

Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina¹

Luciana Sonne², Eduardo C. Oliveira², Caroline A. Pescador³, Adriana S. Santos², Saulo P. Pavarini², André S. Carissimi⁴ e David Driemeier^{2*}

ABSTRACT.- Sonne L., Oliveira E.C., Pescador C.A., Santos A.S., Pavarini S. P., Carissimi A.S. & Driemeier D. 2009. [Pathologic and immunohistochemistry findings in dogs naturally infected by canine distemper virus.] Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 29(2):143-149. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br

Canine distemper is a viral disease that affects mainly respiratory, gastrointestinal and nervous system. The present study analyzes pathologic and immunohistochemical findings in 54 dogs with canine distemper of a total of 760 canine necropsies performed from July 2006 to October 2007. The gross lesions were characterized by mucopurulent oculonasal discharge, hyperkeratosis of footpads, red and not collapsed lungs, thymic atrophy, watery intestinal content, hyperemia and enlarged Peyer's patches. The histological findings were characterized by interstitial pneumonia, lymphoid depletion, white matter demyelization, perivascular cuffs and intracytoplasmatic and intranuclear inclusion bodies located in epithelial cells of gastric mucosa, urinary bladder, bronchial, renal pelvis, footpads, eyelid, skin of the ear, tonsil, central nervous system and mononuclear cells in lymph nodes, spleen, and tonsils. Viral antigen was detected by an immunohistochemical procedure using a mouse monoclonal anti-canine distemper antibody. The footpads were the more constantly (67.4% of the cases) immunolabeled tissue, followed by stomach with 62.7%. Immunohistochemistry was demonstrated to be a useful tool for the study of viral antigen distribution in distemper affected dogs as well as it indicated which is the best tissue to be examined in order to confirm a suspected case of canine.

INDEX TERMS: Canine diseases, distemper, immunohistochemistry.

RESUMO.- A cinomose canina é uma doença viral e afeta principalmente os sistemas respiratório, gastrintestinal e nervoso. Neste trabalho foram analisados os achados patológicos e imuno-histoquímicos de 54 cães com cino-

mose de um total de 760 cães necropsiados no período de julho de 2006 a outubro de 2007. As lesões macroscópicas observadas foram caracterizadas por corrimento ocular e nasal mucopurulenta, hiperqueratose dos coxins digitais, pulmões avermelhados e não colapsados, atrofia do timo, conteúdo intestinal diarreico e placas de Peyer proeminentes. Os achados histológicos caracterizavam-se principalmente por pneumonia intersticial, rarefação linfóide, desmielinização da substância branca, manguitos perivascular e corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos, que se localizam principalmente na mucosa do estômago, epitélios da bexiga, brônquios e bronquíolos, pelve renal, coxins digitais, pálpebra, orelha e tonsila no sistema nervoso central e em células mononucleares dos linfonodos, baço e tonsilas. Os tecidos foram marcados pela técnica imuno-histoquímica utilizan-

¹ Recebido em 13 de novembro de 2008.

Aceito em 4 de dezembro de 2008.

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

² Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. *Autor para correspondência: davetpat@ufrgs.br

³ Laboratório de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Av. Fernando Corrêa da Costa, s/n, Coxipó, Cuiabá, MT 78069-900.

⁴ Setor de Medicina de Animais de Biotério, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

do o anticorpo monoclonal anti-cinomose canina. O coxim digital foi o tecido com maior número de casos marcados positivamente (67,4% dos casos), seguido pelo estômago com 62,7%. A imuno-histoquímica mostrou ser uma ferramenta importante para o estudo da distribuição do antígeno em cães infectados pela cinomose bem como indicou o melhor tecido para a confirmação do diagnóstico de casos suspeitos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Doenças de cães, cinomose, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina pertence ao gênero *Morbili-virus* da Família *Paramyxoviridae* e causa em cães uma doença grave, contagiosa e com alto coeficiente de letalidade (Koutinas et al. 2002). Os cães infectados podem apresentar secreções nasais e oculares (López 2007), hiperqueratose dos coxins digitais e dermatite pustular (Koutinas et al. 2004, Greene & Appel 2006). As lesões macroscópicas incluem ainda pulmões não colapsados, avermelhados e edemaciados (López 2007), enterite catarral ou hemorrágica (Lan et al. 2006) e atrofia parcial ou completa do timo (Appel 1969). Na microscopia podem ser observadas alterações como pneumonia intersticial, hiperqueratose ortoqueratótica e/ou paraqueratótica nos coxins digitais, depleção linfóide; no sistema nervoso evidencia-se desmielinização, manguitos perivascularares, gliose, malacia, neuronofagia e meningite mononuclear (Krakowka et al. 1980, Koutinas et al. 2004, López 2007, Silva et al. 2007). Em cortes de tecidos fixados em formalina e corados por hematoxilina-eosina observam-se corpúsculos eosinofílicos intracitoplasmáticos e/ou intranucleares (Pandher et al. 2006). Os corpúsculos de inclusão da cinomose podem ser observados nos epitélios do estômago, pelve renal, bexiga, conjuntiva, coxins digitais e em células do sistema nervoso central (Ducatelle et al. 1980, Gröne et al. 2003). Diferentes técnicas têm sido utilizadas como diagnóstico complementar da cinomose, como o isolamento viral, PCR, hibridização *in situ* e a imuno-histoquímica (Masuda et al. 2006). A imuno-histoquímica permite a detecção de antígenos virais em diferentes tecidos fixados em formol. Como diagnóstico *post mortem* utiliza-se órgãos como estômago, pulmão, bexiga, encéfalo, baço, linfonodos, tonsila, rim, intestino e coxins digitais (Ducatelle et al. 1980, Koutinas et al. 2004, Liang et al. 2007). O presente trabalho teve por objetivo analisar os achados macroscópicos e histológicos, da cinomose canina, verificar a distribuição do antígeno viral e detectar qual o melhor órgão na detecção do antígeno viral pelo teste imuno-histoquímico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados caninos necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária (SPV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com base no histórico, lesões macroscópicas e microscópicas características da infecção pelo

vírus da cinomose canina (como corpúsculos de inclusão, desmielinização, manguitos perivascularares, pneumonia intersticial e hiperqueratose). Os cães utilizados no presente estudo morreram ou foram eutanasiados devido ao mau prognóstico. Eram oriundos do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS e de clínicas particulares da grande Porto Alegre. As necropsias foram realizadas no período de julho de 2006 até outubro de 2007.

Dados como raça, idade, sexo e lesões macroscópicas observados durante a necropsia foram registrados. Fragmentos de pulmão, estômago, bexiga, coxins digitais, tonsila, linfonodos mesentéricos, encéfalo, medula espinhal, medula óssea, coração, rins, baço, língua, timo, pálpebra, testículo/epidídimo, fígado, intestino delgado e grosso, orelha e olho foram coletados e fixados em solução de formalina a 10% sendo processados por técnicas rotineiras de histologia e corados pela hematoxilina e eosina. (Prophet et al. 1992). Para o teste imuno-histoquímico os cortes de tecidos foram preparados em lâminas de gelatina 0,3% e fixados em estufa a 60°C por 24 horas. Na recuperação antigênica foi utilizado calor a 80°C (em banho-maria) por 3 minutos com imersão das lâminas em 0,01M de tampão citrato de sódio (pH 6,0). Utilizou-se anticorpo monoclonal anti-cinomose canina (VMRD) na diluição de 1:400 à temperatura de 4°C incubado por 14-16 horas. A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de streptavidina-biotina ligada à fosfatase alcalina e a revelação foi procedida com o cromógeno Permanent Red (Dako). Como controle positivo foi utilizado fragmentos de estômago de um canino fixado durante 24 horas e com marcação imuno-histoquímica positiva para cinomose canina. O controle foi testado após 1 mês de fixação em formol 10% para a avaliação da interferência do tempo de fixação na marcação positiva no teste. Foi calculado o intervalo de confiança de 90% (frequência de positivos \pm 1,64 x desvio padrão) para os casos marcados positivamente na imuno-histoquímica.

RESULTADOS

Dados gerais

No período de julho de 2006 a outubro de 2007 foram realizadas, no SPV-UFRGS, 760 necropsias de caninos. Em 63 cães estabeleceu-se o diagnóstico de cinomose canina através do exame macroscópico e microscópico, dos quais 54 foram utilizados no presente trabalho por terem seus órgãos coletados sistematicamente. Pulmões, bexiga, estômago e encéfalo deveriam ser coletados em formol para a inclusão dos animais neste estudo, com a falta de um destes órgãos o caso era excluído do trabalho.

A idade dos cães analisados variou de 2 meses a 8 anos. Em 51 animais a idade foi informada e em três cães adultos não havia a informação deste dado. Dos animais com idade informada, 40 cães apresentavam idade de 2-6 meses (78,5%), em seis cães a idade variou de 7 meses a 1 ano (11,8%), três tinham idade de 1-4 anos (5,8%) e dois apresentavam idade de 4-8 anos (3,9%). Dos 54 cães analisados, 32 eram machos (59,26%) e 22 fêmeas (40,74%). Vinte e quatro não tinham raça definida (44,44%), seis (11,11%) cães eram Poodle, quatro (7,41%) Dachshund e três Rottweiler (5,56%). As raças Labrador, Yorkshire e Pastor Belga foram representadas por dois cães cada e as raças Beagle, Border Collie, Dogue Alemão, Fila Brasileiro, Golden Retriever, Lhasa Apso, Pas-

tor Alemão, Pinscher, Pit Bull, Pointer e Shih-tzu foram representadas por um cão cada.

Achados macroscópicos

Os achados macroscópicos encontrados no exame externo dos cães necropsiados foram corrimento ocular e nasal mucopurulenta (27/54), hiperqueratose dos coxins digitais (19/54), pústulas abdominais (12/54) e secreção ceruminosa no conduto auditivo externo (31/54). Os pulmões se mostravam não colabados, edemaciados e avermelhados em 51 cães. O estômago apresentava mucosa hiperêmica em 19 cães e em 8 destes evidenciavam-se pequenas erosões da mucosa gástrica.

No intestino delgado dos cães analisados havia hiperemia da mucosa (19/54) e proeminência das placas de Peyer (22/54). Em alguns cães havia conteúdo diarréico amarelo ou avermelhado no intestino. Em oito cães (14,8%) infestações discretas por *Toxocara* sp., *Ancylostoma* sp. e/ou *Trichuris* sp. foram observadas no intestino. Havia atrofia do timo em 19 cães (35,2%) e os linfonodos mesentéricos estavam aumentados de volume em 16 cães (29,6%). Em um cão analisado observaram-se placas fibrinonecroticas no dorso da língua e no palato, secreção ceruminosa no conduto auditivo e numerosas pústulas abdominais. Em dois cães, um da raça Beagle de 3 meses de idade e outro da raça Shih-tzu de 2 meses, observou-se hidrocefalia.

Achados microscópicos

Pneumonia intersticial foi observada em 44,4% (24/54) dos cães, em 18,5% dos casos (10/54) a pneumonia broncointersticial e em 18,5% (10/54) broncopneumonia supurativa. Em alguns cães (9/54), observaram-se células sinciciais no pulmão e edema alveolar (28/54). Corpúsculos de inclusão viral acidofílicos no epitélio de brônquios e bronquíolos e no interior de células sinciciais ocorreram em 27,8% (15/54) dos cães afetados por cinomose.

Vinte e nove dos 54 encéfalos examinados apresentavam alguma lesão microscópica. Vacuolização, principalmente, da substância branca do cerebelo e cérebro foi observada em 26 cães, sendo esta mais pronunciada no cerebelo. Alterações como gliose focal (3/54), infiltrado perivascular linfoplasmocitário (6/54), corpúsculo de inclusão principalmente intranucleares em astrócitos (7/54), malacia (5/54), meningite mononuclear (3/54) e neuronofagia (1/54) também foram observadas.

Depleção linfóide foi observada no baço 33,3% (17/51) dos casos examinados, em 45,7% (16/35) no timo, em 20,0% (8/40) nas tonsilas e em 51,0% (26/51) nos linfonodos mesentéricos. Corpúsculos de inclusão foram observados em 3,9% (2/51) dos casos no baço, em 7,8% (4/51) nos linfonodos mesentéricos e 30,0% (12/40) nas tonsilas, presentes tanto no epitélio escamoso estratificado como no centro dos folículos linfóides. No baço havia necrose centrofolicular em 21,6% (11/51) dos casos examinados e infiltrado histiocitário em 23,5% (12/51), e nos linfonodos mesentéricos essas alterações foram observadas respec-

tivamente em 11,8% (6/51) e 27,5% (14/51) dos casos.

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

Em 27,8% (15/54) dos cães examinados havia corpúsculos de inclusão viral no epitélio da bexiga. Nos rins, corpúsculos de inclusão viral na pelve renal foram observados em 11,8% (6/51).

No intestino delgado observou-se enterite mononuclear em 11,8% (6/51) dos cães e em 3,9% (2/51) foi visualizado infiltrado histiocitário nas placas de Peyer.

Os coxins digitais apresentavam hiperqueratose ortoqueratótica em 63,3% (31/49) dos cães, associada à degeneração hidrópica do epitélio dos coxins em 34,7% (17/49) e com corpúsculos de inclusão viral (em sua maioria intracitoplasmática) em 26,5% (13/49).

A análise microscópica de orelhas de cães demonstrava degeneração hidrópica (13/33) e em alguns casos (8/33) corpúsculos de inclusão puderam ser encontrados no epitélio. Estruturas fúngicas compatíveis com *Malassezia pachydermatis* foram encontradas em 12 cães. Hifas septadas com morfologia compatível com *Candida* sp. foram visualizadas no epitélio da orelha de um canino associadas a infiltrado piogranulomatoso. Infiltrado neutrofílico com a presença ou não de colônias bacterianas foi observado em 7 casos. No testículo/epidídimo visualizaram-se corpúsculos de inclusão em 23,8% (5/21) dos cães machos analisados. Não foram observadas alterações microscópicas significativas no coração, fígado, olho e medula óssea dos cães analisados.

Resultados imuno-histoquímicos

A análise macroscópica e microscópica dos tecidos de 54 caninos foi característica de infecção pelo vírus da cinomose. Em 51 desses casos (94,4%) obteve-se mar-

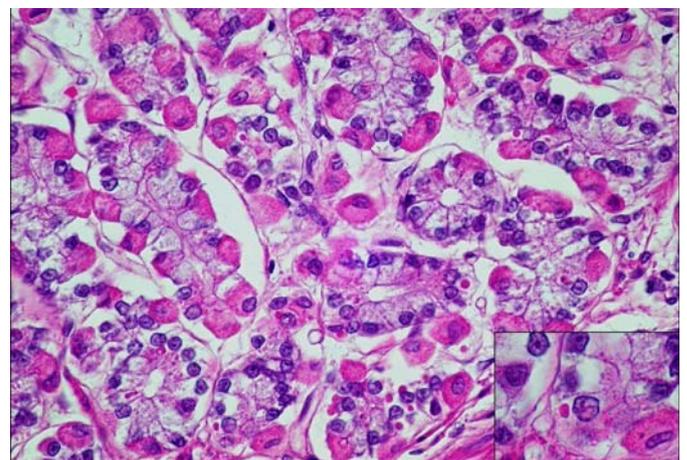


Fig.1. Cinomose canina. Mucosa gástrica com corpúsculos de inclusão. HE, obj. 40x. No detalhe, corpúsculo de inclusão intracitoplasmático em célula principal da mucosa gástrica. HE, obj.100x.

Quadro 1. Frequência de marcação imuno-histoquímica positiva para cinomose canina de 51 animais que obtiveram resultado positivo no teste

Órgão	Animais positivos	Total analisado	Frequência de positivos	Índice de confiança (90%)	
				Mínimo	Máximo
Coxim	31	46	67,4%	56%	79%
Estômago	32	51	62,7%	52%	74%
Pálpebra	23	43	53,5%	41%	66%
Orelha	17	32	53,1%	39%	68%
Tonsila	19	37	51,4%	38%	65%
Linfonodo	24	48	50,0%	38%	62%
Língua	22	46	47,8%	36%	60%
Cerebelo	23	51	45,1%	34%	57%
Timo	12	33	36,4%	23%	50%
Bexiga	17	51	33,3%	23%	44%
Pulmão	17	51	33,3%	23%	44%
Testículo/epidídimo	6	19	31,6%	14%	49%
Intestino delgado	15	48	31,3%	20%	42%
Medula torácica	8	26	30,8%	16%	46%
Baço	14	48	29,2%	18%	40%
Medula lombar	7	26	26,9%	13%	41%
Medula cervical	6	27	22,2%	9%	35%
Intestino grosso	6	45	13,3%	5%	22%
Olho	5	39	12,8%	4%	22%
Rim	6	48	12,5%	5%	20%
Cérebro	6	51	11,8%	4%	19%
Medula óssea	3	49	6,1%	1%	12%
Fígado	2	45	4,4%	0%	10%
Coração	0	47	0,0%	0%	0%

cação imuno-histoquímica para o antígeno do vírus da cinomose em pelo menos um órgão analisado. Quando se testou o controle positivo após 1 mês de fixação houve a perda da marcação positiva nesses cortes não havendo nenhuma marcação positiva nem mesmo nas inclusões virais. A marcação imuno-histoquímica positiva ficou evidenciada principalmente em coxins digitais, estômago, pálpebra, orelha, tonsila, linfonodo, língua e cerebelo. A frequência de órgãos positivos para o teste imuno-histoquímico, bem como o índice de confiança mínimo e máximo (90%) de cada órgão encontram-se no Quadro 1.

O coxim digital foi o órgão que apresentou a maior frequência de casos positivos no teste imuno-histoquímico. Nos coxins digitais (Fig.2), pálpebra e orelha (Fig.3) a marcação do antígeno viral ocorreu principalmente nos queratinócitos, além de glândulas sebáceas e sudoríparas. Corpúsculos de inclusão viral intracitoplasmático e intranuclear foram marcados positivamente. No estômago, a marcação imuno-histoquímica do antígeno viral foi visualizada nas células da mucosa gástrica (Fig.4). A marcação positiva no estômago ocorreu mesmo quando havia autólise no tecido. No pulmão, antígenos virais foram visualizados, principalmente, no epitélio de brônquios (Fig.5), bronquíolos, em macrófagos alveolares e em células sinciciais. Corpúsculos de inclusão viral foram marcados na técnica imuno-histoquímica no epitélio da bexiga e da pelve renal. No intestino a marcação ocorreu, principalmente, no centro das placas de Peyer e no epitélio do intestino delgado. No intestino grosso foi evidenciada marcação em células mononucleares dos folículos

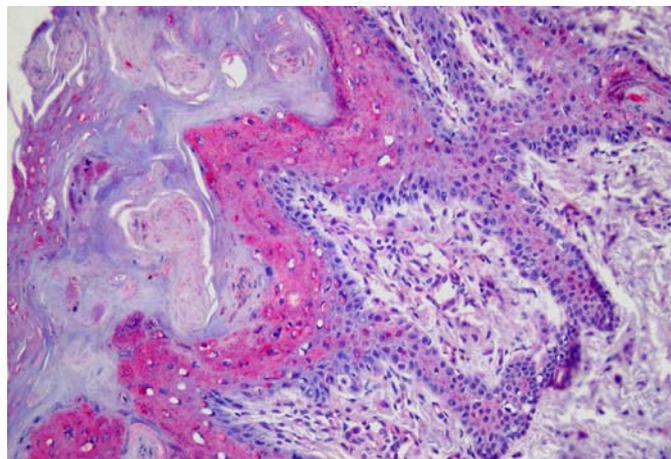


Fig.2. Coxim digital com marcação no epitélio escamoso estratificado. IHQ anti-cinomose fosfatase alcalina, obj.20x.

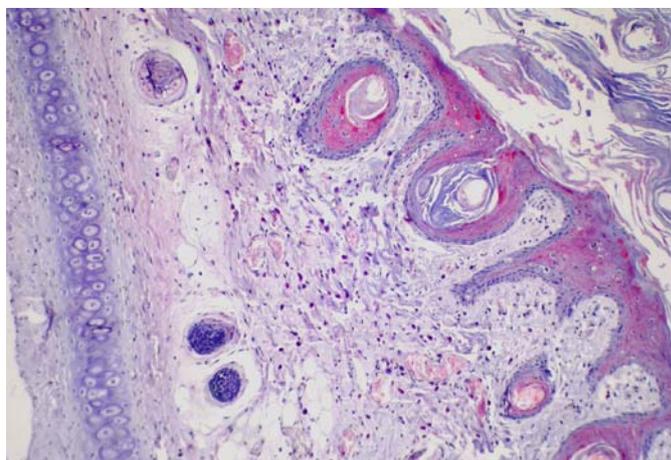


Fig.3. Epitélio do conduto auditivo com marcação positiva em vermelho. IHQ anti-cinomose fosfatase alcalina, obj.10x.

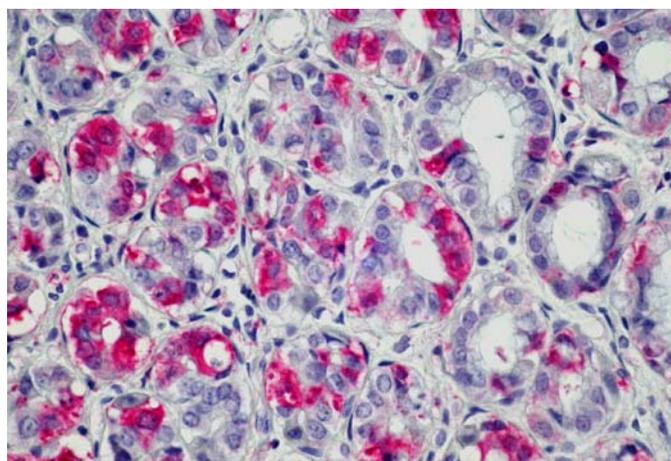


Fig.4. Mucosa do estômago de um canino marcada positivamente. IHQ anti-cinomose fosfatase alcalina, obj.40x.

linfóides e no epitélio intestinal, porém a marcação positiva ocorreu em menor quantidade quando comparado ao intestino delgado. A autólise da mucosa intestinal esteve

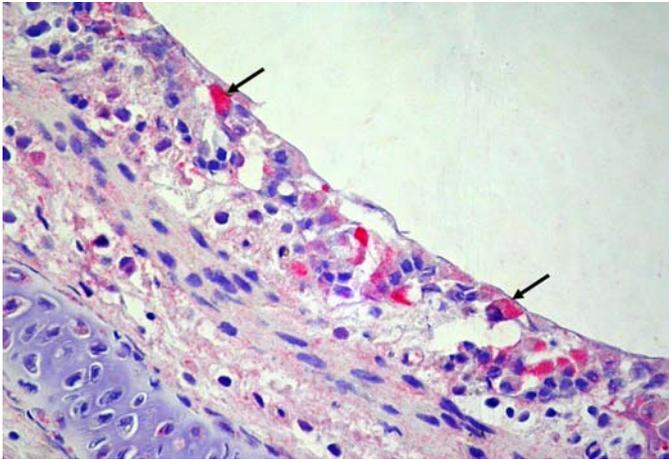


Fig.5. Pulmão com marcação positiva no epitélio de brônquio demonstrada pelas setas. IHQ anti-cinomose fosfatase alcalina, obj.20x.

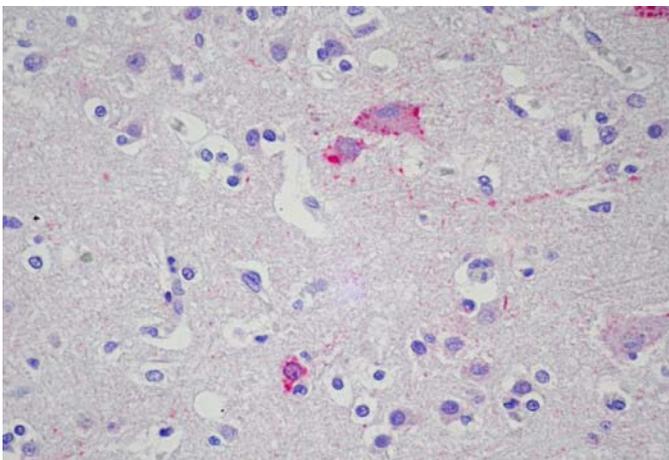


Fig.6. Cérebro com marcação positiva em neurônios e astrócito. IHQ anti-cinomose fosfatase alcalina, obj.40x.

presente em alguns dos cães, porém a marcação imuno-histoquímica ainda pôde ser visualizada. A língua apresentou marcação positiva com a identificação do antígeno viral no epitélio escamoso estratificado principalmente na região dorsal e raramente na porção ventral da língua. No cerebelo, cérebro e medula espinhal a marcação positiva para a cinomose canina se evidenciou principalmente em astrócitos, células da micróglia, como em células do epêndima e em neurônios (Fig.6). Em casos onde os manguitos perivasculars eram evidentes, o antígeno foi visualizado próximo a essas áreas. Na tonsila, corpúsculos de inclusão presentes no epitélio foram marcados positivamente, além da observação da marcação em histiócitos e linfócitos. Timo, linfonodos mesentéricos e baço apresentaram marcação positiva em linfócitos e histiócitos. Nos linfonodos mesentéricos e baço foi evidenciada marcação principalmente nos centros germinativos. No olho, o antígeno viral foi visualizado nas células ganglionares da retina em 12,8% (5/39) dos casos analisados. No fígado a marcação do antígeno em células de Kupffer ocorreu em dois casos dos 45 analisados. Na

medula óssea a marcação positiva foi visualizada no citoplasma de células mononucleares. No testículo/epidídimo, evidenciou-se a presença do antígeno viral em 31,6% dos casos, sendo este principalmente visualizado no epitélio do epidídimo. Não foi observada marcação positiva no coração de nenhum dos cães analisados.

DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra que cães entre dois e seis meses de idade (78,5%) são mais predispostos a se infectarem pelo vírus da cinomose canina, resultado este relatado por outros autores (Józwik & Frymus 2002, Greene & Appel 2006). Embora a infecção tenha sido observada mais freqüentemente em machos (59,26%) e em cães sem raça definida (44,44%), seguido da raça Poodle (11,11%), nenhuma predisposição sexual ou racial é comprovada na cinomose canina (Headley & Graça 2000, Greene & Appel et al. 2006).

Alterações macroscópicas como corrimento ocular e nasal, hiperqueratose dos coxins digitais e pulmões não colabados, edemaciados e de coloração avermelhada foram encontradas no presente trabalho, sendo estes achados similares ao observado por outros autores (Koutinas et al. 2004, López et al. 2007). Atrofia do timo é relatada em associação à cinomose (Krakowka et al. 1980, Moro et al. 2003) e foi visualizada em 35,2% dos cães deste trabalho. A atrofia foi considerada somente em cães antes da maturidade sexual, uma vez que esta pode ser fisiológica após essa fase.

A identificação de placas fibrinonecróticas sobre a língua e palato observada em um dos cães foi atribuída à infecção por *Candida* sp. A infecção por *Candida* sp. geralmente é relacionada ao tratamento com antimicrobianos que destroem a flora microbiana normal e à imunodepressão ocasionada pela infecção viral (Gelberg 2007).

Kubo et al. (2007) encontrou inclusões virais na bexiga de caninos infectados pelo vírus da cinomose em 73,0% dos casos. Esse dado difere do encontrado no presente estudo onde, apenas 27,8% dos cães apresentaram corpúsculos de inclusão na bexiga. Este resultado pode estar relacionado à descamação observada no epitélio da bexiga, impossibilitando a visualização dos corpúsculos de inclusão.

No encéfalo, principalmente no cerebelo, a principal lesão microscópica foi a desmielinização que ocorreu em 89,6% dos casos. Resultado semelhante foi recentemente relatado por Silva et al. (2007) que mencionam a desmielinização em 89,4% dos cães. Observou-se infiltrado perivascular somente em 20,7% dos cães analisados, valor esse inferior ao observado por outros autores (Raw et al. 1992, Koutinas et al. 2002). Silva et al. (2007) relatam que 46,8% dos cães apresentavam desmielinização e manguitos perivasculars enquanto que em 9,2% dos cães foram observados somente manguitos perivasculars. A diferença entre esses resultados pode ser explicada pelo tipo de cepa viral, uma vez que algumas cepas apresentam tropismo pelos neurônios causando necrose

laminar cortical, enquanto outras têm tropismo por astrócitos e oligodendrócitos causando desmielinização e outras causam infecções persistentes no sistema nervoso central (Koutinas et al. 2002). Em dois casos deste estudo foi observada hidrocefalia, entretanto, nestes dois casos, não se observaram lesões no encéfalo sugestivas de cinomose. Adicionalmente antígenos virais de cinomose não foram detectados no teste imuno-histoquímico, o que sugere uma etiologia não relacionada à cinomose nestes casos.

O tempo de fixação das amostras se mostrou importante, uma vez que o controle positivo perdeu sua marcação quando fixado por mais de 1 mês. Os tecidos analisados foram fixados por 24 a 48 horas em formol 10% e em um dos cães com tempo de fixação de 1 semana a não marcação do antígeno nos tecidos também pode estar relacionada ao tempo de fixação. Ramos-Vara (2005) relata que a fixação em formaldeído causa mudanças conformacionais nas macromoléculas que pode tornar a ligação com o anticorpo mais difícil ou até impossível. Um dos cães, que apresentou marcação imuno-histoquímica positiva para cinomose em órgãos como coxins digitais, apresentava no estômago numerosos corpúsculos de inclusão que não obtiveram marcação, podendo esta estar relacionada com a especificidade e sensibilidade do teste.

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

O estômago é um dos órgãos de eleição para o diagnóstico histológico e imuno-histoquímico da cinomose canina por usualmente conter um grande número de corpúsculos de inclusão viral (Ducatelle et al. 1980). Essa observação foi confirmada neste estudo. Órgãos como pálpebra, orelha e língua demonstraram bons resultados na análise imuno-histoquímica, podendo a orelha, por exemplo, ser utilizada tanto no diagnóstico *ante mortem* como *post mortem* da cinomose canina.

A marcação imuno-histoquímica em órgãos linfóides ocorreu no citoplasma de histiócitos e na superfície de linfócitos, resultados similares foram relatados por outros autores (Iwatsuki et al. 1995, Kumagai et al. 2004). A marcação foi evidenciada principalmente nos folículos linfóides de baço, linfonodo e tonsila. Corpúsculos de inclusão viral em folículos linfóides foram visualizados, porém sua distinção de restos celulares é difícil como também relatado por Krakowka et al. (1980). Na tonsila a presença de antígeno marcado positivamente também ocorreu no epitélio.

O emprego da técnica de imuno-histoquímica no in-

testino delgado demonstrou marcação positiva em 31,3% dos casos; em alguns cães onde não se observou enterite, a detecção do antígeno ocorreu somente em células mononucleares do tecido linfóide associado ao intestino. Antígenos virais da cinomose canina também foram visualizados por Okita et al. (1997) no epitélio intestinal de cães com cinomose e sinais clínicos de gastrenterite.

O antígeno viral foi encontrado predominantemente no cerebelo e menos freqüentemente no cérebro dos caninos analisados. Van Moll et al. (1995) encontraram resultados semelhantes, observando antígenos do vírus da cinomose na camada molecular em processos das células da glia e em células adjacentes a leptomeninge. Em 2 dos casos, onde não ocorreu a marcação do antígeno viral, a identificação de manguitos perivasculares com variável desmielinização demonstra ser a forma mais crônica da doença. Alldinger et al. (2000) relatam que o antígeno da cinomose encontra-se ausente ou restrito as áreas de lesões em casos mais crônicos. Com isso a não marcação do antígeno viral nestes casos pode ser explicada.

No exame imuno-histoquímico do olho dos cães analisados observou-se o antígeno viral nas células ganglionares da retina. Segundo Wilcock (1993) corpúsculos de inclusão ocorrem em 30-40% dos casos sendo estes encontrados nas células ganglionares ou em células da glia. Summers et al. (1995) relatam que cães com a doença na fase neurológica podem apresentar corioretinite, lesão não observada nos cães deste estudo. Embora seja descrito que o antígeno do vírus da cinomose é observado nas células de Kupffer do fígado (Jones et al. 2000), o antígeno foi visualizado, nessas células, somente em 4,4% dos cães deste estudo. Na medula óssea visualizou-se o antígeno viral em células mononucleares em 6,1% dos cães, Mee et al. (1995) utilizaram cultivo viral em células da medula óssea demonstrando a presença do antígeno neste órgão. O antígeno viral da cinomose foi detectado no testículo e epidídimo em 31,6% dos caninos machos, presente principalmente no epidídimo, conforme também relatado por Appel (1969).

Neste estudo, a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmático e intranuclear foi um achado microscópico importante para o diagnóstico da cinomose canina. Porém, em alguns órgãos a sua detecção pode ser difícil como ocorre, por exemplo, em órgãos linfóides. Os coxins digitais, estômago, pálpebra, orelha, tonsila e linfonodos, língua e cerebelo foram órgãos mais adequados para a detecção do antígeno viral da cinomose canina pelo teste imuno-histoquímico. A imuno-histoquímica demonstrou ser um bom método auxiliar no diagnóstico *post mortem* da cinomose canina, permitindo a visualização do antígeno viral em locais onde ele não é facilmente observado e em tecidos com autólise.

Agradecimentos.- Aos demais membros do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS pelo auxílio técnico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- Alldinger S., Fonfara S., Kremmer E. & Baumgärtner W. 2000. Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. *Acta Neuropathol.* 99:138-146.
- Appel M.J.G. 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30:1167-1182.
- Ducatelle R., Coussement W. & Hoorens J. 1980. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using and unlabeled antibody-enzyme method. *Am. J. Vet. Res.* 41:1860-1862.
- Gelberg H.B. 2007. Alimentary system, p.301-391. In: McGavin M.D & Zachary J.F. (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- Greene C.E. & Appel M.J. 2006. Canine distemper, p.25-41. In: ____ (Ed.), *Infectious Disease of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, Philadelphia. 1387p.
- Gröne A., Engelhardt P. & Zurbriggen A. 2003. Canine distemper virus infection: Proliferation of canine footpad keratinocytes. *Vet. Pathol.* 40:574-578.
- Haines D.M., Martin K.M., Chelack B.J., Sargent R.A., Outerbridge C.A. & Clark E.G. 1999. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: A method for antemortem diagnosis of infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:396-399.
- Headley S.A. & Graça D.L. 2000. Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37:83-86.
- Iwatsuki K., Okita M., Ochikubo F., Gemma T., Shin Y.S., Miyashita N. & Kai C. 1995. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs old dogs naturally infected with canine distemper virus. *J. Comp. Pathol.* 113:185-190.
- Jones T.C., Hunt R.D. & King N.W. 2000. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. Editora Manole, São Paulo.
- Józwik A. & Frymus T. 2002. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *J. Vet. Med. B* 49:413-414.
- Krakowka S., Higgins R.J. & Koestner A. 1980. Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissue. *Am. J. Vet. Res.* 41:284-292.
- Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S, Baumgaertner W., Lekkas S. & Kontos V. 2002. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J. Comp. Pathol.* 126:47-56.
- Koutinas A.F., Baumgärtner W., Tontis D., Polizopoulou Z., Saridomichelakis M.N. & Lekkas S. 2004. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Vet. Pathol.* 41:2-9.
- Kubo T., Kagawa Y., Taniyama H. & Hasegawa A. 2007. Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus. *J. Vet. Med. Sci.* 69:527-529.
- Kumagai K., Yamaguchi R., Uchida K. & Tateyama S. 2004. Lymphoid apoptosis in acute canine distemper. *J. Vet. Med. Sci.* 66:175-181.
- Lan N.T., Yamaguchi R., Inomata A., Furuya Y., Uchida K., Sugano S. & Tateyama S. 2006. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol.* 115:32-42.
- Liang C.T., Chueh L.L., Pang V.F., Zhuo Y.X., Liang S.C., Yu C.K., Chiang H., Lee C.C. & Liu C.H. 2007. A non-biotin polymerized horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. *J. Comp. Pathol.* 136:57-64.
- López A. 2007. Respiratory System, p.463-542. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Ed.), *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 4th ed. Mosby Elsevier, St Louis.
- Mandara M.T., Pavone S. & Vitelozzi G. 2007. Internal hydrocephalus and associated periventricular encephalitis in a young fox. *Vet. Pathol.* 44:713-716.
- Masuda M., Sato H., Kamata H., Katsuo T., Takenaka A., Miura R., Yoneda M., Tsukiyama-Kohara K., Mizumoto K. & Kai C. 2006. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 29:157-165.
- Mee A.P., Hoyland J.A., Baird P., Bennett D. & Sharpe P.T. 1995. Canine bone marrow cell cultures infected with canine distemper virus: an in vitro model of Paget's disease. *Bone* 17:461-466.
- Moro L., Martins A.S., Alves C.M., Santos F.G.A., Nunes J.E.S., Carneiro R.A., Carvalho R. & Vasconcelos A.C. 2003. Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.* 148:153-164.
- Okita M., Yanai T., Ochikubo F., Gemma T., Mori T., Maseki T., Yamanouchi K., Mikami T. & Kai C. 1997. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J. Comp. Pathol.* 116:403-408.
- Pandher K., Podell B., Gould D.H., Johnson B.J. & Thompson S. 2006. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:201-204.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p.
- Ramos-Vara J.A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.* 42:405-426.
- Raw M.E. Pearson G.R., Brown P.J. & Baumgärtner W. 1992. Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs. *Vet. Rec.* 130:291-293.
- Silva M.C., Figuera R.A., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2007. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 27:215-220.
- Summers B.A., Cumming J.F. & Lahunta A. 1995. Inflammatory disease of the central nervous system, p.95-188. In: ____ (Ed.), *Veterinary Neuropathology*. Mosby, St Louis.
- Van Moll P., Alldinger S., Baumgärtner W. & Adami M. 1995. Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. *Vet. Microbiol.* 44:193-199.
- Wilcock B.P. 1993. The eye and ear, p.441-529. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Ed.), *Pathology of Domestic Animals*. 4th ed. Academic Press, San Diego.