortem detection of canine distemper virus by RT-PCR assay in naturally infected dogs]

F.J. Negrão<sup>1</sup>, A.A. Alfieri<sup>2,3\*</sup>, A.F. Alfieri<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação - UEL - Londrina

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia Animal - UEL

Caixa Postal 6001

86051-990 - Londrina, PR

<sup>3</sup>Bolsista do CNPq

A cinomose canina é uma das mais importantes doenças infecciosas em cães de todo o mundo. No Brasil a infecção pelo vírus da cinomose canina (*canine distemper virus* - CDV) é endêmica e pode resultar em doença multissistêmica aguda ou subaguda, altamente contagiosa. Com frequência, sinais clínicos neurológicos podem ocorrer durante a fase aguda da doença, várias semanas ou meses após (Greene e Appel, 1998; Amude et al., 2006b). Os animais infectados, tanto na forma sintomática quanto assintomática, são importantes na cadeia epidemiológica da cinomose canina como fonte de contaminação para os animais susceptíveis (Appel e Summers, 1995).

O diagnóstico clínico, realizado com base no exame físico, anamnese e por exames complementares, às vezes, é inconclusivo, pois o mesmo padrão também pode ser encontrado em outras doenças infecciosas e parasitárias de cães (Moritz et al., 2000; Amude et al., 2007).

Para a realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos, destacando-se a pesquisa de corpúsculo de inclusão em células presentes em secreções e em neutrófilos circulantes, a imunofluorescência direta, a imunistoquímica e o isolamento do CDV em

cultivo celular. Porém, todos os métodos apresentam desvantagens que podem inviabilizar o uso na rotina laboratorial tais como baixa sensibilidade e/ou especificidade, etapas laboriosas de processamento do material biológico e tempo necessário para a conclusão do resultado (Frisk et al., 1999; Appel e Summers, 1999; Moritz et al., 2000).

A transcrição reversa, seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), é uma técnica molecular utilizada com o objetivo de identificação precoce do CDV em cães com sinais clínicos da infecção. Esse método de diagnóstico *ante mortem* apresenta taxas de sensibilidade e de especificidade elevadas. Entretanto, a RT-PCR pode apresentar resultados falso-negativos, destacando-se o método de extração do ácido nucléico e a seleção do material biológico a ser utilizado para o diagnóstico (Frisk et al., 1999; Gebara et al., 2004a; Negrão et al., 2006).

Na dependência exclusiva da forma de apresentação clínica e da evolução da cinomose canina, o CDV pode estar presente em uma gama de amostras biológicas. Nos diferentes estádios da infecção, urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva, secreção respiratória e líquido podem apresentar o vírus em títulos variados (Frisk et al., 1999; Saito et al., 2006a/b; Amude et al., 2006a).

---

Recebido em 17 de março de 2006

Aceito em 18 de dezembro de 2006

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: alfieri@uel.br

Apoio: CNPq, CAPES, Fundação Araucária (FAP/PR)

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

No período de maio a novembro de 2004 foram selecionados 188 cães com suspeita clínica de cinomose, atendidos em um Hospital Veterinário Escola. De acordo com os sinais clínicos apresentados, os animais foram distribuídos em três grupos de estudo. No grupo A foram incluídos 93 cães que apresentavam um ou mais sinais clínicos comuns à forma sistêmica da cinomose; no B, 11 cães com manifestações neurológicas; e no C, 84 cães que apresentavam, simultaneamente, os sinais clínicos encontrados nas formas sistêmica e neurológica.

A inclusão dos animais no ensaio somente foi realizada após o consentimento dos proprietários. Todas as amostras biológicas foram obtidas de forma indolor, respeitando as normas de bem estar animal.

Foram colhidos 2ml de urina, por meio de cistocentese ou sondagem uretro-vesical, e 3ml de sangue com anticoagulante (EDTA) por venopunção. As amostras foram processadas imediatamente após a colheita ou estocadas no máximo por 48h a -20°C. Para a obtenção de leucócitos, alíquotas de 100µl de sangue foram centrifugadas a 10.000g por 15min em gradiente de Percoll, de acordo com Saito et al. (2006).

Alíquotas de 300µl das amostras clínicas foram submetidas à extração do RNA pelo método da sílica/tiocianato de guanidina (Boom et al., 1990). Alíquotas de água ultrapura autoclavada e da estirpe Rockborn do CDV, amplificada em células *Madin Darby canine kidney* (MDCK), foram utilizadas, respectivamente, como controles negativo e positivo nas reações da RT-PCR.

Para a detecção do CDV foram utilizados os primers CDV1 (+) [5'-aca gga ttg ctg agg acc tat-3', nt 769-789] e CDV2 (-) [5'-caa gat aac cat gta cgg tgc-3', nt 1055-1035], desenhados a partir da seqüência do gene que codifica a nucleoproteína (N) do CDV e que amplificam um produto de 287pb (Frisk et al., 1999). Tanto a transcrição reversa quanto a PCR foram realizadas de acordo com as modificações descritas por Amude et al. (2006b).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE pH 8,4 (89mM Tris; 89mM ácido bórico; 2mM EDTA), corado em solução contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Em 125 (66,5%) animais foi possível a amplificação de um fragmento com 287pb, correspondente ao gene N do CDV, a partir da urina ou de leucócitos. A Tab. 1 apresenta a distribuição dos resultados da RT-PCR.

Tabela 1. Resultados da RT-PCR para a detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina em cães naturalmente infectados, distribuídos de acordo com a forma clínica da doença

Grupo	RT-PCR		Total
	Positivo (%)	Negativo (%)	
A	42 (45,2)	51 (54,8)	93
B	7 (63,6)	4 (36,4)	11
C*	76 (90,5)	8 (9,5)	84
Total	125 (66,5)	63 (33,5)	188

Grupos: cães com manifestação clínica sistêmica (A); neurológica (B); e sistêmica/neurológica simultâneas (C).

\*P=0,001;  $\chi^2=40,72$ .

De acordo com a idade do animal, a estirpe viral infectante, a forma de manifestação clínica e a evolução, o diagnóstico clínico da cinomose canina, mesmo quando amparado por exames complementares, é um desafio para o clínico. Em algumas situações, como aquelas onde é observada a associação de sinais clínicos

sistêmicos e neurológicos, e também na presença de alguns sinais específicos como a mioclonia, a probabilidade da realização de um diagnóstico clínico conclusivo aumenta consideravelmente (Gebara et al., 2004b). Na amostragem avaliada foram incluídos apenas cães com suspeita clínica de cinomose nos quais o diagnóstico ainda era

### Avaliação da urina e de leucócitos...

inconclusivo. Muitos dos casos poderiam não ser cinomose e isso justifica a taxa de 66,5% de animais positivos na RT-PCR.

Foram observadas diferenças no percentual de positividade para o CDV de acordo com a forma de manifestação clínica. Destaca-se que apenas 42 (45,2%) dos 93 cães com manifestação de sinais clínicos sistêmicos foram positivos na RT-PCR. Esse menor percentual de positividade no grupo A pode ter sido originado pelo próprio modelo de inclusão utilizado na distribuição dos grupos de animais. Os sinais sistêmicos como hipertermia, diarreia, vômito, hiporexia, anorexia, tenesmo, secreção nasal, tosse, dispnéia, apatia e ceratoconjuntivite seca podem ser comuns a uma série de outras infecções (Greene e Appel, 1998) que não foram objetos de análise no presente estudo.

Excetuando-se a mioclonia, a maioria dos sinais neurológicos utilizados para incluir os cães nos grupos B e C, como convulsão, rigidez cervical, hiperestesia, tremores musculares, paresia, paralisia, ataxia, mudanças comportamentais, depressão e desorientação, também podem ser observados em outras síndromes neurológicas, não tão frequentes quanto a cinomose, como a meningoencefalomielite granulomatosa, toxoplasmose, neosporose, criptococose e outras (Tipold et al., 1995).

O percentual de detecção do CDV pela RT-PCR nos cães dos grupos A, B e C ratificam os resultados de Gebara et al. (2004b), ao afirmarem que é maior a probabilidade de diagnóstico do CDV em cães que apresentam a associação de sinais clínicos sistêmicos e neurológicos. No presente estudo, a taxa de detecção do CDV nos animais provenientes do grupo C também apresentou diferença

significativa ( $P=0,001$ ) em relação aos grupos A e B.

Na Tab. 2 são apresentados os resultados positivos e negativos da RT-PCR, distribuídos de acordo com o tipo de material biológico (urina x leucócitos) empregado para o diagnóstico e os grupos de animais avaliados.

Considerando apenas o total de cães positivos na RT-PCR ( $n=125$ ), foi possível a amplificação parcial do gene N do CDV a partir da urina em 113 (90,4%) animais e a partir dos leucócitos em 88 (70,4%) animais. Na Tab. 3 apresenta a distribuição dos resultados positivos encontrados em urina e em leucócitos dos 125 cães com diagnóstico laboratorial de cinomose.

Considerando a amostragem avaliada, a utilização da urina como material biológico para o diagnóstico do CDV foi melhor que a dos leucócitos ( $P=0,001$ ), independentemente do grupo avaliado. Entretanto, a somatória dos resultados positivos obtidos na urina e nos leucócitos ( $n=125$ ) em relação aos obtidos apenas na urina não foi diferente ( $P=0,1991$ ). Este resultado demonstra que, quando por razões econômicas e na impossibilidade de se obter mais de uma amostra biológica para o diagnóstico do CDV, a urina deve ser o material de eleição, pois a probabilidade de diagnóstico é semelhante.

A virúria é considerada uma forma freqüente de excreção do CDV (Shen et al., 1981; Saito et al., 2006b). Estes resultados ratificam que a urina deve ser incluída como material clínico de eleição para a realização do diagnóstico *ante mortem* da cinomose canina por meio da RT-PCR. Independentemente da forma de apresentação clínica, o percentual de positividade para o CDV encontrado em urina foi sempre superior ao observado em leucócitos.

Tabela 2. Distribuição dos resultados da RT-PCR para a detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina em urina e em leucócitos de 188 cães com suspeita clínica de cinomose

Resultado		Grupo			Total
Urina	Leucócitos	A	B	C	
+	+	21	2	53	76
+	-	16	4	17	37
-	+	5	1	6	12
-	-	51	4	8	63
Total		93	11	84	188

Grupos: cães com manifestação clínica sistêmica (A); neurológica (B); e sistêmica/neurológica simultâneas (C).

Tabela 3. Distribuição dos resultados positivos encontrados em urina e em leucócitos de 125 cães com diagnóstico de infecção pelo vírus da cinomose canina realizado pela técnica da RT-PCR

Cães positivos	Amostras positivas em RT-PCR (%)	
	Urina	Leucócitos
Grupo A (n=42)	37 (88,1)	26 (61,9)
Grupo B (n=7)	6 (85,7)	3 (50,0)
Grupo C (n=76)	70 (92,1)	59 (77,6)
Total (n=125)	113 (90,4)*	88 (70,4)*

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

\*P=0,001;  $\chi^2=15,86$ .

A RT-PCR é um método molecular de diagnóstico que, se adequadamente padronizado, apresenta alta sensibilidade e especificidade. Entretanto, na dependência do material biológico a ser empregado para a realização do diagnóstico, podem ocorrer resultados falso-negativos. Particularmente nas infecções agudas, localizadas ou sistêmicas, é possível a eleição de um material biológico para a pesquisa do agente etiológico. Nessa situação, características como a patogenia, a evolução e os sinais clínicos da infecção podem definir, com pequena margem de erro, o material biológico mais apropriado para a detecção do agente etiológico (Frisk et al., 1999; Amude et al., 2007).

As diferentes formas de apresentação clínica e de evolução da cinomose canina podem dificultar a eleição de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico etiológico *ante mortem*. Particularmente nas formas de evolução subaguda ou crônica, e na ausência de sinais clínicos sistêmicos, o CDV pode não estar presente em órgãos, tecidos, secreções e excreções de maneira uniforme. Nessas situações, a utilização de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico pode ser responsável pela ocorrência de resultados falso-negativos (Frisk et al., 1999; Amude et al., 2006a; Saito et al., 2006a).

No presente trabalho, na hipótese de seleção dos leucócitos como único material biológico utilizado para o diagnóstico do CDV, a RT-PCR teria originado 37 (29,6%) resultados falso-negativos, provenientes de animais dos três grupos avaliados. Na situação em que apenas a urina fosse encaminhada para a realização do diagnóstico poderiam ter sido gerados 12 (9,6%) resultados falso-negativos, também distribuídos entre os cães incluídos nos três grupos avaliados.

Sessenta e três (33,5%) cães foram negativos tanto na urina quanto nos leucócitos. Porém, prováveis resultados falso-negativos não podem ser excluídos pois não foram utilizadas outras técnicas para avaliar a presença ou a ausência do CDV, uma vez que o objetivo principal deste trabalho foi comparar o uso simultâneo de dois materiais biológicos para o diagnóstico etiológico *ante mortem* da cinomose canina pela RT-PCR. Outras doenças infecto-parasitárias, que determinam sinais clínicos semelhantes aos utilizados para a inclusão e distribuição dos cães nos três grupos estudados, também não foram investigadas.

A possibilidade da realização do diagnóstico laboratorial *ante mortem* da cinomose canina é de fundamental importância para os clínicos. A confirmação e/ou exclusão do CDV como provável etiologia possibilita a realização do prognóstico de forma mais objetiva e de condutas terapêuticas mais adequadas, além de proporcionar a adoção de medidas de controle e profilaxia diferenciadas e específicas, mais apropriadas para cada caso.

A otimização de métodos de diagnóstico que possibilitem a realização do diagnóstico laboratorial conclusivo *ante mortem* do CDV, como a RT-PCR, é de importância clínica. Entretanto, este trabalho demonstrou que o tipo de amostra clínica submetida à análise pode também ter grande impacto no resultado do diagnóstico e aumentar significativamente a sensibilidade da técnica.

Palavras-chave: cão, cinomose, diagnóstico, RT-PCR

ABSTRACT

Urine and leucocytes were comparatively evaluated as clinical samples for ante mortem detection of the canine distemper virus (CDV) by a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. One hundred and eighty eight dogs with clinical symptoms of distemper, were distributed in three groups. The group A was constituted of 93 dogs with systemic signs of distemper; the group B by 11 dogs with neurological signs, and the group C by 84 dogs that presented simultaneously systemic and neurological signs. In 66.5% (125/188) of the dogs was amplified an amplicon with 287 base pair of the CDV nucleoprotein gene. In 60.8% (76/125) of the animals the CDV was detected simultaneously in the urine and leucocytes, and in 39.2% (49/125) of the dogs just a type of clinical sample (urine: n=37; leucocytes: n=12) was positive. These results demonstrate that the different forms of clinical distemper disease can hinder the choice of only one type of clinical sample to carry out the ante mortem etiological diagnosis of CDV infection, and false-negative results can be generated.

Keywords: dog, canine distemper, diagnosis, RT-PCR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. *Ante mortem* Diagnosis of CDV Infection by RT-PCR in Distemper Dogs with Neurological Deficits without the Typical Clinical Presentation. *Vet. Res. Comm.*, v.30, p.679-687, 2006a.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; BALARIN, M.R.S. et al. Severe lymphocytic pleocytosis in cerebrospinal fluid from a dog with neurological deficits. *Vet. Clin. Pathol. J.*, v.35, p.119-122, 2006b.
- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings of distemper encephalomyelitis in dogs presented without usual signs of the disease. *Res. Vet. Sci.*, v.82, p. in press, 2007.
- APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.*, v.44, p.187-191, 1995.
- APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. Canine distemper: Current Status [on line], 1999. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> Acessado em 13 jul. 2003.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.495-503, 1990.
- FRISK, A.L.; KONIG, M.; MORITZ, A. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, p.3634-3643, 1999.
- GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J. et al. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.168-174, 2004a.
- GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J. et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p.480-487, 2004b.
- GREENE, G.E.; APPEL, M.J. Canine distemper. In: GREENE, G.E. *Infectious diseases of the dog and the cat*. Philadelphia: W.B.Saunders, 1998. p.9-22.
- MORITZ, A.; FRISK, A.L.; BAUMGÄRTNER, W. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.*, v.10, p.37-45, 2000.
- NEGRÃO, F.J.; WOSIACKI, S.R.; ALFIERI, A.A. et al. Perfil de restrição de um fragmento do gene da hemaglutinina amplificado pela RT-PCR a partir de estirpes vacinais e selvagens do vírus da cinomose canina. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.58, p.1099-1106, 2006.
- SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; NEGRÃO, F.J. et al. Optimization and Evaluation of the RT-PCR Assay for *Ante* and *Post Mortem* Detection of Canine Distemper Virus Infection. *Vet. Zootec.*, v.13, p.63-72, 2006a.
- SAITO, T.B.; ALFIERI, A.A.; WOSIACKI, S.R. et al. Detection of canine distemper virus by RT-PCR in urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.*, v.80, p.116-119, 2006b.
- SHEN, D.T.; GORHAM, J.R.; PERDERSEN, V. Viruria in dogs infected with canine distemper. *Vet. Med.:Small Anim. Clin.*, v.76, p.1175-1177, 1981.
- TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *J. Vet. Int. Med.*, v.9, p.304-314, 1995.