

FABIANA DOS SANTOS MONTI

**ANTICORPOS CONTRA O VÍRUS DA CINMOSE EM CÃES
VACINADOS EM DIFERENTES ESTABELECIMENTOS DA ÁREA
URBANA DO MUNICÍPIO DE VIÇOSA/MG.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2004

Aos meus pais, Eduardo e Dilma, e minha irmã, Monica, pelo apoio e amor incondicional que tornaram possível a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pela segurança que se encontra na união e no amor.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor José Antônio Viana pela amizade, pela orientação na realização deste trabalho e na minha formação profissional, e por ter apoiado desde o início a idéia da pesquisa.

À professora Paula Dias Bevilacqua por ter incentivado a idéia deste estudo e pela tão esmerada atenção em todas as dúvidas, além das valiosas sugestões que contribuíram para a finalização deste trabalho.

Ao Professor Mauro Pires Moraes pelo auxílio na padronização da técnica de soroneutralização e pelas sugestões que ajudaram na conclusão da pesquisa.

Ao Professor Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo, pela amizade e atenção com que sempre me recebeu e por ter permitido o uso do laboratório sempre que foi preciso.

À professora Marlene Isabel Vargas Vilória, pela amizade e ajuda na padronização da técnica.

À professora Márcia Rogéria de Almeida por ter contribuído para a finalização do trabalho.

À todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.

Ao meu namorado André Guarçoni, pela inestimável ajuda, pelo companheirismo e por tornar os meus dias mais felizes.

Aos funcionários Marquinhos, Monteiro, Luiz Carlos, Batalha, Dagoberto, Ademir e Élcio, pela amizade.

Ao funcionário Márcio Mendes pela disposição em ajudar nas técnicas laboratoriais.

À Rosinéia Aparecida da cunha Andrade, secretária da pós-graduação do Departamento de veterinária, por ser tão atenciosa e prestativa.

À Irma Ximena pela tão dedicada ajuda, indispensável para a padronização da técnica e à Claudia Gonzalez e Policarpo pela agradável convivência e por sempre estarem dispostos a ajudar.

À todos os amigos do curso de pós-graduação pelo convívio.

Às amigas Julianna Miwa, Mariana Rodrigues, Mariana Halwass e Greice Kelle, por sempre estarem presentes.

Aos meus “filhos” Felícia, Fufinha, Otto, Minifrozinha e Paco pelo amor incondicional e pela alegria que me proporcionam.

Aos proprietários dos cães utilizados neste trabalho, que contribuíram para o progresso da ciência.

BIOGRAFIA

FABIANA DOS SANTOS MONTI, filha de Eduardo Monti e Dilma dos Santos Monti, nasceu no dia 7 de novembro de 1974, na cidade de São Paulo.

Em janeiro de 2000, graduou-se em Medicina Veterinária, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

Em fevereiro de 2000, iniciou a Curso de Especialização em Clínica e Cirurgia Veterinárias – Área de Pequenos Animais, com duração de um ano, sob a orientação do Prof. José Antônio Viana.

Em agosto de 2001, iniciou o Curso de Mestrado, em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2004.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Etiologia da cinomose	3
2.2. Epidemiologia	4
2.2.1. Animais suscetíveis à infecção	5
2.3. Curso da Infecção	6
2.4. Sinais Clínicos	7
2.5. Diagnóstico	8
2.6. Prevenção	10
2.6.1. Imunidade passiva	10
2.6.2. Imunidade adquirida	10
2.6.3. Falha vacinal	11
2.6.4. Importância dos anticorpos	13

3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Amostragem e delineamento experimental	16
3.2. Padronização do teste de soroneutralização	18
3.2.1. Vírus	18
3.2.2. Cultura Celular	18
3.2.3. Adaptação do vírus em MDCK	19
3.2.4. Produção de células MDCK para os testes de soroneutralização	20
3.2.5. Descongelamento das células MDCK	21
3.2.6. Titulação viral	22
3.2.7. Teste de soroneutralização em microplacas	22
3.3. Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Aspectos relacionados à execução da técnica de soroneutralização	25
4.2. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo os grupos de cães estudados	26
4.3. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo a idade e o sexo.	32
4.4. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo a frequência de contato com outros cães	36
4.5. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo o número de doses recebido pelos cães e o tempo decorrido desde a última dose da vacina	38
5. CONCLUSÕES	40
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	41
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
8. APÊNDICE	49

RESUMO

MONTI, Fabiana dos Santos. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004.
Anticorpos contra o vírus da cinomose em cães vacinados em diferentes estabelecimentos da área urbana do município de Viçosa/MG.
Orientador: José Antônio Viana. Conselheiros: Paula Dias Bevilacqua e Mauro Pires Moraes.

Observações de casos clínicos suspeitos de cinomose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa, indicam que os cães vacinados em lojas que comercializam produtos agropecuários apresentam maior frequência da doença, quando comparados aos cães vacinados em clínicas veterinárias. Com o objetivo de avaliar a resposta às vacinas comercializadas em diferentes estabelecimentos e seguindo ou não o protocolo de vacinação indicado pela literatura, foi determinado o título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães da área urbana do município de Viçosa-MG. Para tanto, uma amostra de soro sanguíneo foi obtida de cada um dos 150 cães selecionados. Estes animais estavam sadios e tinham entre seis meses e seis anos de idade. Os animais pertenciam a diversas raças e eram de ambos os sexos. Os cães foram selecionados segundo características pré-estabelecidas para compor cinco grupos de 30 animais: A) cães vacinados em clínicas veterinárias, seguindo o protocolo

indicado na literatura; B) cães vacinados em clínicas veterinárias, não seguindo o protocolo indicado; C) cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, seguindo o protocolo indicado; D) cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, não seguindo o protocolo indicado; E) cães não vacinados. O título de anticorpos foi mensurado no soro de cada animal, por meio do teste de soroneutralização. De acordo com os resultados deste estudo, pôde-se concluir que a vacinação contra cinomose é importante, considerando a diferença encontrada entre o título de anticorpos dos cães vacinados e não vacinados. Não há diferença em vacinar os cães contra cinomose em clínicas veterinárias ou em lojas de produtos agropecuários, desde que a vacinação seja realizada seguindo o protocolo indicado pela literatura. A qualidade das vacinas comercializadas em clínicas veterinárias e lojas de produtos agropecuários devem ser avaliadas, diante da grande porcentagem de títulos negativos e de títulos abaixo do considerado protetor em todos os grupos de cães vacinados.

ABSTRACT

MONTI, Fabiana dos Santos. Universidade Federal de Viçosa, February 2004.

Antibody against distemper virus in dogs vaccinated in different stores in the urban area of the municipal district of Viçosa/Minas Gerais State.

Advisor: José Antônio Viana. Committee members: Paula Dias Bevilacqua and Mauro Pires Moraes.

Observations of clinical cases suspected of distemper, attended at the Veterinary Hospital at the Federal University of Viçosa, indicate that the dogs vaccinated in stores which commercialize agropecuary products showed a greater frequency of the disease compared to the ones vaccinated at veterinary clinics. Having as the objective of this study the evaluation of the answer to the vaccines commercialized in different stores and following or not the vaccination protocol indicated by the literature, the antibody titers against the distemper in dogs serum in the urban area of the city of Viçosa-MG was determined. To carry out this experiment, a blood serum sample was obtained from each of the 150 selected dogs. These animals were healthy and were between six months to six years old. The animals belong to several breeds and both sex. The dogs were selected following pre-established characteristics to form five groups of

30 animals each: A) dogs vaccinated in veterinary clinics following the literature patterns; B) dogs vaccinated in veterinary clinics not following the indicated protocol; C) dogs vaccinated in agropecuary product stores following the indicated protocol; D) dogs vaccinated in agropecuary product stores not following the indicated protocol; E) dogs not vaccinated. The antibody titers were measured in each animal serum through the serum neutralizing test. According to the results of this study, it was concluded that the vaccination against distemper is important, considering the difference between the titers of vaccinated and non-vaccinated dogs. There is no difference in relation to vaccinating in veterinary clinics or agropecuary product stores, if the vaccination is carried out following the vaccination protocol indicated by the literature. The quality of the vaccines commercialized in veterinary clinics and agropecuary products stores should be evaluated due to the great percentage of negative titer and titers below the ones considered protective in all the vaccinated dogs groups.

1. INTRODUÇÃO

A cinomose é uma enfermidade viral dos cães, altamente contagiosa, com letalidade podendo chegar a 90%, quando há envolvimento do sistema nervoso. Apenas a raiva tem porcentagem de letalidade mais elevada que a cinomose com manifestação neurológica (SWANGO, 1997).

Não há terapia antiviral contra a doença, tendo-se muitas vezes que optar pela eutanásia devido à progressão dos sinais neurológicos que são, em muitos casos, incompatíveis com a vida.

A imunização consiste no único meio efetivo de controle da doença na população canina (GOUVEIA et al., 1987). O protocolo de vacinação indicado pela literatura, e utilizado por médicos veterinários de maneira geral, consiste em três doses de vacina aplicadas no filhote, iniciando-se entre seis a oito semanas de idade, em intervalos de 21 a 30 dias e revacinações anuais. A revacinação anual é recomendada, pois cães adultos podem desenvolver a doença (GREENE & APPEL, 1990).

Observações de casos clínicos suspeitos de cinomose, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HOV-UFV), indicam que os cães vacinados em lojas que comercializam produtos agropecuários e que,

geralmente não contam com a orientação de um médico veterinário, apresentam maior frequência da doença, quando comparados aos cães vacinados em clínicas veterinárias.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar, por meio do teste de soroneutralização, os níveis séricos de anticorpos contra o vírus da cinomose em cães não vacinados e vacinados, seguindo ou não o protocolo indicado, em diferentes estabelecimentos responsáveis pela vacinação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Etiologia da cinomose

O agente etiológico da cinomose é um RNA-vírus da família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbilivírus*. O vírus é relativamente grande (150 a 250 nm) e apresenta envelope lipoprotéico (MURPHY et al., 1999).

A organização genômica do vírus da cinomose consiste de RNA fita simples. O RNA que está associado à proteína do nucleocapsídeo (N), serve como molde para a transcrição e replicação pela proteína polimerase viral (L) e seu cofator fosfoproteína (P). As proteínas N, P e L juntas com o RNA viral, constituem a ribonucleoproteína (RNP), a qual direciona a síntese sequencial do m-RNA (MESSLING et al., 2001).

O envelope viral contém duas principais glicoproteínas de superfície, denominadas proteína de fusão (F) e hemaglutinina (H) (CHALMERS & BAXENDALE, 1994; MESSLING et al., 2001), e uma terceira proteína (M) que media o contato com a RNP.

A glicoproteína H é responsável pela ligação do vírus à membrana celular da célula hospedeira e a glicoproteína F executa a fusão entre vírus e célula,

permitindo a entrada da RNP viral para dentro do citoplasma (MESSLING et al., 2001). É a glicoproteína H a maior responsável pela indução da maioria dos anticorpos neutralizantes (HARDER & OSTERHAUS, 1997; APPEL & SUMMERS, 1999).

2.2. Epidemiologia

A enfermidade tem distribuição mundial e é considerada endêmica (EK-KOMMONEN et al., 1997). Embora a cinomose possa ocorrer em qualquer época do ano, observa-se, normalmente, um maior acometimento dos cães durante os meses de inverno, o que é devido, entre outros fatores, à maior sobrevivência do vírus no meio ambiente (GREENE & APPEL, 1990).

Cães com infecção aguda liberam o vírus em suas fezes, saliva, urina e exsudatos nasal e conjuntival, no entanto, a principal via de infecção é a exposição à aerossóis (SHELL, 1990). Além do contato direto, a transmissão também pode se dar através de alimentos ou objetos contaminados (BAUMANN, 1988). A eliminação viral inicia-se, aproximadamente, 7 dias após a infecção (APPEL & SUMMERS, 1999).

A infectividade é maior do que o número dos animais que manifestam clinicamente a enfermidade, estimando-se em até 75% os casos de cães suscetíveis que se tornam infectados, eliminando o vírus sem sinais clínicos da doença (GREENE & APPEL, 1990). Estes cães, portanto, são uma importante fonte de infecção (POVEY, 1986).

Os reservatórios e as fontes de infecção são os próprios cães doentes, os animais silvestres e os cães portadores sãos que se recuperam e podem infectar outros animais (GORHAM, 1966a). A via de entrada mais comum é a respiratória, entretanto, a infecção pode ocorrer pela via digestiva ou conjuntival, por contato direto (GREENE & APPEL, 1990).

O sexo e as diferentes raças não foram associados significativamente com o título de anticorpos obtido em cães vacinados contra a cinomose (OTT et al., 1955; McCRAW et al., 1998; TWARK & DODDS, 2000).

Segundo FENNER et al. (1992), existem diferenças entre a epidemiologia de cães urbanos e os que vivem isolados. As infecções são freqüentes nos cães urbanos e em outras situações nas quais exista um estreito contato entre os animais. Estudos sorológicos têm demonstrado que 80% de todos os cães nascidos de fêmeas urbanas vacinadas, possuem anticorpos contra o vírus da cinomose até a idade de 8 semanas. Nas zonas rurais, o número de cães é demasiado pequeno para manter a continuidade da infecção, criando-se populações de cães altamente suscetíveis, situação que conduz ao aparecimento de epidemias que afetam cães de todas as idades. A idade de maior ocorrência da doença, no entanto, se dá até os 12 meses de idade (GORHAM, 1966a; GOUVEIA et al., 1987).

2.2.1. Animais suscetíveis à infecção

Diferentes animais da ordem *Carnivora* são suscetíveis ao vírus da cinomose e a letalidade varia grandemente entre as espécies (RIKULA et al., 2001). Além da família *Canidae* (cão doméstico, coiote, lobo, chacal, raposa e dingo), as famílias *Procyonidae* (guaxinim, coati, panda); *Mustelidae* (furão, vison, doninha, texugo e lontra); *Viverridae* (cuíca); *Hyaenidae* (hienas) e *Ursidae* (ursos) são suscetíveis à infecção pelo vírus da cinomose (GORHAM, 1966b; MONTALI et al., 1983; SHELL, 1990; RIKULA et al., 2001).

Grandes felinos como leões, leopardos e tigres foram identificados como suscetíveis à infecção e à doença, na Califórnia, em 1992; assim como leões, na Tanzânia, em 1994 (APPEL & SUMMERS, 1999). Os gatos domésticos são suscetíveis à infecção experimental, mas evidências sobre a infecção natural, manifestação clínica ou eliminação viral, não têm sido observadas (HARDER & OSTERHAUS, 1997).

O vírus da cinomose também tem causado doença em ambientes aquáticos, tanto nos habitats marinhos quanto nos de água doce. O vírus causou a morte de milhares de focas na Rússia, em 1987/1988 e foi isolado de focas, no Canadá (BARRETT, 1999).

2.3. Curso da infecção

Durante a exposição natural, o vírus da cinomose afeta primeiramente o trato respiratório anterior. Dentro de 24 horas multiplica-se nos macrófagos e se difunde para as tonsilas e linfonodos bronquiais através dos vasos linfáticos locais (APPEL, 1969). Entre quatro a seis dias após a infecção, a multiplicação viral ocorre dentro dos nódulos linfáticos do baço, na lâmina própria do estômago e intestino delgado, nos linfonodos mesentéricos e nas células de Kupffer (GREENE & APPEL, 1990). Segundo APPEL (1969), no 6º dia após a infecção todos os tecidos linfóides tornam-se infectados e ocorre a viremia. A proliferação viral difundida nos órgãos linfóides corresponde ao 1º pico febril e leucopenia (SHELL, 1990).

Entre o 6º e o 9º dia após a exposição, o vírus se difunde do tecido linfóide para o tecido epitelial (APPEL, 1969; SHELL, 1990). Nesse momento, o animal pode desenvolver anticorpos contra o vírus, alterando o curso da infecção (SHELL, 1990). Os animais que não forem capazes de desenvolver anticorpos protetores neste período, terão suas células epiteliais infectadas, onde continuará a replicação viral. Estes animais apresentarão sinais clínicos da doença entre o 14º e o 18º dia (APPEL, 1969), como aumento da temperatura corporal (2º pico febril), anorexia, perda de peso, diarreia, dispnéia e, ou, déficits neurológicos (SHELL, 1990).

A difusão do vírus para o sistema nervoso central (SNC) ocorre entre oito e nove dias após a infecção. Há variações na severidade e localização das lesões no SNC. A infecção pode ser fatal em poucos dias, evoluir durante semanas e

tornar-se fatal, ou estabilizar-se sem comprometimento maior (CHRISMAN, 1985).

2.4. Sinais Clínicos

O primeiro sinal de infecção é uma suave conjuntivite serosa a mucopurulenta, que é seguida, dentro de poucos dias, por uma tosse seca que rapidamente torna-se produtiva (GRENE & APPEL, 1990). Podem ser auscultadas crepitações em todo o pulmão e a pneumonia bacteriana é uma complicação comum (HAWKINS, 1997). Depressão e anorexia são seguidas por vômito e diarreia, que pode ser muco-sanguinolenta (GREENE & APPEL, 1990). Entretanto, a enterite severa, como a manifestação clínica principal, ocorre em um pequeno número de cães, sendo difícil, nestes casos, a diferenciação da enterite causada pelo parvovírus canino (CASTELLANO, 1993; GUILFORD et al., 1996; BURROWS et al., 1997).

Considerando sua debilidade geral, alguns cães, especialmente os filhotes muito jovens, desenvolvem impetigo disseminado. Porém, a manifestação clássica de cinomose na pele é a chamada doença do coxim, em que o cão desenvolve hiperqueratose de gravidade variável. A hiperqueratose nasal também é comum (SCOTT et al., 1996).

Segundo VANDEVELDE & CACHIN (1992), 50% dos pacientes têm sinais sistêmicos antes ou concomitantemente aos neurológicos. Aproximadamente, metade dos cães que sobrevivem aos sinais sistêmicos, apresentam, mais tarde, sinais neurológicos da cinomose (FENNER, 1997). A duração da doença neurológica varia de poucos dias a mais de um mês (TIPOLD et al., 1992) e os sinais neurológicos variam de acordo com a área do SNC envolvida (GREENE & APPEL, 1990).

A cinomose é a causa mais freqüente de convulsões em cães com menos de seis meses de idade (CASTELLANO, 1993). Sinais cerebelares (ataxia, tremores da cabeça e do corpo, hipermetria) e vestibulares (inclinação da cabeça,

nistagmo) também podem estar presentes (SHELL, 1990). Para CHRISMAN (1985), a infecção causada pelo vírus da cinomose deve ser sempre considerada em qualquer cão adulto com sinais cerebelares progressivos. Segundo o mesmo autor, o acometimento do tronco cerebral e dos nervos cranianos é menos freqüente, mas pode acontecer, e, nesse caso, o prognóstico é desfavorável.

A mioclonia (contrações involuntárias dos músculos) geralmente é permanente e pode ocorrer na ausência de outros sinais neurológicos. Qualquer músculo poderá estar envolvido, inclusive os músculos mastigatórios ou dos membros (CHRISMAN, 1985; LECOUTEUR & CHILD, 1997).

As mioclonias foram consideradas como sendo patognomônicas da cinomose (FARROW & LOVE, 1983), entretanto, elas também podem ser vistas em outras infecções por *Paramyxovirus* do cão e do gato ou em outras doenças inflamatórias do SNC em cães (GREENE & APPEL, 1990; TIPOLD et al., 1992).

A mielite pelo vírus da cinomose pode ocorrer em qualquer localização da medula espinhal, mas os segmentos T₃ a L₃ são afetados com maior freqüência, levando a paraparesia ou paraplegia (LECOUTEUR & CHILD, 1997).

2.5. Diagnóstico

A cinomose deve ser diferenciada da hepatite infecciosa canina, leptospirose, pasteurelose, raiva e pseudo-raiva. A pasteurelose e a salmonelose são infecções secundárias freqüentes na cinomose. Devemos distinguir da forma respiratória da cinomose a traqueobronquite infecciosa ou tosse dos canis (BAUMANN, 1988). Como na erliquiose canina os cães podem apresentar sintomatologia respiratória e nervosa (BREITSCHWERDT, 1997), esta enfermidade deve sempre ser considerada no diagnóstico diferencial da cinomose. A hipocalcemia pode gerar distúrbios do movimento que mimetizam a mioclonia (FENNER, 1997), devendo também ser considerada como diagnóstico diferencial.

O principal método utilizado para o diagnóstico definitivo da cinomose é a pesquisa do antígeno viral em células infectadas, por meio de técnicas de imunofluorescência (KRAKOWKA et al., 1980; AXTHELM & KRAKOWKA, 1987; BLIXENKRONE-MOLLER et al., 1993; WIMSATT et al., 2001). A visualização dos corpúsculos de inclusão pela microscopia óptica ou o isolamento do vírus também são ferramentas diagnósticas (APPEL & SUMMERS, 1999). Segundo estes autores, a demonstração do ácido nucléico viral por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) pode ser uma alternativa quando o isolamento do vírus ou as técnicas de imunofluorescência falharem na detecção do agente.

Os testes sorológicos são utilizados tanto para o diagnóstico da infecção pelo vírus, quanto para a avaliação da eficácia da vacinação (GEMMA et al., 1995). A pesquisa de anticorpos no soro, contra o vírus da cinomose, pode ser realizada por técnicas de imunofluorescência indireta, soroneutralização ou por imunoensaio enzimático (ELISA) (APPEL, 1969; SPENCER & BURROUGHS, 1992; JONES et al., 1997; HARRENSTIEN et al., 1997; WANER et al., 1998). Entretanto, o teste de soroneutralização tem sido o “padrão-ouro” para a detecção e quantificação de anticorpos contra o vírus da cinomose, em cães vacinados, pois a maioria dos trabalhos encontrados na literatura utiliza-o para este fim.

Diferentemente dos testes de imunofluorescência indireta e ELISA, nos quais os títulos de anticorpos detectáveis são mais altos porque são mensurados todos os anticorpos contra o vírus (NOON et al., 1980; RIKULA et al., 2000), no teste de soroneutralização são mensurados somente os anticorpos direcionados contra epítomos específicos do vírus, envolvidos com a infecção celular.

Os testes sorológicos, no entanto, são sujeitos a erros (TWARK & DODDS, 2000). Há variáveis importantes no teste de soroneutralização que devem ser consideradas. A soroneutralização é um método acurado para a avaliação de anticorpos contra o vírus da cinomose, desde que sejam observadas a quantidade de vírus e o isolado viral utilizado para o teste, assim como o

volume de soro testado, que podem influenciar nos resultados obtidos (JOHNSTON et al., 1959).

2.6. Prevenção

2.6.1. Imunidade passiva

Apenas 3% dos anticorpos maternos contra o vírus da cinomose são transferidos através da placenta e 97%, através do colostro, resultando em um título inicial no recém nascido normalmente igual a 77% do título da mãe (GREENE & APPEL, 1990). Como no cão uma pequena quantidade de anticorpo atravessa a placenta, os filhotes dependem da ingestão do colostro para adquirirem os anticorpos maternos, cuja absorção, através do intestino dos filhotes, reduz-se rapidamente após 72 horas de vida (POVEY, 1986).

O título de anticorpos passivos é variável em uma mesma ninhada, dependendo do título de anticorpos no soro da mãe, da quantidade de colostro ingerida por cada um dos filhotes e do tempo decorrido do nascimento. Tais anticorpos têm vida média de apenas sete a oito dias e, na maioria dos casos, declinam a níveis não protetores em aproximadamente oito semanas, fazendo-se necessária a imunização por meio de vacinações estratégicas (POVEY, 1986). Alguns filhotes, no entanto, adquirem uma quantidade de anticorpos que duram até quatro meses após o nascimento (BAKER, 1966; CARMICHAEL, 1966).

2.6.2. Imunidade adquirida

Vacinas com vírus vivo atenuado eficazes tornaram-se disponíveis em 1950 e têm sido amplamente usadas desde 1960 (GORHAM, 1966a). A atenuação do antígeno foi alcançada por passagens seriadas em cultura de tecidos (GREENE, 1990), como nas células renais caninas (isolado Rockborn), em ovos embrionados de galinha (isolado Onderstepoort) ou em culturas de fibroblastos

de frango (isolado Lederle) (HARDER & OSTERHAUS, 1997). Apenas as vacinas com vírus vivo atenuado têm sido efetivas em proteger os cães contra cinomose (GREENE, 1990). Atualmente, as vacinas contra cinomose comercializadas, tanto em clínicas veterinárias, quanto em lojas de produtos agropecuários, são produzidas com vírus vivo atenuado.

Os anticorpos maternos adquiridos pelos filhotes os protegem contra cinomose, mas bloqueiam a resposta à vacina (CHRISMAN, 1985). Próximo de 50% dos filhotes respondem bem à imunização contra a cinomose por volta de seis semanas de idade, cerca de 75% por volta de nove semanas e mais de 95% por volta de 13 semanas de idade. Devido a esta variação, uma série de vacinações é feita para que a indução da imunidade seja maximizada (SWANGO, 1997).

Desta forma, recomenda-se a aplicação de três doses da vacina contendo o antígeno viral da cinomose, nos filhotes, a cada três ou quatro semanas, entre 45 dias e quatro meses de idade. Nos filhotes que não recebem o colostro ou naqueles que iniciam a imunização mais tarde que o recomendado, pelo menos duas doses da vacina devem ser administradas, apesar da falta de interferência dos anticorpos maternos, pois uma única dose não permite que os cães desenvolvam imunidade que perdure por, pelo menos, um ano (GREENE e APPEL, 1990).

Segundo os mesmos autores, como cães adultos podem desenvolver a doença, a periódica revacinação é recomendada, apesar da relativa imunidade prolongada conferida pela vacina. No entanto, embora a revacinação anual contra a cinomose tenha sido indicada em muitos países, este protocolo de vacinação foi questionado (SCHULTZ & SCOTT, 1978; SCHULTZ, 1982).

2.6.3. Falha vacinal

A vacinação de cães contra cinomose foi considerada altamente efetiva em reduzir a incidência da doença (POVEY, 1986; EK-KOMMONEN et al., 1997).

Entretanto, falhas vacinais ocorrem, sendo que fatores endógenos e exógenos podem influenciá-las (POVEY, 1986).

Entre 1994 e 1995 um surto de cinomose ocorreu na Finlândia, em áreas com alta densidade populacional canina, envolvendo animais vacinados. Foi observado que 41% dos cães com cinomose confirmada tinham um histórico de vacinação completo, mas uma proporção significativa destes havia recebido uma vacina mais popular, que não conferiu imunidade adequada (EK-KOMMONEN et al., 1997).

Foram observados vários casos suspeitos de cinomose em cães vacinados, no ambulatório do HOV-UFV, sendo que alguns destes cães receberam vacinas mais populares, comercializadas em lojas de produtos agropecuários, sem a orientação de um médico veterinário.

Vários fatores influenciam o resultado da vacinação, e entre os fatores inerentes ao imunógeno, os principais são: o isolado viral utilizado, a manutenção de imunogenicidade suficiente durante todo o processo de atenuação e o número de partículas virais atenuadas em uma dose (título viral) (RIKULA et al., 2000). Vacinas que foram manuseadas e estocadas indevidamente também podem resultar em falha vacinal, uma vez que as vacinas contendo vírus vivo atenuado devem ser mantidas sob refrigeração todo o tempo (TIZARD & NI, 1998).

As diferenças individuais em animais vacinados influenciam o sucesso de um programa de imunização tanto quanto o antígeno utilizado (OTT, 1956). A idade, genética, estado de saúde, nutrição, meio ambiente e situações de estresse são importantes para o resultado da imunização. Qualquer um ou uma combinação de qualquer dos fatores acima, pode influenciar a resposta do sistema imune e subseqüentemente, o sucesso do programa de vacinação (WEBSTER, 1975; POVEY, 1986; OSBURN & STOTT, 1989).

2.6.4. Importância dos anticorpos

Tanto a imunidade humoral quanto a mediada por células são importantes na proteção contra a cinomose. As vacinas têm um importante papel em estimular ambos mecanismos (GREENE, 1990).

GREENE (1990) afirmou que o desafio de exposição com um agente virulento é mais confiável do que o título de anticorpos, para avaliar a eficácia de uma vacina, em um cão, individualmente, uma vez que a memória celular de uma exposição passada pode persistir por mais tempo, quando o título de anticorpos já estiver em declínio. Para RIKULA et al. (1996), no entanto, os anticorpos refletem bem o estado imunológico de uma população canina.

Muitos trabalhos publicados associam o título de anticorpos à proteção dos cães. Segundo GILLESPIE et al. (1958) e BAKER et al. (1959), a cinomose pertence à categoria de doenças virais na qual os anticorpos são um indicador de imunidade. EK-KOMMONEN et al. (1997) e RIKULA et al. (2000) utilizaram o título de anticorpos neutralizantes para avaliar a imunidade de populações caninas. Também para APPEL & SUMMERS (1999), os níveis de anticorpos podem ser utilizados para avaliar a imunidade. Alguns autores sugeriram que a necessidade de revacinação anual poderia ser determinada mensurando os anticorpos, por meio de testes sorológicos (ABLETT & BAKER, 1963; TURNER, 1983; OLSON et al., 1988; SCOTT, 1995; OLSON et al., 1997; TWARK & DODDS, 2000).

Em um estudo, cães da raça Beagle, não vacinados, entre seis semanas e seis meses de idade foram expostos a aerossóis contendo um isolado virulento do vírus da cinomose e pesquisados para o desenvolvimento de títulos de anticorpos no soro, por meio da técnica de soroneutralização, assim como para a presença do antígeno viral em tecidos e “swabs” conjuntivais, por meio da técnica de imunofluorescência. Após a exposição ao vírus, 50% dos cães morreram, sendo que destes, nenhum foi capaz de desenvolver anticorpos. Por outro lado, nos cães sobreviventes, os anticorpos foram detectados no 9^o dia após a exposição. Nos

animais que não apresentaram título de anticorpos, a invasão viral foi observada em todos os tecidos epiteliais, coincidindo com o aparecimento dos sinais clínicos; já nos cães sobreviventes, o antígeno viral não foi encontrado. O autor concluiu que, se a formação dos anticorpos ocorre antes da disseminação do vírus às células epiteliais, estas não são alcançadas e o animal recupera-se da infecção (APPEL, 1969).

A resposta imune humoral aos antígenos virais da cinomose, em cães infectados experimentalmente, foi estudada pelo teste de soroneutralização. Observou-se que os títulos de anticorpos variaram inversamente com a severidade da doença produzida. Os cães que se recuperaram, demonstraram títulos de anticorpos contra os antígenos do envelope, mais altos do que os cães com infecção fatal, que tinham pouco ou nenhum anticorpo em seu soro. Um terceiro grupo de cães, apresentando infecção crônica persistente, apresentava níveis de anticorpos intermediários contra os mesmos antígenos. Os resultados deste estudo sugeriram que a incapacidade em produzir anticorpos contra os antígenos do envelope foi um fator crucial no estabelecimento de uma infecção persistente (KRAKOWKA et al. 1975).

Em uma pesquisa realizada por WINTERS et al. (1984), 27 cães foram infectados experimentalmente com o vírus e demonstrou-se que altos níveis de IgG estavam relacionados com a recuperação da doença, ao passo que os níveis desta imunoglobulina foram baixos nos cães com infecção persistente. A incapacidade de sustentar uma significativa resposta de anticorpos antivirais foi caracterizada nos animais com encefalite fatal.

NOON et al. (1980) relataram que 75% dos cães que não produziram anticorpos contra o vírus, desenvolveram doença do trato respiratório e os 25% restantes morreram. Dos cães que foram capazes de desenvolver uma resposta imune humoral, somente 25% desenvolveram doença respiratória e menos de 5% morreram. Em dez cães não vacinados desafiados com o vírus de campo, CHALMERS & BAXENDALE (1994) observaram que o único cão que recuperou-se da doença, apresentou um título alto de anticorpos após o

desafio (1:2048). OLSON et al. (1997), avaliando o título de anticorpos em cães vacinados, associaram a ausência de títulos detectáveis à falha vacinal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem e delineamento da pesquisa

O estudo foi conduzido no município de Viçosa- MG entre dezembro de 2001 e outubro de 2003.

Amostras de sangue de cães vacinados ou não contra cinomose foram coletadas de animais provenientes da área urbana de Viçosa-MG. A maior parte da coleta foi realizada em cães que utilizaram o atendimento ambulatorial do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Viçosa (HOV-UFV) e em clínicas veterinárias particulares, para consultas de rotina, sendo que apenas os animais saudáveis foram amostrados. A coleta restante realizou-se nas residências dos proprietários.

Uma única amostra de sangue foi obtida de cada animal, sendo que os mesmos foram selecionados aleatoriamente, segundo características pré-estabelecidas para compor os seguintes grupos:

Grupo A - Cães vacinados em clínicas veterinárias, seguindo o protocolo indicado na literatura.

Grupo B - Cães vacinados em clínicas veterinárias, não seguindo o protocolo indicado na literatura.

Grupo C - Cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, seguindo o protocolo indicado na literatura.

Grupo D - Cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, não seguindo o protocolo indicado na literatura.

Grupo E - Cães não vacinados.

O referido protocolo de vacinação indicado na literatura consistiu de três doses da vacina contendo o antígeno viral da cinomose, que compunha-se de vírus vivo modificado, associado a outros antígenos (vacinas polivalentes) administradas a intervalos de 21 a 30 dias, em cães que iniciaram a vacinação com 45 ou 60 dias, ou duas doses da vacina, também a intervalos de 21 a 30 dias, nos cães que começaram a imunização a partir de três meses de idade, sendo que, nos dois casos, recebendo revacinações anuais. Os cães que não receberam a vacinação inicial como indicado acima, ou que não receberam as revacinações anuais, foram reunidos nos grupos em que a vacinação não seguiu o protocolo indicado. Somente foram incluídos no estudo os cães que haviam recebido a última dose de vacina há mais de 30 dias.

Cada grupo foi composto por 30 cães, entre seis meses e seis anos de idade, sadios e independentemente da raça ou sexo, totalizando 150 animais (Quadros 8.1 a 8.5 - Apêndice).

Para a coleta de sangue, foi realizada venopunção da veia cefálica ou jugular, com agulha de 25 x 8 ou 30 x 8 mm⁽¹⁾ e seringa estéreis⁽²⁾. Foram coletados entre 3 e 5mL de sangue, sendo este transferido para um tubo de coleta sem anticoagulante⁽³⁾ e encaminhado ao Laboratório de Virologia do Departamento de Veterinária (DVT) da UFV. O sangue já coagulado foi centrifugado⁽⁴⁾ a 1500g, por 5 minutos, para a separação do soro. Este último foi removido, aliquotado em aproximadamente sete amostras de 150 µL e

⁽¹⁾ B-D;

⁽²⁾ Unijet;

⁽³⁾ Vacutainer;

⁽⁴⁾ Centrifugador Excelsa Baby 1, FANEM Mod. 206.

congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da realização do teste de soroneutralização. O soro de cada animal foi analisado para detectar o título de anticorpos contra o vírus da cinomose, por meio do teste de soroneutralização.

Concomitantemente à coleta de sangue, foi aplicado um questionário (Quadro 8.6 - Apêndice) aos proprietários dos cães participantes do estudo, para a obtenção de informações referentes ao histórico de vacinação do animal, onde as datas e os locais de todas as vacinações foram registrados, assim como a idade, o sexo e a raça do cão. Foi questionado o histórico de doenças anteriores e a frequência de contato com outros cães. O nome, endereço e telefone dos proprietários foram obtidos, além da data da coleta do sangue.

3.2. Padronização do teste de soroneutralização

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Virologia (DVT-UFV) e no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários (BIOAGRO-UFV).

3.2.1. Vírus

O isolado Snyder Hill (ATCC VR-526) do vírus da cinomose adaptado em células VERO foi cedido por uma empresa produtora de vacinas veterinárias⁽⁵⁾, sendo aliquotado e congelado em nitrogênio líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$).

3.2.2. Cultura celular

Para a inoculação do vírus em cultivo celular, uma linhagem de células renais caninas (MDCK - “Madin-Darby canine kidney”- ATCC CCL-34) foi utilizada. As células foram cultivadas em garrafas plásticas para cultura celular de 25cm^2 , mantidas em meio de cultivo constituído de Meio Essencial Mínimo

⁽⁵⁾ Laboratório Hertape Ltda.- www.hertape.com.br;

(MEM)⁽⁶⁾, suplementado com 0,2g/L de estreptomicina, 0,15g/L de penicilina G potássica e 10% de soro fetal bovino inativado (SFB)⁽⁷⁾ a um pH 7,2. O cultivo celular foi mantido em estufa de CO₂ (5% CO₂), com 70% de umidade e a 37 °C.

3.2.3. Adaptação do vírus em MDCK

Com o objetivo de adaptar o vírus às células MDCK, procedeu-se a inoculação viral no cultivo celular (1^a passagem). Para tanto, utilizou-se uma garrafa de células MDCK na 255^a passagem, após 24 horas da tripsinização (tripsina 1:250⁽⁸⁾ 0,5g/L, NaCl 8g/L, glicose 1g/L, NaHCO₃ 0,35g/L, KCl 0,4g/L, EDTA 0,25g/L, pH 7,8). Primeiramente, o meio de cultivo foi removido da garrafa e 1mL do cultivo viral foi adicionado ao tapete celular. A garrafa foi incubada por 1 hora em estufa de CO₂, sendo que a cada 15 minutos a mesma era homogeneizada. Após 1 hora de incubação, 3mL de meio de cultivo suplementado com 150µL de SFB foi adicionado e a garrafa novamente incubada.

Após 4 dias, a cultura celular inoculada com o vírus (ainda sem efeito citopático), foi tripsinizada e metade do conteúdo ressuspendido em novo meio de cultivo, mantendo-se, assim, a 1^a passagem do vírus em incubação por mais 3 dias.

No 3^o dia, a cultura foi novamente tripsinizada e ressuspendida, permanecendo sob incubação durante 4 dias, na tentativa de se aumentar o título viral, e então, alíquotada e armazenada em nitrogênio líquido.

Uma ampola com a 1^a passagem foi descongelada, centrifugada⁽⁹⁾ a 18.000g, a 4 °C, por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e inoculado em novo cultivo de células MDCK, resultando na 2^a passagem viral. Passados dois dias,

⁽⁶⁾ Cultilab;

⁽⁷⁾ Seromed;

⁽⁸⁾ Sigma;

⁽⁹⁾ Centrífuga Sigma 2K15.

quando o efeito citopático do vírus era evidente, a cultura foi tripsinizada, metade do conteúdo ressuspendido em novo meio de cultivo e incubada. Após 3 dias, o cultivo foi aliquoteado e armazenado em nitrogênio líquido.

Uma ampola com 200µL da 2^a passagem foi descongelada, homogeneizada com 500µL de MEM e inoculada em um cultivo de células MDCK, resultando na 3^a passagem do vírus. Não sendo observado efeito citopático após 2 dias da inoculação, a cultura celular foi tripsinizada e a metade de seu conteúdo mantido em incubação por mais 3 dias. No 4^o dia, como o efeito citopático do vírus era evidente, o cultivo inoculado foi aliquoteado e armazenado em nitrogênio líquido. Esta 3^a passagem foi titulada e utilizada nos testes de soroneutralização.

3.2.4. Produção de células MDCK para os testes de soroneutralização

Células MDCK na 257^a passagem foram repicadas em duas garrafas plásticas de 150cm² para cultura celular. Os cultivos celulares foram mantidos com 30mL de MEM, suplementados com 3mL de SFB e incubados em estufa de CO₂. Após 4 dias, com os tapetes celulares confluentes, as células foram congeladas.

As células foram tripsinizadas com uma solução de tampão salino fosfatado (PBS) (NaCl 9,0g/L, K₂H₂PO₄ 0,144g/L e NaH₂PO₄ 0,795g/L, pH 7,2) + tripsina 1:250 ⁽¹⁰⁾ 100mL/L + EDTA 0,2%, pH 7,2. Ocorrida a tripsinização, 20mL de uma solução de PBS + 1mL de SFB inativado⁽¹¹⁾, pH 7,2, foram adicionados a cada garrafa para inativação da tripsina. O cultivo celular em suspensão foi centrifugado a 200g, por 5 minutos, a 4°C, descartando-se o sobrenadante.

As células precipitadas foram ressuspendidas em 7mL de DMEM (“Dulbecco Modified Eagle’s Medium”)⁽¹²⁾ incompleto (suplementado com 1mL

⁽¹⁰⁾ GibcoBRL;

⁽¹¹⁾ Cultilab;

⁽¹²⁾ Sigma D-5280;

de antibiótico-antimicótico⁽¹³⁾ para cada 100mL de DMEM e 1mL de uma solução de L-glutamina a 2% para cada 100mL de DMEM). Uma alíquota de 10µL foi obtida e misturada a igual volume de uma solução de azul de Trypan (PBS + 0,4% de azul de Trypan, pH 7,4). A mistura foi homogeneizada e 10µL foram transferidos para uma câmara de Neubauer, na qual procedeu-se a contagem celular. A suspensão celular contendo 3×10^6 células/mL foi alíquotada e armazenada em nitrogênio líquido para posterior utilização nos testes de soroneutralização.

3.2.5. Descongelamento das células MDCK

O criotubo, com células a serem utilizadas para o teste, foi mantido em banho-maria a 37 °C, até que ocorresse o descongelamento da suspensão celular, que foi então, transferida para um tubo de centrífuga⁽¹⁴⁾ estéril. A este, foi adicionado 10mL de DMEM sem qualquer suplemento, procedendo-se a centrifugação a 200g, por 5 minutos, a 4 °C.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 10mL de DMEM completo (suplementado com 1mL de antibiótico-antimicótico para cada 100mL de DMEM, 1mL de uma solução de L-glutamina a 2% para cada 100mL de DMEM e 10mL de SFB para cada 100mL do mesmo meio de cultivo).

A suspensão celular foi homogeneizada e 5mL transferidos para outro tubo de centrífuga, onde permaneceram por aproximadamente 4 horas em gelo, para então serem distribuídos nas placas de soroneutralização.

⁽¹³⁾ Sigma A 7292

⁽¹⁴⁾ Fisherbrand;

3.2.6. Titulação viral

O título viral foi determinado por meio de um ensaio em microplaca de 96 pocinhos⁽¹⁵⁾. Para tanto, uma ampola de células MDCK foi descongelada, como já descrito, e as células foram distribuídas na placa (15.000 células/pocinho), na qual várias diluições da 3ª passagem do vírus (10^{-1} a 10^{-10}) foram inoculadas previamente. As diluições seriadas do vírus foram misturadas a igual volume de suspensão celular.

A placa foi incubada em estufa de CO₂ e após 5 dias, os pocinhos apresentando efeito citopático foram identificados e o título viral calculado pelo método de REED & MUENCH (1938) (Apêndice- 8.7). O título viral obtido foi 1×10^6 doses infectantes por cultura de tecido 50% (DICT 50%/mL).

3.2.7. Teste de soroneutralização em microplacas

A avaliação quantitativa de anticorpos contra o vírus da cinomose nos soros foi realizada por meio do método de soroneutralização, segundo técnica descrita por APPEL & ROBSON (1973), com as seguintes modificações.

As amostras de soro previamente coletadas foram descongeladas e inativadas pelo calor a 56 °C em banho-maria, por 30 minutos. Foram realizados testes preliminares com diferentes diluições dos soros, com o objetivo de comparar o efeito tóxico destes sobre as células. Como as diluições menores que 1:10 de alguns soros foram tóxicas para as células, causando morte celular e impedindo a leitura dos testes, o título inicial utilizado foi 1:10. Os soros foram diluídos, na microplaca de 96 pocinhos, em DMEM incompleto, obtendo-se as seguintes diluições: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Cada soro foi testado em duplicata.

Em cada soroneutralização realizada, foram incluídas uma amostra de soro negativo para anticorpos contra o vírus da cinomose (SFB) e uma amostra de

⁽¹⁵⁾ Nunclon-NUNC Brand Products.

soro positivo, com título de anticorpos conhecido, previamente testada, como controle negativo e positivo, respectivamente. Estes controles foram testados em triplicata. Após a diluição dos soros, as placas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C, enquanto procedia-se o descongelamento das células MDCK.

As células MDCK utilizadas para os testes de soroneutralização foram descongeladas e mantidas em suspensão no meio de cultivo, por quatro horas e, em seguida, distribuídas nas placas. Este método foi realizado pois observou-se que as células não se multiplicavam quando semeadas nas placas logo em seguida ou duas horas após o descongelamento.

O cultivo viral com título conhecido (3ª passagem do vírus em MDCK) foi descongelado e diluído em DMEM incompleto, obtendo-se as diluições 10^{-1} a 10^{-7} . Aos pocinhos contendo 50µL dos soros a serem testados, previamente diluídos, foi adicionado o mesmo volume da diluição viral correspondente a 100 DICT 50%/mL (diluição 10^{-4}).

Para cada coluna da placa, correspondente a um soro testado, um pocinho foi mantido como controle de soro (sem adição do vírus), para testar a sua toxicidade sobre as células. A cada soroneutralização realizada, quatro pocinhos permaneceram como controle de células, contendo apenas meio de cultivo e células. Também realizou-se a cada soroneutralização, uma titulação do vírus para determinar se o título viral estava mantendo-se constante.

As placas com a mistura soro-vírus foram incubadas por 1 hora em estufa de CO₂, para que ocorresse a neutralização do vírus pelo anticorpo. Após 1 hora de incubação, as células MDCK foram distribuídas nas placas de soroneutralização. A cada pocinho foi adicionado 50µL da suspensão celular contendo aproximadamente 15.000 células em DMEM completo.

As placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ e após seis dias procedeu-se a leitura em microscópio invertido, para verificar a presença ou ausência de efeitos citopáticos que, quando presentes, indicavam a ausência de anticorpos em títulos suficientes para bloquear a ação do vírus sobre o tapete celular.

A atividade neutralizante do soro foi expressa como a maior diluição dos anticorpos que protegeu as células contra o efeito citopático. O título viral foi calculado pelo método de REED & MUENCH (1938). Os títulos de anticorpos abaixo de 1:10 foram considerados negativos.

3.3. Análise estatística

O estudo constituiu-se de um delineamento inteiramente casualizado, com 30 repetições (30 cães por grupo). Foi realizada análise de variância, desdobrando-se os efeitos em graus individuais de liberdade, por meio de contrastes ortogonais, no intuito de comparar os títulos dos diversos grupos. O título de machos e fêmeas e o título influenciado por contato com outros cães foram comparados pelo teste t de Student. Além disso, foram selecionados modelos de regressão com base na resposta biológica esperada e no coeficiente de determinação (R^2), que relacionaram o título de anticorpos ao número de doses de vacinas recebidas e à idade dos cães (PIMENTEL GOMES, 1985; COSTA NETO, 1999). Foram consideradas significativas, as comparações entre médias, até 10% de probabilidade.

Para avaliar a existência de correlação entre a idade e o título de anticorpos, assim como entre o número de doses da vacina recebida pelos cães e o título de anticorpos, foram considerados na análise de regressão, a média dos dados com, no mínimo, duas repetições. A equação de regressão utilizada para explicar a correlação entre o título de anticorpos e a idade, foi derivada e igualada a zero para determinar o ponto máximo da curva. Para avaliar a correlação entre o número de doses da vacina recebida pelos cães e o título de anticorpos, o número de doses foi substituído na equação de regressão, considerando-se o título estável quando um número de doses não gerou aumento de um pocinho, nas diluições seriadas, em relação à dose anterior.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Aspectos relacionados à execução da técnica de soroneutralização

Nos testes de soroneutralização realizados neste estudo, para a quantificação de anticorpos contra o vírus da cinomose, utilizou-se inicialmente o cultivo de células Vero. Entretanto, observou-se que o efeito citopático do vírus nestas células (formação de sincícios) foi de difícil visualização. Desta forma, optou-se pelas células MDCK, nas quais o efeito do vírus pôde ser melhor avaliado.

Nos testes de soroneutralização em cultura celular para o vírus da cinomose, geralmente utiliza-se a concentração viral de 100 DICT 50%/mL, como demonstrado pela maioria dos trabalhos publicados. Porém, não foi possível manter esta concentração constante no presente estudo, devido à variação dos títulos em cada alíquota de vírus descongelada. Isto resultou em concentrações virais que variaram de 35 a 750 DICT 50 %/mL. BAKER et al. (1954) também relataram que um número de titulações em diferentes alíquotas de vírus do mesmo lote, mostrou variação considerável no título viral, de até 10 vezes em alguns casos.

BAKER et al. (1954), GILLESPIE et al. (1958), JOHNSTON et al. (1959) e BAKER et al. (1959), referindo-se à soroneutralização em ovos embrionados, afirmaram que a quantidade de vírus utilizada para o teste deve ser levada em consideração, por existir uma relação inversa entre o título de anticorpos encontrado no soro e a quantidade de vírus preconizada para o teste. Por isso, no presente estudo, um soro com título de anticorpo conhecido (1:320) foi testado em triplicata, para cada alíquota de vírus descongelada. Porém, a variação no título viral, provavelmente, não influenciou nos títulos de anticorpos dos soros testados, pois a titulação do soro controle manteve-se constante em todas as soroneutralizações.

4.2. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo os grupos de cães estudados

O grupo de cães não vacinados (grupo E) apresentou menor título médio de anticorpos em comparação a todos os grupos de cães vacinados ($p= 0,003$), conforme Tabelas 1 e 2. Esta observação é ilustrada pela elevada porcentagem (90%) de cães com títulos negativos no grupo E (Tabela 3). Da mesma forma, OTT et al. (1955) descreveram que o título médio do grupo de cães vacinados foi maior que o do grupo não vacinado. Também, em um estudo realizado por OLSON et al. (1997), nenhum dos dez cães não vacinados apresentou títulos detectáveis pelo teste de soroneutralização.

Tabela 1- Média aritmética dos títulos de anticorpos (\log_{10}) neutralizantes contra a cinomose, Viçosa, 2004.

Grupos ^{1/}	Média aritmética (\log_{10})
A	0,7609 (15) ^{2/}
B	0,7344 (13)
C	0,6677 (11)
D	0,3204 (6)
E	0,1560 (3)

^{1/} A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; D = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários não seguindo o protocolo indicado na literatura; E = cães não vacinados; ^{2/} entre parênteses: número de cães com título de anticorpos positivo.

Tabela 2 – Contrastes dos títulos (\log_{10}) de anticorpos neutralizantes contra a cinomose, Viçosa, 2004.

FV ^{1/}	QM ^{2/}	p ^{3/}
Contrastes Ortogonais		
E vs ABCD ^{4/}	5,185	0,003**
AB vs CD	1,929	0,079 ^o
A vs B	0,011	0,912
C vs D	1,809	0,089 ^o
Contrastes Adicionais		
A vs C	0,130	0,631
B vs D	2,570	0,042*

^{1/} FV = Fonte de Variação; ^{2/} QM = Quadrado Médio; ^{3/} p = probabilidade; ^{4/} A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; D = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários não seguindo o protocolo indicado na literatura; E = cães não vacinados; **, * e ^o, significativo a 1, 5 e 10% de probabilidade, respectivamente.

Por outro lado, OTT et al. (1953) citados por BAKER et al. (1954), relataram altos títulos de anticorpos neutralizantes em cães com nenhuma história de vacinação ou infecção pelo vírus. Os autores sugeriram a existência de infecções inaparentes e a ocorrência de portadores sãos.

Pela experiência verificada no HOV-UFV, esperava-se que, no grupo de cães não vacinados (grupo E), fosse encontrada uma porcentagem mais alta de cães com título de anticorpos, uma vez que, todos os anos, vários animais são atendidos com diagnóstico clínico de cinomose, sugerindo que estes cães estariam entrando em contato com o vírus a partir de cães doentes ou com infecção subclínica.

Conforme já explicado, dos 30 cães não vacinados do grupo E, 90% (27/30) não apresentaram título de anticorpos contra o vírus da cinomose (Tabela 3), sugerindo que não entraram em contato com o vírus, uma vez que, não apresentaram sinais anteriores sugestivos da doença. Além disso, provavelmente, também não foram subclínicamente infectados, já que segundo APPEL (1969), os cães com infecção subclínica produzem anticorpos contra o vírus.

Tabela 3 – Número e percentual de cães pertencentes a cada grupo, segundo variáveis obtidas por meio da aplicação do questionário, Viçosa, 2004.

VARIÁVEIS	Grupo ^{1/}				
	A	B	C	D	E
IDADE (meses)					
6 a 16	17 (56,7) ^{2/}	4 (13,3)	26 (86,7)	7 (23,3)	13 (43,3)
17 a 36	7 (23,3)	17 (56,7)	3 (10,0)	14 (46,7)	7 (23,3)
Acima de 36	6 (20,0)	9 (30,0)	1 (3,3)	9 (30,0)	10 (33,3)
CONTATO					
Nunca	4 (13,3)	5 (16,7)	11 (36,7)	6 (20,0)	7 (23,3)
Raro	5 (16,7)	7 (23,3)	9 (30,0)	3 (10,0)	3 (10,0)
Eventual	17 (56,7)	11 (36,7)	4 (13,3)	6 (20,0)	4 (13,3)
Freqüente	4 (13,3)	7 (23,3)	6 (20,0)	15 (50,0)	16 (53,3)
ÚLT. DOSE (meses)					
Até 6	16 (53,3)	2 (6,7)	17 (56,7)	3 (10,0)	-
De 7 a 11	14 (46,7)	3 (10,0)	13 (43,3)	4 (13,3)	-
De 12 a 24	-	22 (73,3)	-	11 (36,7)	-
Acima de 24	-	3 (10,0)	-	12 (40,0)	-
SEXO					
Machos	13 (43,3)	15 (50)	14 (46,7)	16 (53,3)	12 (40,0)
Fêmeas	17 (56,7)	15 (50)	16 (53,3)	14 (46,7)	18 (60,0)
TÍTULO					
Negativo	15 (50,0)	17 (56,7)	19 (63,3)	24 (80,0)	27 (90,0)
< nível protetor (1:100)	13 (43,3)	9 (30,0)	8 (26,7)	4 (13,3)	3 (10,0)
> nível protetor (1:100)	2 (6,7)	4 (13,3)	3 (10,0)	2 (6,7)	-

^{1/} A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo indicado na literatura; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura; D = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários não seguindo o protocolo indicado na literatura; E = cães não vacinados.;

^{2/} porcentagens do número de cães relativo às características avaliadas, por grupo.

O presente estudo não teve como objetivo traçar o perfil epidemiológico em relação à prevalência dos títulos de anticorpos na população canina do município. No entanto, de acordo com as observações citadas, é possível que o vírus da cinomose não esteja ocorrendo de forma endêmica no município de Viçosa-MG, uma vez que 77,8% (21/27) dos cães do grupo E que apresentaram títulos negativos, tiveram, em algum momento, contato com outros cães e, portanto, a possibilidade de infecção pelo vírus selvagem.

Outra explicação seria da doença ter caráter endêmico, porém com pequena sobrevivência dos cães doentes. Assim, a maioria dos cães estaria entrando em contato com o vírus, adoecendo e morrendo, não corroborando a afirmação de GREENE & APPEL (1990), para os quais até 75% das infecções são subclínicas, com conseqüente produção de anticorpos (APPEL, 1969).

Uma outra possibilidade seria que os casos diagnosticados clinicamente como cinomose no HOV-UFV, não se tratam de infecção causada pelo vírus em questão, uma vez que testes laboratoriais visando o diagnóstico definitivo desta enfermidade, em geral, não são realizados. Esta suposição poderia explicar os 90% de títulos negativos no grupo de cães não vacinados, pois diferentemente do que se pensava, esta virose pode não estar ocorrendo com uma frequência suficientemente alta, para manter a imunidade da população canina. Dessa forma, os diagnósticos diferenciais para cinomose, já citados anteriormente, deveriam ser considerados nos casos suspeitos da doença.

O título médio de anticorpos de todos os cães vacinados em clínicas veterinárias, independentemente do protocolo indicado pela literatura (grupos A e B), foi maior do que o título médio de anticorpos de todos os cães vacinados em lojas que comercializam produtos agropecuários (grupos C e D), conforme o contraste: AB vs CD ($p = 0,079$) (Tabelas 1 e 2).

Quando contrastes adicionais foram realizados, no entanto, observou-se que o título médio de anticorpos do grupo de cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo (grupo B) foi maior do que o título médio de anticorpos dos cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, também não seguindo o protocolo indicado (grupo D) ($p = 0,042$), conforme Tabelas 1 e 2. Este fato, portanto, foi o responsável pela diferença observada entre os grupos AB e CD, uma vez que o título médio de anticorpos não diferiu entre os cães vacinados seguindo o protocolo indicado, em clínicas veterinárias ou lojas de produtos agropecuários (grupos A e C, respectivamente) ($p = 0,631$), como demonstrado nas Tabelas 1 e 2.

Observou-se também que houve diferença entre os títulos de anticorpos dos cães vacinados, seguindo ou não o protocolo indicado, em lojas de produtos agropecuários (grupos C e D) ($p = 0,089$), mas não para os cães vacinados em clínicas veterinárias, independentemente do protocolo (grupos A e B) ($p = 0,912$), conforme Tabelas 1 e 2. Isto demonstra que a duração da imunidade foi maior para os cães vacinados em clínicas veterinárias, uma vez que os grupos

B e D foram formados, principalmente, por cães que não receberam as revacinações quando adultos.

De acordo com estas observações, pode-se inferir que não há diferença entre vacinar um cão em uma loja de produtos agropecuários ou em uma clínica veterinária, desde que a vacinação seja feita dentro do protocolo indicado, ou seja, 2 ou 3 doses de vacina quando filhote e revacinações dos cães adultos.

A diferença observada entre os grupos B e D, poderia ser explicada pelos diferentes tipos de cães que freqüentam ambos estabelecimentos. Os cães vacinados em clínicas veterinárias pertencem a proprietários com um melhor poder aquisitivo, considerando o maior custo das vacinas comercializadas nestes estabelecimentos, quando comparados aos cães vacinados em lojas de produtos agropecuários. Conseqüentemente, os primeiros tendem a receber melhor alimentação e cuidados com a saúde, fatores que, segundo POVEY (1986) e OSBURN & STOTT (1989), influenciam positivamente na resposta imunológica. No entanto, esta explicação não se justifica plenamente, já que os títulos de anticorpos entre os grupos A e C, também vacinados em clínicas veterinárias e lojas de produtos agropecuários, respectivamente, não diferiram (Tabelas 1 e 2). Uma outra explicação para a diferença entre os grupos B e D seria a má conservação das vacinas comercializadas em lojas de produtos agropecuários. Entretanto, esta explicação também não se justifica, pois os títulos de anticorpos entre os grupos A e C não diferiram (Tabelas 1 e 2).

É possível, então, que as vacinas comercializadas em lojas de produtos agropecuários, tenham uma menor eficácia, em virtude de não conferirem imunidade tão prolongada como as vacinas de clínicas veterinárias, pois como afirmado por TIZARD & NI (1998), a qualidade de uma vacina é avaliada, entre outros fatores, pela duração da imunidade por ela conferida. Esta falha, no entanto, pode ser superada, como já mencionado, vacinando os cães segundo o protocolo indicado.

Vários trabalhos publicados, que mensuraram os anticorpos contra cinomose por meio da soroneutralização, consideraram protegidos os cães que

desenvolveram títulos de anticorpos a partir de 1: 100 (YORK & BURCH, 1961; POVEY, 1986; McCAW et al., 1998). Este título também foi definido como protetor, após os cães terem sobrevivido ao desafio de exposição com vírus selvagem, em trabalho realizado por APPEL (1969).

Uma grande porcentagem de títulos negativos foi encontrada em todos os grupos de cães vacinados, o que não era esperado: grupo A = 50% (15/30), B = 56,7% (17/30), C = 63,3% (19/30), D = 80% (24/30), como demonstrado pela Tabela 3. Além disso, dentre os cães vacinados que apresentaram títulos detectáveis, a porcentagem dos títulos de anticorpos neutralizantes considerados protetores pela literatura ($> 1:100$) foi baixa: grupo A = 13,33% (2/15), B = 30,77% (4/13), C = 27,27% (3/11) e D = 33,33% (2/6).

Nenhuma vacina imuniza 100% de uma população, devido entre outros fatores, às variações biológicas (GREENE, 1990). No entanto, RIKULA et al. (2000), pesquisando os níveis de anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose, em cães com histórico de vacinação conhecido, questionaram a imunogenicidade das vacinas com as quais os cães foram vacinados, devido aos baixos títulos de anticorpos encontrados e afirmaram que uma vacina suficientemente imunogênica deveria produzir uma pequena proporção de cães sem títulos de anticorpos e um aumento na proporção de cães com níveis altos.

A amostragem realizada não permite que sejam feitas inferências sobre a população canina de Viçosa-MG. Porém, se o grande número de casos suspeitos da doença, atendidos todos os anos no HOV-UFV, tratar-se realmente de infecção pelo vírus da cinomose, é possível que este fato seja uma consequência da baixa imunidade desta população, de forma geral, e não apenas dos cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, como suspeitado inicialmente. Dessa forma, pesquisas devem ser desenvolvidas para avaliar a imunogenicidade das vacinas comercializadas atualmente, tanto em clínicas veterinárias quanto em lojas de produtos agropecuários, levando em consideração a importante afirmação de RIKULA et al. (2000) de que a performance de qualquer vacina deve ser testada em ensaios de campo e não somente no laboratório.

A maioria das vacinas contra cinomose comercializadas atualmente é polivalente, o que, segundo DAVIES & PIDFORD (1991), compromete o desenvolvimento de uma adequada resposta imunológica. Estes autores sugeriram que vacinas com múltiplos componentes devem ser usadas com cautela, pois demonstraram que uma vacina contendo cinco antígenos diferentes, incluindo o da cinomose, promoveu uma menor resposta no título de anticorpos contra todos os antígenos, quando comparada à aplicação de uma vacina com quantidade menor de antígenos. Também para SCHULTZ (1995), quanto mais componentes são combinados em uma única vacina, maior será a interferência de um antígeno com outro. Neste caso, há competição entre as células apresentadoras de antígeno, podendo impedir que o animal responda normalmente a cada um deles.

Em outro estudo, 11 cães filhotes da raça Beagle, mantidos em isolamento foram vacinados com três doses de vacina. Os anticorpos, mensurados pela soroneutralização, estavam presentes em títulos elevados em todos os participantes do experimento, mesmo 30 dias após a aplicação da primeira dose, sendo o título médio de 4016 (BIAZZONO et al., 2001). No entanto, os cães foram mantidos em isolamento e receberam vacina monovalente para cinomose, fatores que podem ter influenciado os títulos de anticorpos alcançados.

Apesar da grande quantidade de títulos negativos e títulos baixos encontrados, mesmo em cães vacinados, pode-se afirmar, nas condições do presente estudo, que a vacinação ainda é uma ferramenta importante para a prevenção da cinomose, considerando a diferença entre cães vacinados e não vacinados (Tabelas 1 e 2).

4.3. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo a idade e o sexo

Avaliando os títulos negativos por faixa etária nos grupos A e C (cães vacinados de acordo com o protocolo indicado) observou-se que no grupo A (cães vacinados em clínicas veterinárias) todos os animais com títulos de

anticorpos negativos concentraram-se nos 17 animais entre seis e 15 meses de idade, sendo que apenas dois dos 17 cães (11,8%) nesta faixa etária, apresentaram títulos detectáveis. Por outro lado, os 13 cães com idade acima de 15 meses apresentaram título de anticorpos.

A interferência dos anticorpos maternos, ainda presentes nestes animais no momento da imunização inicial, pode estar relacionada com os títulos negativos encontrados, uma vez que, segundo POVEY (1986) e GREENE (1990), a vacinação na presença de anticorpos maternos é a causa mais comum de interferência vacinal em animais jovens.

No grupo C, dos 11 cães que apresentaram título de anticorpos, nove (81,8%) tinham entre seis e 16 meses de idade. Destes nove cães, no entanto, cinco (55,55%) iniciaram a vacinação mais tarde do que o indicado, sendo quatro cães a partir dos três meses de idade e um cão aos dois meses e meio, diferentemente dos cães do grupo A, que iniciaram a vacinação aos 45 dias ou dois meses de idade, como recomenda o protocolo.

A idade exata na qual os filhotes perdem a sua proteção maternal e tornam-se capazes de desenvolver uma imunidade ativa, varia em cada ninhada (BAKER et al., 1959). Estes autores consideraram que o momento para vacinar uma ninhada deve ser aquele em que todos os filhotes estiverem com títulos de anticorpos maternos abaixo de 1:20, porém, nem todos os filhotes da ninhada perdem sua proteção exatamente ao mesmo tempo.

É possível que a falta da interferência dos anticorpos maternos tenha sido a responsável pela maior porcentagem de filhotes que responderam à vacinação no grupo C, já que 55,55% destes animais iniciaram e, conseqüentemente, terminaram o esquema de imunização mais tarde (após os quatro meses de idade), período no qual os anticorpos maternos já deviam ter declinado para níveis que não interferiram com o vírus vacinal.

É provável também que as vacinas comercializadas nos dois tipos de estabelecimentos sejam pouco imunogênicas. Baixos títulos virais contidos na vacina a tornam altamente suscetível à interferência dos anticorpos maternos em

filhotes, fazendo com que o antígeno seja neutralizado antes de se replicar (TIZARD & NI, 1998). Outra possibilidade é das vacinas polivalentes não terem sido capazes de estimular uma resposta imunológica, devido à competição antigênica por elas induzida.

Considerando que a maior incidência da doença se dá até os 12 meses de idade (GORHAM, 1966a; GOUVEIA et al., 1987) e de acordo com as observações deste estudo, é provável que o maior número de casos de cinomose nesta faixa etária, em cães vacinados, pode ser explicado por falhas na vacinação decorrentes da interferência dos anticorpos maternos e, ou, pela aplicação de vacinas pouco imunogênicas. Estas falhas talvez possam ser superadas por um programa de imunização que termine após os filhotes completarem quatro meses de idade, ou melhorando a qualidade das vacinas com o uso, por exemplo, de vacinas monovalentes para cinomose.

Para avaliar a existência de correlação entre a idade e o título de anticorpos, foi realizada análise de regressão para o grupo A. Nos grupos B e D (cães vacinados fora do protocolo indicado), esta análise não foi realizada porque outras variáveis, além da idade, podem ter influenciado no título de anticorpos, uma vez que os cães destes grupos não foram adequadamente vacinados. Para o grupo C, não foi encontrado modelo que explicasse a variação da idade em função do título. No grupo E, a quantidade de títulos negativos impediu a análise.

Para o grupo A, foi selecionado o modelo raiz quadrático, com base no comportamento esperado do título em função da idade e no R^2 , que explicou 73% dos resultados observados. Derivando-se a equação de regressão (Figura 1) e igualando-a a zero pôde-se observar que o título aumentou até 44,5 meses (ponto de máximo da curva), diminuindo após esta idade.

Como discutido anteriormente, cães até 15 meses apresentaram título de anticorpos mais baixo. A partir daí, a ausência dos anticorpos maternos, provavelmente, permitiu maior resposta imunológica, explicando o aumento observado até 44,5 meses. SCHULTZ (1984) extrapolando para cães os resultados obtidos em trabalhos com camundongos, afirmou que na idade de 48 a

72 meses, há um declínio na imunidade celular e humoral, devido à imunosenescência, o que está de acordo com os resultados deste trabalho, considerando a imunidade humoral.

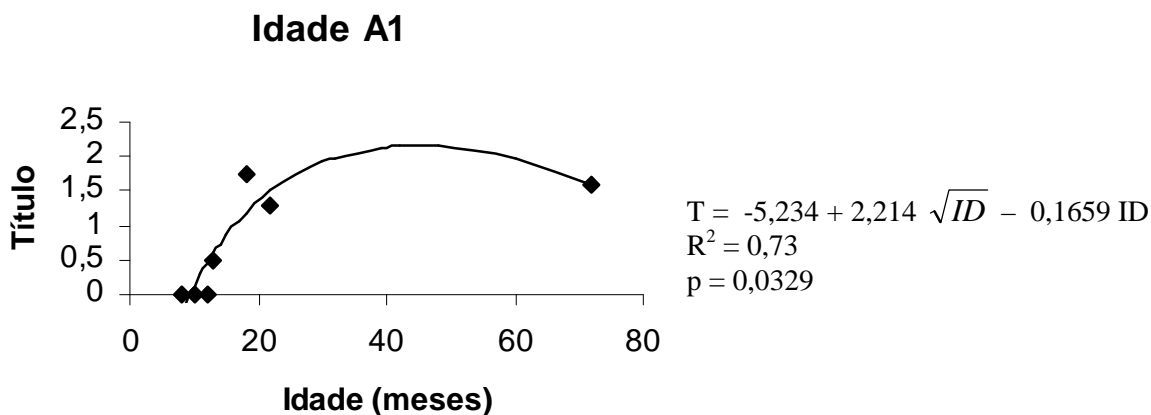


Figura 1 – Título de anticorpos contra cinomose canina, segundo a idade dos cães vacinados em clínica veterinária seguindo o protocolo de vacinação indicado, Viçosa, 2004.

A comparação entre os títulos de anticorpos em relação ao sexo dos animais, foi realizada apenas para os grupos A e C. Nos grupos B e D, esta análise não foi feita, por haver outras variáveis que poderiam influenciar nos resultados, já que estes cães não foram vacinados segundo o protocolo indicado. No grupo E, a quantidade de títulos negativos impediu a análise.

O título de anticorpos de machos e fêmeas não diferiu pelo teste de t a 10 % de probabilidade (Tabela 4). Isto significa que o título não foi influenciado pelo sexo. Esta observação foi corroborada por outros autores (OTT et al., 1955; McCaw et al., 1998; TWARK & DODDS, 2000; RIKULA et al., 2000).

Tabela 4 – Valores “t” de Student para as comparações dos títulos de anticorpos contra a cinomose canina determinados no soro de machos e fêmeas, Viçosa, 2004.

Grupos	Valores de “t”
A	-0,513 (p > 0,10)
C	0,065 (p > 0,10)

Grupo A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo indicado na literatura;
 Grupo C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo indicado na literatura

4.4. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo a freqüência de contato com outros cães

A comparação entre o título de anticorpos em relação à freqüência de contato com outros cães foi analisada para os grupos A, B e C. No grupo D, esta análise foi inviabilizada, porque todos os títulos positivos pertenciam aos cães com contato freqüente. Isto não significa que o contato tenha sido o fator determinante no título de anticorpos deste grupo, uma vez que, no grupo E, dos 27 cães que não apresentaram títulos detectáveis, 77,8% (21/27) tiveram, em algum momento, contato com outros cães. No grupo E, a quantidade de títulos negativos também impediu a comparação.

A média dos títulos de anticorpos dos animais que nunca haviam tido contato com outros cães foi comparada, separadamente, à média dos títulos de anticorpos dos cães que haviam tido algum tipo de contato, classificado, segundo os proprietários dos cães, como raro, eventual ou freqüente. Em todos os grupos estudados, o título de anticorpos não foi influenciado pela existência ou não de contato com outros cães, independente da freqüência deste, a 10% de probabilidade (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores “t” de Student para as comparações dos títulos séricos de anticorpos contra a cinomose canina, em relação ao contato com outros cães, Viçosa, 2004.

Comparações	Valores de “t”
Grupo A ^{1/}	
Nunca ^{2/} vs Raro	0,726 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	0,296 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	-0,268 (p > 0,10)
Grupo B	
Nunca vs Raro	-0,475 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	-0,602 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	-0,336 (p > 0,10)
Grupo C	
Nunca vs Raro	1,123 (p > 0,10)
Nunca vs Eventual	0,318 (p > 0,10)
Nunca vs Freqüente	0,754 (p > 0,10)

^{1/} A = cães vacinados em clínicas veterinárias seguindo o protocolo de vacinação indicado; B = cães vacinados em clínicas veterinárias não seguindo o protocolo de vacinação indicado; C = cães vacinados em lojas de produtos agropecuários seguindo o protocolo de vacinação indicado;
^{2/} Nunca = cães que nunca haviam tido contato com outros; Raro = contato raro com outros cães; Eventual = contato eventual com outros cães; Freqüente = contato freqüente com outros cães.

Este resultado difere de alguns encontrados na literatura. OTT et al. (1955) avaliaram a resposta de anticorpos de cães saudáveis, por meio da soroneutralização, e observaram que um dos fatores que influenciou o nível de anticorpos neutralizantes, foi o contato com outros cães. Segundo estes autores, a exposição ao vírus variou consideravelmente entre cães da área urbana e rural. A maioria dos cães urbanos não vacinados mostrou um título de anticorpos consideravelmente maior, em relação aos cães da área rural, também não vacinados. Parece que a exposição repetida ao vírus foi necessária para manter um título de anticorpo neutralizante relativamente alto. FENNER et al. (1992) também afirmaram que o contato com outros cães é fator determinante para a presença de anticorpos contra o vírus.

No presente estudo, 90% (27/30) dos cães de área urbana não vacinados apresentaram títulos negativos, mais uma vez, enfatizando as suposições já levantadas, de que os cães não tiveram contato com o vírus selvagem. Este resultado também é forte indício de que os títulos de anticorpos mensurados pelo

teste de soroneutralização, provavelmente, são conseqüentes da vacinação anterior e não do contato com outros cães, fato que proporciona maior credibilidade às suposições levantadas por esta pesquisa.

4.5. Avaliação dos títulos de anticorpos segundo o número de doses recebidas pelos cães e o tempo decorrido desde a última dose da vacina

Para verificar a existência de correlação entre o título de anticorpos e o número de doses da vacina recebida pelos cães, foi realizada análise de regressão para os grupos A e B em conjunto, no intuito de obter repetições suficientes para a análise. Foi selecionado o modelo hiperbólico, que melhor se adaptou aos dados e que explicou 76 % dos resultados.

Substituindo-se o número de doses na equação de regressão (Figura 2), observa-se um aumento acentuado no título de anticorpos até cinco doses, em relação às diluições seriadas, utilizadas para o teste de soroneutralização deste estudo. Entre a 5^a e a 6^a dose não há aumento do título, sendo que este torna a aumentar, em uma diluição, com sete doses da vacina, e novamente, com 10 doses. Substituindo o valor de 20 doses na equação, observa-se que não há aumento no título, em relação a 10 doses, nas diluições seriadas.

Portanto, até cinco doses da vacina há um aumento acentuado no título de anticorpos, sendo que, a partir disso, o título atinge um patamar onde praticamente se estabiliza. Dessa forma, a revacinação dos cães adultos deve ser realizada, pois permite que o título permaneça em um nível estável, atenuando o possível efeito de redução no título em função do tempo, o qual, segundo ABLETT & BAKER (1963), inicia-se dois meses após a última vacinação.

Para os grupos C e D, avaliados em conjunto, não foi possível encontrar um modelo que explicasse o título de anticorpos em função do número de doses.

Grupos A e B

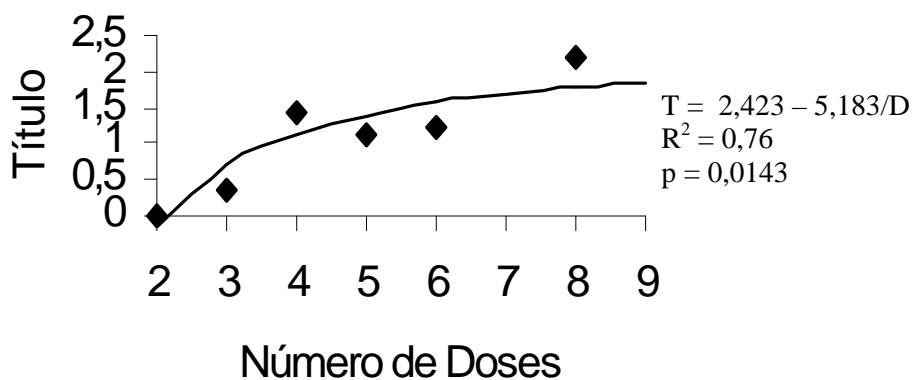


Figura 2 - Título de anticorpos contra cinomose canina, em função do número de doses aplicadas em cães vacinados em clínica veterinária seguindo ou não o protocolo de vacinação indicado

Não foi encontrado modelo que explicasse o título de anticorpos em função do tempo decorrido desde a última dose da vacina aplicada, considerando o conjunto de cães vacinados em clínicas veterinárias e em lojas de produtos agropecuários, dentro do protocolo indicado (grupos AB e CD). OTT et al. (1955) também não encontraram relação entre título de anticorpos e tempo desde a última imunização.

5. CONCLUSÕES

Nas condições do presente estudo pôde-se concluir que:

- ✓ Não há diferença em vacinar os cães contra cinomose, em clínicas veterinárias ou lojas que comercializam produtos agropecuários desde que a vacinação seja realizada seguindo o protocolo indicado pela literatura, ou seja, 2 a 3 doses da vacina, a intervalos de 21 a 30 dias, com revacinações dos cães adultos.
- ✓ A vacinação contra cinomose é importante, considerando que os animais vacinados apresentaram maior título de anticorpos.
- ✓ Nos testes de soroneutralização, o efeito citopático do vírus foi melhor avaliado com as células MDCK, em relação às células VERO.
- ✓ O título de anticorpos contra cinomose não apresentou diferença entre machos e fêmeas e não foi influenciado pelo contato com outros cães, independentemente da frequência com que este ocorreu.
- ✓ O título de anticorpos aumentou nos cães até 44,5 meses, declinando a partir desta idade, e não teve associação com o tempo decorrido desde a última vacinação.
- ✓ O título de anticorpos aumentou nos cães que receberam até cinco doses da vacina, mantendo-se praticamente estável a partir da quinta dose.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Várias observações do presente estudo indicam a necessidade de avaliação das vacinas comercializadas atualmente, em relação a sua eficácia. E neste aspecto, a comparação da resposta imunológica conferida por vacinas monovalentes e polivalentes, seria fundamental.

Estudos epidemiológicos devem ser realizados para avaliar a prevalência dos títulos de anticorpos na população canina do município de Viçosa-MG, pois, como discutido neste estudo, é possível que a doença não esteja ocorrendo de forma endêmica.

A padronização de testes laboratoriais acessíveis, objetivando realizar o diagnóstico definitivo nos casos suspeitos de cinomose, seria uma ferramenta muito útil para as pesquisas e para a clínica de pequenos animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABLETT, R. E.; BAKER, L. A. Effect of revaccination on distemper antibody levels in the dog. **The Veterinary Record**, v. 75, n. 49, p. 1329-1330, 1963.
- APPEL, M. J. G. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal Veterinary Research**, v. 30, n. 7, p. 1167-1182, 1969.
- APPEL, M. J. G.; ROBSON, D. S. A microneutralization test for canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, n. 11, p. 1460-1463, 1973.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L. E. **Recent Advances in canine infectious diseases**, Novembro, 1999. [www. ivis. org](http://www.ivis.org) (documento No. A0103.1199).
- AXTHELM, M. K.; KRAKOWKA, S. Canine distemper virus-induced thrombocytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 8, p. 1269-1275, 1987.
- BAKER, G. A.; GORHAM, J. R.; LEADER, R. W. Studies on an in ovo neutralization test for distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v. 15, p. 102-107, 1954.
- BAKER, J. A. Current status of distemper immunization procedures. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 5, p. 687-688, 1966.
- BAKER, J. A.; ROBSON, D. S.; GILLESPIE, J. H.; BURGHER, J. A.; DOUGHTY, M. F. A nomograph that predicts the age to vaccinate puppies against distemper. **The Cornell Veterinarian**, v. 49, p. 158-167, 1959.

- BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 3-13, 1999.
- BAUMANN, G. Ortomixovírus e Paramixovírus. In: BEER, J. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos-vírus-clamídias-rickétsias-micoplasmose**, 1^a ed. São Paulo: Roca, 1988. Cap. 9, p. 120-166.
- 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. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.
- BLIXENKRONE-MOLLER, M.; SVANSSON, V.; HAVE, P.; ÖRVELL, C.; APPEL, M. J. G.; PEDERSEN, I. R.; DIETZ, H. H.; HENRIKSEN, P. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in the urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v. 37, p. 163-173, 1993.
- BREITSCHWERDT, E. B. As riquetsioses. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 67, p. 543-553.
- BURROWS M. J. Afecções do intestino delgado. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 104, p. 1618-1705.
- CARMICHAEL, L. E. In: YORK, C. J. Combined viral and bacterial antigens for canine vaccines. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 5, p. 681-685, 1966.
- CASTELLANO, M.C. Moquillo Canino: Algo nuevo, Algo Viejo. **Veterinaria Argentina**, v. 10, n. 91, p. 39-41, 1993.
- CHALMERS, W. S. K.; BAXENDALE, W. A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for the prevention of canine distemper in young puppies. **The Veterinary Record**, v. 135, p. 349-353, 1994.
- CHRISMAN, C. L. **Neurologia dos pequenos animais**. 1^a ed. São Paulo: Roca, 1985, 432 p.
- COSTA NETO, P.L.O. **Estatística**. 17^a ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999, 264 p.
- DAVIES, D. H.; PIDFORD, S. Vaccination of dogs with multi-component vaccines. **Australian Veterinary Journal**, v. 68, n. 5, p. 183-184, 1991.
- EK-KOMMONEN, C.; SIHVONEN, L.; PEKKANEN, K.; RIKULA, U.; NUOTIO, L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **The veterinary Record**, v. 141, p. 380-383, 1997.

- FARROW, B. R. H.; LOVE, D. N. Bacterial, viral and other infectious problems. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine-diseases of the dog and cat**. 2^a ed. Philadelphia: Saunders, 1983. Cap. 27, p. 269-319.
- FENNER, F.; BACKMANN, P. A.; GIBBS, E. P. J.; MURPHY, F. A.; STUDDERT, M. J.; WHITE, D. O. Paramyxoviridae In: **Virologia Veterinária**. Zaragoza: Acribia., 1992. Cap. 27, p. 503-522.
- FENNER, W. R. Moléstias do cérebro. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 82, p. 819-889.
- GEMMA, T.; MIYASHITA, N.; SHIN, Y.; OKITA, M.; MORI, T.; IWATSUKI, K.; MIKAMI, T.; KAI, C. Serological survey of canine distemper virus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 4, p. 761-763, 1995.
- GILLESPIE, J. H.; BAKER, J. A.; BURGHER, J.; ROBSON, D.; GILMAN, B. The immune response of dogs to distemper virus. **The Cornell Veterinarian**, v. 48, p. 102-126, 1958.
- GORHAM, J. R. Duration of vaccination immunity and the influence on subsequent prophylaxis. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 5, p. 699-704, 1966a.
- GORHAM, J. R. The epizootiology of distemper. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 149, n. 5, p.610-622, 1966b.
- GOUVEIA, A. M. G.; MAGALHÃES, H. H.; RIBEIRO, A. L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 539-545, 1987.
- GREENE, C. E. Immunoprophylaxis and immunotherapy. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990, Cap. 2, p. 21-54.
- GREENE, C. E.; APPEL, M. J. Canine distemper. In: **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Saunders, 1990, Cap. 16, p. 226-239.
- GUILFORD, W. G.; STROMBECK, D. R. Gastrointestinal tract infections, parasites, and toxicoses. In: GUILFORD, W. G.; CENTER S. A.; STROMBECK, D. R. **Strombeck's Small Animal Gastroenterology**. 3^a ed. Philadelphia: Saunders Company, 1996. Cap. 21, p. 411-432.
- HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 120-124, 1997.
- HARRENSTIEN, L. A.; MUNSON, L.; RAMSAY, E. C.; LUCASH, C. F.; KANIA, S. A.; POTGIETER, L. N. D. Antibody responses of red wolves to canine distemper virus and canine parvovirus vaccination. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 3, p. 600-605, 1997.

- HAWKINS, E.C. Afecções do sistema respiratório inferior. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 89, p. 1080-1142.
- JOHNSTON, R. V.; YORK, C. J.; ROBINSON, V. B.; BRUECKNER, A. H.; BURCH, G. R. Immunology of canine distemper. **Veterinary Medicine**, v. 40, p. 405-412, 1959.
- JONES, L.; TENORIO, E.; GORHAM, J. R.; YILMA, T. Protective vaccination of ferrets against canine distemper with recombinant pox virus vaccines expressing the H or F genes of rinderpest virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 6, p. 590-593, 1997.
- KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R. J.; METZLER, A. E. Plasma phase viremia in canine distemper virus infection. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 1, p. 144-146, 1980.
- KRAKOWKA, S.; OLSEN, R.; CONFER, A.; KOESTNER, A.; McCULLOUGH, B. Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 4, p. 384-391, 1975.
- LECOUTEUR, R.A.; CHILD, G. Afecções da medula espinal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap. 83, p. 890-980.
- McCAW, D. L.; THOMPSON, M.; TATE, D.; BONDERER, A.; CHEN, Y. Serum distemper virus and parvovirus antibody titers among dogs brought to a veterinary hospital for revaccination. **Journal of Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 1, p. 72-75, 1998.
- MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, 2001.
- MONTALI, R. J.; BARTZ, C. R.; TEARE, J. A.; ALLEN, J. T.; APPEL, M. J. G.; BUSH, M. Clinical trials with canine distemper vaccines in exotic carnivores. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 11, p. 1163-1167, 1983.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. Laboratory diagnosis of viral diseases. In: **Veterinary Virology**. 3^a ed. Academic Press, 1999. Cap. 12. p. 193-224.
- NOON, K. F.; ROGUL, M.; BINN, L. N.; KEEFE, T. J.; MARCHWICKI, R. H.; APPEL, M. J. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 4, p. 605-609, 1980.

- OLSON, P.; FINNSDÓTTIR, H.; KLINGEBORN, B. ; HEDHAMMAR, A. Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 654-655, 1997.
- OLSON, P.; KLINGEBORN, B.; HEDHAMMAR, A. Serum antibody response to canine parvovirus, canine adenovirus-1, and canine distemper virus in dogs with known status of immunization: study of dogs in Sweden. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 9, p. 1460-1466, 1988.
- OSBURN, B. I.; STOTT, J. L. Immune response to vaccination. **Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine**, v. 33, p. 93-109, 1989.
- OTT, R. L. Some concepts of canine distemper immunization. **Veterinary Medicine**, setembro, v. 51, p. 427-431, 1956.
- OTT, R. L.; GORHAM, J. R.; BAKER, G. A. Dados não publicados (1953) *apud* BAKER, G. A.; GORHAM, J. R.; LEADER, R. W. Studies on an in ovo neutralization test for distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v. 15, p. 102-107, 1954.
- OTT, R. L.; GORHAM, J. R.; GUTIERREZ, J. C. Distemper in dogs. I. Virus-neutralizing antibodies in serum collected from healthy dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 26, p. 290-293, 1955.
- PIMENTEL GOMES, F. A. Curso de estatística experimental. 11^a ed. Piracicaba: Nobel, 1985, 466 p.
- POVEY, R. C. Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, p. 321-323, 1986.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **American Journal of Hygiene**, v. 27, p. 493-497, 1938
- RIKULA, U.; NUOTIO, L.; SIHVONEN, L. Canine distemper virus neutralising antibodies in vaccinated dogs. **The Veterinary Record**, v. 18, p. 598-603, 2000.
- RIKULA, U.; PÄNKÄLÄ, L.; JALKANEN, L.; SIHVONEN, L. Distemper vaccination of farmed fur animals in Finland. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 49, p. 125-133, 2001.
- RIKULA, U.; SIHVONEN, L.; VOIPIO, H. M.; NEVALAINEN, T. Serum antibody response to canine distemper virus vaccines in beagle dogs. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 23, n. 1, p. 31-33, 1996.
- SCHULTZ, R. D. The effects of aging on the immune system. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 6, n. 12, p. 1096-1105, 1984.
- SCHULTZ, R. D. Theoretical and practical aspects of an immunization program for dogs and cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 10, p. 1142-1149, 1982.

- SCHULTZ, R. D. Vaccine Failure. In: SMITH, C. A. Are we vaccinating too much? **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 4, p. 421-425, 1995.
- SCHULTZ, R. D.; SCOTT, F. W. Canine and feline immunization. **Veterinary Clinics of North America**, v. 8, n. 4, p. 755-768, 1978.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças de pele causadas por vírus, riquetsias e protozoários. In: MULLER, G. H.; KIRK, R. W. **Dermatologia de Pequenos Animais**, 5^a ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. Cap. 7, p. 435-447.
- SCOTT, F. W. What to do. In: SMITH, C. A. Are we vaccinating too much? **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 207, n. 4, p. 421-425, 1995.
- SHELL, G. Canine distemper. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, n. 2, p. 173-179, 1990.
- SPENCER, J.; BURROUGHS, R. Antibody response to canine distemper vaccine in african wild dogs. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 3, p. 443-444, 1992.
- SWANGO, L. J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária- moléstias do cão e do gato**. 4^a ed. São Paulo: Manole, 1997. Cap.69, p. 573-588.
- TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, p. 466-470, 1992.
- TIZARD, I.; NI, Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 1, p. 54-60, 1998.
- TURNER, T. Problems of booster vaccinations. **The Veterinary Record**, v. 6, p. 123-124, 1983.
- TWARK, L.; DODDS, W. J. Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 7, p. 1021-1024, 2000.
- VANDEVELDE, M.; CACHIN, M. The neurological form of canine distemper. In: KIRK, R. W., BONAGURA, J. D. **Current Veterinary Therapy XI. Small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1992, p. 1003-1007.
- WANER, T.; NAVEH, A.; SCHWARZ BEN MEIR, N.; BABICHEV, B.; CARMICHAEL, L. E. Assessment of immunization response to canine distemper virus vaccination in puppies using a clinic-based enzyme-linked immunosorbant assay. **The Veterinary Journal**, v. 155, p. 171-175, 1998.
- WEBSTER, A. C. The adverse effect of environment on the response to distemper vaccination. **Australian Veterinary Journal**, v. 51, p. 488-490, 1975.

- WIMSATT, J.; JAY, M. T.; INNES, K. E.; JESSEN, M.; COLLINS, J. K. Serologic evaluation, efficacy, and safety of a commercial modified-live canine distemper vaccine in domestic ferrets. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 5, p. 736-740, 2001.
- WINTERS, K. A. ; MATHES, L. E.; KRAKOWKA, S.; OLSEN, R. G. Immunoglobulin class response to canine distemper virus in gnotobiotic dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 5, p. 209-215, 1984.
- YORK, C. J.; BURCH, G. R. Canine distemper immunization. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 138, p. 298-301, 1961.

8. APÊNDICE

Quadro 8.1 – Título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães vacinados em clínicas veterinárias, seguindo o protocolo indicado (Grupo A), e respectivas características avaliadas por meio de questionário

Cão	Raça	Idade	Sexo	Contato	Dose	Ultima Dose	Título
		Meses			N ⁰	Meses	
A1	G. Retriever	11	M	Nunca	3	8	-
A2	Labrador	13	M	Eventual	3	9	-
A3	Rottweiler	10	M	Nunca	3	5	-
A4	Lhasa Apso	14	F	Eventual	3	11	-
A5	Bernese	13	M	Raro	3	9	-
A6	Pitbull	8	M	Raro	3	5	-
A7	Basset Hound	22	F	Eventual	4	6	1:10
A8	Poodle	18	M	Nunca	4	2	1:160
A9	Dog Alemão	8	F	Freqüente	3	4	-
A10	SRD	13	F	Freqüente	3	9	1:80
A11	Rottweiler	39	F	Freqüente	6	11	1:320
A12	Schnauzer	32	F	Eventual	5	3	1:20
A13	Rottweiler	22	F	Eventual	4	6	1:40
A14	Labrador	10	F	Eventual	3	6	-
A15	Bernese	9	F	Freqüente	3	5	-
A16	Boxer	42	M	Raro	6	2	1:10
A17	Bernese	12	F	Eventual	3	8	-
A18	Bernese	12	F	Eventual	3	8	-
A19	Bernese	60	F	Eventual	7	6	1:20
A20	Bernese	72	M	Eventual	8	9	1:80
A21	Bernese	48	F	Eventual	6	9	1:80
A22	Labrador	12	F	Eventual	3	8	-
A23	Dobermann	17	M	Eventual	6	4	1:20
A24	SRD	6	M	Raro	3	2	1:20
A25	Labrador	15	F	Eventual	3	10	-
A26	Boxer	30	M	Eventual	6	3	1:10
A27	Pitbull	13	M	Raro	3	8	-
A28	Boxer	10	M	Eventual	3	7	-
A29	SRD	72	F	Nunca	9	3	1:20
A30	Schnauser	18	F	Eventual	4	2	1:20

Quadro 8.2 – Título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães vacinados em clínicas veterinárias, não seguindo o protocolo indicado (Grupo B), e respectivas características avaliadas por meio de questionário

Cão	Raça	Idade	Sexo	Contato	Dose	Ultima Dose	Título
		Meses			N ^o	Meses	
B1	Cocker Spaniel	21	M	Nunca	3	17	1:10
B2	SRD	24	F	Nunca	3	19	1:40
B3	Labrador	24	M	Eventual	3	20	-
B4	Dog Alemão	40	M	Eventual	4	24	-
B5	Schnauzer	43	F	Nunca	5	18	-
B6	São Bernardo	62	F	Raro	6	18	-
B7	Labrador	59	M	Eventual	6	18	1:10
B8	Cocker Spaniel	24	F	Raro	2	24	-
B9	Labrador	19	F	Eventual	3	14	-
B10	SRD	53	M	Raro	3	47	-
B11	Mastiff Inglês	26	M	Frequente	3	22	-
B12	Poodle	42	M	Frequente	3	38	-
B13	Boxer	20	M	Eventual	3	15	-
B14	Teckel	26	M	Eventual	3	22	1:20
B15	SRD	26	F	Raro	5	15	1:20
B16	SRD	26	F	Raro	5	15	1:80
B17	SRD	18	M	Eventual	3	15	1:80
B18	SRD	24	M	Eventual	3	21	-
B19	SRD	24	F	Eventual	3	22	-
B20	SRD	24	F	Raro	3	21	1:160
B21	SRD	16	M	Frequente	1	13	-
B22	SRD	10	F	Frequente	1	6	-
B23	Teckel	29	M	Nunca	3	24	-
B24	Schnauzer	60	F	Eventual	8	14	1:320
B25	SRD	72	F	Eventual	4	14	1:320
B26	SRD	34	M	Nunca	2	28	-
B27	SRD	12	F	Frequente	1	4	1:20
B28	Pitbull	14	M	Raro	2	11	-
B29	SRD	60	F	Frequente	1	8	1:160
B30	SRD	24	F	Frequente	1	8	1:20

Quadro 8.3 – Título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, seguindo o protocolo indicado (Grupo C), e respectivas características avaliadas por meio de questionário

Cão	Raça	Idade	Sexo	Contato	Dose	Ultima Dose	Título
		Meses			N ⁰	Meses	
C1	Poodle	36	F	Frequente	5	4	1:20
C2	SRD	15	M	Nunca	3	8	1:80
C3	Pastor Alemão	12	M	Frequente	2	8	-
C4	SRD	48	F	Nunca	7	2	-
C5	SRD	12	F	Nunca	3	6	1:160
C6	Poodle	6	F	Raro	2	2	-
C7	Pitbull	12	M	Nunca	3	9	-
C8	SRD	16	M	Nunca	3	11	-
C9	Pitbull	12	M	Frequente	3	7	1:80
C10	SRD	24	F	Nunca	4	7	1:40
C11	Pinsher	7	F	Frequente	3	4	-
C12	Poodle	11	F	Nunca	3	8	-
C13	Akita	9	F	Eventual	3	5	-
C14	Pitbull	11	M	Eventual	3	7	-
C15	SRD	10	M	Frequente	3	7	-
C16	SRD	8	F	Nunca	3	4	-
C17	Pitbull	8	F	Raro	3	4	-
C18	Pitbull	7	M	Raro	3	3	1:40
C19	SRD	12	M	Eventual	3	8	1:80
C20	SRD	6	M	Raro	3	2	-
C21	Pitbull	9	F	Nunca	3	5	1:80
C22	Poodle	8	M	Raro	3	4	1:160
C23	Boxer	32	M	Raro	5	4	-
C24	Poodle	11	F	Nunca	3	8	1:320
C25	Pitbull	10	F	Nunca	3	4	-
C26	SRD	7	M	Raro	3	3	-
C27	SRD	12	M	Frequente	3	8	-
C28	Teckel	7	F	Raro	3	3	-
C29	Teckel	16	F	Raro	4	3	-
C30	Poodle	14	F	Eventual	2	10	1:10

Quadro 8.4 – Título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães vacinados em lojas de produtos agropecuários, não seguindo o protocolo indicado (Grupo D), e respectivas características avaliadas por meio de questionário

Cão	Raça	Idade	Sexo	Contato	Dose	Ultima Dose	Título
		Meses			N ^o	Meses	
D1	SRD	29	F	Eventual	3	24	-
D2	SRD	17	M	Freqüente	3	14	1:160
D3	SRD	10	M	Freqüente	1	4	1:20
D4	SRD	11	M	Nunca	1	9	-
D5	Boxer	42	F	Raro	3	36	-
D6	SRD	48	M	Freqüente	3	43	1:20
D7	SRD	19	M	Freqüente	3	15	1:10
D8	SRD	12	M	Freqüente	1	10	-
D9	SRD	67	F	Nunca	5	36	-
D10	SRD	12	F	Eventual	1	9	-
D11	SRD	27	M	Freqüente	2	24	1:40
D12	Boxer	7	M	Freqüente	1	3	-
D13	SRD	21	F	Nunca	3	16	-
D14	SRD	28	F	Freqüente	2	24	-
D15	SRD	60	F	Nunca	3	54	-
D16	Pinsher	41	M	Nunca	3	36	-
D17	SRD	42	F	Freqüente	3	36	-
D18	Rottweiler	10	M	Raros	2	7	-
D19	Pitbull	30	F	Eventual	3	24	-
D20	SRD	48	F	Freqüente	3	42	-
D21	Pitbull	6	M	Freqüente	1	4	-
D22	Pitbull	24	M	Freqüente	2	27	-
D23	SRD	36	F	Raro	2	34	-
D24	SRD	30	F	Eventual	2	28	-
D25	SRD	26	M	Eventual	3	18	-
D26	SRD	24	M	Freqüente	3	18	-
D27	Labrador	48	M	Freqüente	3	42	1:160
D28	Boxer	18	F	Eventual	3	12	-
D29	SRD	60	F	Nunca	5	36	-
D30	Pitbull	21	M	Freqüente	2	18	-

Quadro 8.5 – Título de anticorpos contra a cinomose no soro de cães não vacinados (Grupo E), e respectivas características avaliadas por meio de questionário

Cão	Raça	Idade	Sexo	Contato	Título
		Meses			
E1	Pinsher	24	F	Frequente	-
E2	SRD	36	M	Nunca	-
E3	SRD	18	F	Frequente	-
E4	SRD	60	F	Nunca	-
E5	SRD	12	F	Frequente	-
E6	SRD	24	M	Raro	-
E7	SRD	45	F	Frequente	-
E8	SRD	60	F	Nunca	-
E9	SRD	12	M	Nunca	-
E10	SRD	48	F	Raro	-
E11	SRD	13	F	Frequente	-
E12	SRD	12	F	Frequente	-
E13	SRD	9	F	Eventual	-
E14	SRD	6	F	Frequente	-
E15	SRD	24	M	Nunca	-
E16	SRD	8	M	Frequente	-
E17	SRD	6	F	Nunca	1 : 20
E18	Dobermann	6	F	Nunca	-
E19	SRD	60	M	Frequente	-
E20	SRD	24	F	Frequente	-
E21	SRD	36	M	Eventual	-
E22	SRD	60	F	Eventual	1 : 60
E23	SRD	60	M	Frequente	1 : 40
E24	SRD	48	F	Frequente	-
E25	SRD	12	M	Eventual	-
E26	SRD	11	F	Frequente	-
E27	SRD	12	M	Frequente	-
E28	SRD	72	M	Raro	-
E29	SRD	48	M	Frequente	-
E30	SRD	8	F	Frequente	-

8.6 Questionário

Nº da Ficha:

Data:

Proprietário:

Endereço:

Bairro:

Telefone:

Dados sobre o animal:

1) Nome:

2) Sexo: M F

3) Idade: anos meses

4) Raça:

Hábitos do animal:

1) Tem contato com cães de fora do ambiente onde vive?

Frequentemente Eventualmente Raramente Nunca

Saúde do animal:

1) O cão já apresentou algum destes sintomas:

1.a) Diarréia Sim Não

1.d) Secreção ocular Sim Não

1.b) Vômito Sim Não

1.e) Tosse Sim Não

1.c) Convulsões Sim Não

1.f) Secreção nasal Sim Não

Outros _____

Vacinação:

1) Quando filhote:

1.a) O animal recebeu a vacina sêxtupla?

sim Não

1.b) Quantas doses? 1 2 3

1.c) Qual o esquema de vacinação _____

2) Quando adulto:

2.a) O animal recebe a vacina sêxtupla anualmente? Sim Não

Última dose há quantos meses/anos? _____

3) Onde o animal foi ou costuma ser vacinado?

Clínica Veterinária Casa Agropecuária

Outros _____

8.7 Determinação do título viral pelo método de REED & MUENCH

Com o objetivo de determinar o título viral, várias diluições da suspensão viral são realizadas e misturadas ao cultivo celular, na microplaca. No dia da leitura, o número de pocinhos com efeito citopático, em cada diluição, é identificado.

Para exemplificar, suponhamos que o resultado da leitura foi como demonstrado a seguir, sendo que o sinal de adição indica a presença de efeito citopático.

Diluições	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
+	8	8	8	8	8	3	0
-	0	0	0	0	0	5	8

Após, calculamos os totais acumulados, da seguinte forma: os resultados positivos somam-se da direita para a esquerda e os resultados negativos somam-se da esquerda para a direita:

Diluições	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Total +	43	35	27	19	11	3	0
Total -	0	0	0	0	0	5	13

A partir destes valores acumulados, estabelecemos uma nova relação positivo/total, para então, calcularmos o percentual de positividade para cada diluição:

Diluições	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
Positivo/total	43/43	35/35	27/27	19/19	11/11	3/8	0/13
% Positividade	100	100	100	100	100	37,5	0

O ponto no qual encontra-se 50% de positividade está entre as diluições 10⁻⁵ (100%) e 10⁻⁶ (37,5%). Para calcular o intervalo exato entre estas duas diluições, aplica-se a seguinte fórmula:

$$\frac{50. - \text{imediatamente inferior a } 50\%}{\% \text{ imediatamente superior a } 50\% - \% \text{ imediatamente inferior a } 50\%} \times \log \text{ da razão da diluição}$$

$$\frac{50 - 37,5}{100 - 37,5} \times 1 = 0,2$$

O valor obtido da fórmula é subtraído da diluição na qual a morte celular é imediatamente inferior a 50%: 6 - 0,2 = 5,8. Desta forma, a diluição que impediu o desenvolvimento de 50% das lesões celulares foi 10^{-5,8}. Fazendo-se o antilog de 0,8 obtêm-se a diluição correspondente ao resultado final: 6,3 x 10⁵ DICT 50%.