

CALICIVÍRUS: INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL E ISOLAMENTO*

*Neite Machado Pereira** , Rudi Weiblen*** , André Bagolin Palmeira**** Terezinha Flores Canabarro******

RESUMO

Seis gatos com sete semanas de idade, foram utilizados em um trabalho experimental com calicivírus, sendo que dois foram controles. Os sinais clínicos observados nestes animais foram temperatura alta, descarga ocular e nasal, úlceras na língua e severa depressão. Destes animais foram coletados um total de 96 "swabs" das regiões orofaríngea, nasal e conjuntival, com taxas de isolamentos destas regiões de respectivamente 59,3% (19/32), 43,7% (14/32) e 40,6% (13/32). O vírus foi recuperado, durante os primeiros quatro dias de todos os "swabs" dos animais inoculados. Dos "swabs" dos animais controles, também houve recuperação viral a partir do segundo dia, persistindo até o sétimo dia. Também com o objetivo de isolar calicivírus de felinos sadios ou com manifestações clínicas de doença respiratória, foram examinados um total de 162 "swabs" coletados das regiões orofaríngea, nasal e conjuntival. As porcentagens de isolamentos foram respectivamente 12,9% (7/54), 5,5% (3/54) e 1,8% (1/54). A inoculação experimental do calicivírus permitiu a indução de sinais clínicos compatíveis com a Calicivirose felina. O local que proporcionou

* Parte do trabalho de tese do primeiro autor, apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de concentração Clínica, Universidade Federal de Santa Maria, UFDSM, 97119-900 - Santa Maria, RS. Projeto parcialmente financiado pelo CNPq.

** Médico Veterinário - MS, Depto. de Microbiologia e Parasitologia (DMP), UFSM.

*** Médico Veterinário, PhD, Professor Titular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e DMP, UFSM, Pesquisador do CNPq

**** Médico Veterinário - SADIA AGROPASTORIL - Faxinal dos Guedes, 89694-000, SC,

***** Zootecnista, Ms, DMP, UFSM. Endereço para correspondência : Rudi Weiblen - DMVP/CCR/UFSM 97119-900 Santa Maria - RS.

maior número de isolamentos do vírus foi a orofaringe. O calicivírus não está muito difundido entre felinos sadios ou com sinais clínicos de doença respiratória.

UNITERMOS: isolamento, calicivírus, felino, "swabs"

INTRODUÇÃO

A Calicivirose felina é uma enfermidade do trato respiratório superior dos gatos, causada por um vírus da família Caliciviridae e gênero Calicivírus. Este vírus encontra-se amplamente distribuído na população de felinos em quase todo o mundo, sendo o principal agente causador de doença respiratória nesta espécie⁽¹³⁾.

Foi reconhecido primeiramente na Nova Zelândia, durante a adaptação do vírus da Panleucopenia felina em cultivo celular⁽⁴⁾.

A infecção de felinos pelo Calicivírus pode ser subclínica, aguda ou subaguda, e os sinais clínicos são variáveis dependendo da cepa infectante, idade do animal e composição da flora bacteriana. Os principais sinais clínicos da enfermidade são aumento difásico de temperatura, anorexia, secreção ocular e nasal, hiperestesia, sensibilidade musculoesquelética, dispnéia, severa depressão, ulceração de mucosa, vesículas afetando a língua, paato duro, narinas e gengiva periodontal⁽¹³⁾.

Uma vez infectados, os felinos permanecem portadores e são fontes de disseminação do vírus por semanas, meses ou até por toda a vida. A transmissão do vírus dá-se principalmente pelo contato direto e ou inalação de perdigotos e fômites, não tendo sido diagnosticadas ainda infecções pré-natais ou por artrópodes⁽⁸⁾.

O diagnóstico clínico da enfermidade é dificultado pela presença de outros agentes causadores de enfermidade respiratória em felinos com sinais clínicos semelhantes. Principalmente o vírus da Rinotraqueíte infecciosa, normalmente incriminado como sendo o agente causador de doença respiratória, e o reovírus que também ataca este sistema. O diagnóstico laboratorial é realizado pelo isolamento do vírus de "swabs" oculares, nasais ou faringeanos, coletados enquanto o animal apresentar secreção serosa⁽⁵⁾.

As células primárias e secundárias de rim felino foram utilizadas para o cultivo do vírus⁽⁴⁾ enquanto a linhagem CRFK (Crandell Feline Kidney) tem sido empregada para propagá-lo⁽¹⁰⁾.

Nas células infectadas tanto dos cultivos primários, secundários, como na linhagem celular, observa-se efeito citopático (ECP) entre 24 a 48 horas após inoculação. O ECP caracteriza-se pelo arredondamento e desprendimento das células da superfície do tubo⁽⁵⁾.

O primeiro isolamento do calicivírus foi feito de suspensão de baço de animais mortos em consequência de Panleucopenia⁽⁴⁾. Posteriores isolamentos

foram feitos de "swabs" nasofaríngeos e conjuntivais de animais exibindo sinais clínicos de doença respiratória⁽³⁾.

CRANDELL & MADIN⁽²⁾ fizeram inoculação experimental com calicivírus em felinos, e observaram o período de excreção viral. Os autores descreveram que entre o quinto e décimo dia após a inoculação houve recuperação do vírus de "swabs" orofaríngeos, entretanto aqueles "swabs" coletados a intervalos de duas semanas para um total de oito semanas, foram negativos para o vírus.

BARTHOLOMEW & GILLESPIE⁽¹⁾ recuperaram o calicivírus de 33% dos "swabs" conjuntivais e 80% dos "swabs" nasais, de animais inoculados com um aerossol da cepa CFI (California Feline Isolate). A recuperação do vírus deu-se até o quinto dia após a inoculação para os "swabs" nasais.

HOLZINGER & KAHN⁽⁶⁾ obtiveram as maiores taxas de isolamentos durante a primeira semana após a inoculação, sendo que vírus foi recuperado 85% da conjuntiva, 81% da orofaringe e 77% das narinas. KAHN & GILLESPIE⁽⁷⁾ observaram que a taxa de recuperação viral dos "swabs" nasais, faríngeos e conjuntivais dos animais expostos ao aerossol da cepa 255, foi alta durante a primeira semana de infecção. A frequência de recuperação viral decresceu mais rapidamente para as amostras coletadas da conjuntiva e pelo sexto dia após exposição, somente metade das amostras continham vírus. Dos "swabs" nasais e faríngeos o vírus foi recuperado com regularidade durante duas semanas. Segundo estes autores, em infecções experimentais com calicivírus, o período de excreção viral não excede 21 dias.

Em um grupo de 80 gatos, sadios ou naturalmente infectados, mantidos em gatis, isolou-se somente calicivírus. Observou-se a consistente persistência do vírus no trato faríngeo de animais sadios e em algumas ocasiões nas passagens nasais⁽¹⁴⁾.

Segundo POVEY & JOHNSON⁽⁸⁾ a eliminação do vírus no animal portador ocorre continuamente. Estes autores relatam que um animal observado durante 11 meses, apresentou excreção viral de "swabs" orofaríngeos em 35 das 37 ocasiões das quais as amostras foram coletadas.

SPRADBROW e colaboradores⁽¹²⁾ relataram o isolamento de calicivírus em 39% dos gatos utilizados no estudo, tendo recuperado o vírus de 100% dos "swabs" orofaríngeos, 31% dos "swabs" nasais e 18% dos "swabs" conjuntivais.

POVEY & JOHNSON⁽⁹⁾ isolaram calicivírus de 19% dos "swabs" coletados da orofaringe de animais clinicamente sadios, enquanto que em animais doentes a taxa de isolamento foi de 17%. POVEY e colaboradores⁽¹⁰⁾ descreveram casos onde o calicivírus foi isolado continuamente durante o período de 78 dias a dois anos e meio,

da região orofaríngea de gatos livres de sinais clínicos e com níveis moderados de anticorpos circulantes.

Os objetivos deste trabalho foram inocular o calicivírus em felinos soronegativos para reproduzir a enfermidade, tentar o isolamento do calicivírus de felinos experimentalmente e naturalmente infectados, bem como avaliar o período de excreção viral dos animais experimentalmente infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Inoculação Experimental

Para a execução desse experimento foram utilizados seis gatos de uma mesma ninhada, com sete semanas de idade, originados de uma criação mantida pelo Setor de Virologia, no Biotério do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, os quais foram inoculados com calicivírus felino. Estes animais, foram considerados aptos para o experimento após exames prévios.

A cepa viral utilizada foi isolada por Weiblen e colaboradores⁽¹⁵⁾, que posteriormente foi identificada pela técnica de soro-vírus-neutralização⁽¹⁰⁾ como sendo calicivírus. O vírus foi cultivado e titulado em células CRFK, e o título do inóculo foi calculado pelo método de REED & MUENCH (11) contendo 100-400 DICT50/0,025 ml (Dose Infectante do Cultivo de Tecido a 50%).

A inoculação foi feita por via intranasal, com os animais mantidos em decúbito dorsal, enquanto dois ml do cultivo do vírus era lentamente ejetado da seringa hipodérmica na qual foi acoplada na extremidade um catéter plástico flexível. Dois gatos da ninhada foram usados como controles, sendo inoculados da mesma forma com dois ml de meio de cultivo celular livre de vírus. Durante todo o experimento os animais permaneceram em gaiolas, e os animais controles ficaram em salas separadas dos animais infectados, Diariamente, observava-se os sinais clínicos e coletava-se "swabs" para o isolamento em cultivo celular. Desses animais foram coletados 96 "swabs", sendo que 32 foram da orofaringe, 32 da região nasal e 32 da conjuntiva.

Também foram incluídos nesse estudo 162 "swabs" coletados das regiões faríngeana, nasal e conjuntival de gatos com diferentes idades e raças, machos e fêmeas, sadios ou com sinais clínicos de doença respiratória, oriundos do município de Santa Maria, RS.

2 - Isolamento em cultivo celular

Os "swabs" para o isolamento em cultivo celular foram imersos em dois ml de Meio Essencial Mínimo^a (MEM) com duas vezes a concentração de antibiótico (400 UI

de Penicilina G Potássica^b e 0,4 mg de Sulfato de Estreptomicina^c) e 0,0025 mg de Fungizon^d por ml. A seguir, o meio em que se encontravam os "swabs" foi inoculado em tubos contendo uma monocamada de células CRFK, numa proporção de 0,2 ml por tubo. Tubos testemunhas contendo apenas cultivo celular foram mantidos nas mesmas condições. Passado o período de adsorção de uma hora desprezou-se o inóculo e adicionou-se um ml de MEM suplementado com 2% de soro fetal bovino em cada tubo. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, durante cinco dias. Todos os tubos foram observados diariamente em microscópio invertido para detectar a presença de efeito citopático (ECP). No final do quinto dia, os tubos foram congelados a -18 °C, e posteriormente reinoculados, efetuando-se assim a segunda e terceira passagem do material em cultivo celular. Os materiais sem efeito citopático na terceira passagem foram considerados negativos. As amostras que nas três passagens em cultivo apresentaram ECP, foram tratadas com 0,05 ml de clorofórmio mais um ml do material suspeito. A mistura foi agitada durante dois minutos, e após colocada durante 10 minutos a 4 °C. Passado este período foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e posteriormente inoculado em cultivo celular para verificar a sensibilidade do vírus ao clorofórmio. Paralelamente, foi realizado, nas amostras cujas três passagens em cultivo celular apresentaram ECP, o teste de neutralização em tubos. Fez-se diluições seriadas do soro hiperimune, partindo-se da diluição 1:2 até 1:16. Em cada 0,2 ml da diluição do soro adicionou-se igual volume de material suspeito. Após repouso de 30 minutos a 4 °C, 0,2 ml de cada mistura foi inoculado em tubos contendo células CRFK. Tubos controles contendo diluições do soro hiperimune e MEM foram também inoculados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sinais de doença respiratória aguda foram observados nos quatro animais, após a inoculação com uma cepa patogênica de calicivírus. Os sinais clínicos caracterizaram-se por descarga ocular e nasal, úlceras na língua, severa depressão e temperatura alta. A morte de três animais, deu-se no quarto dia após a inoculação. Os sinais clínicos descritos aqui já foram citados⁽¹³⁾ para as infecções por calicivírus. As médias das temperaturas retais de quatro animais inoculados e dois controles nos primeiros quatro dias após a inoculação encontram-se na Figura 1.

As taxas de isolamentos encontradas nos "swabs" coletados dos animais inoculados com calicivírus foram de 59,3% (19/32), 43,7% (14/32) e 40,6% (13/32), respectivamente para os "swabs" orofaríngeos, nasais e conjuntivais. Esses dados foram diferentes dos encontrados por outros autores⁽¹⁾, que recuperaram o vírus de 80% dos

"swabs" nasais e 33% dos conjuntivais. Alguns pesquisadores^(6 e 7) obtiveram altos índices de isolamentos, tendo recuperado o vírus de 85% dos "swabs" conjuntivais, 81% da orofaringe e 77% das narinas. A provável causa da discrepância das taxas de isolamentos pode ser devido ao fato de que o método de inoculação e as cepas utilizadas foram diferentes entre os autores. Este experimento utilizou a via intranasal, enquanto os autores citados acima utilizaram o método por aerossol.

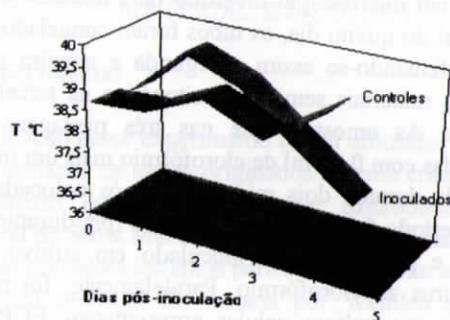


FIGURA 1 - Calicivirose Felina. Médias das temperaturas retais de quatro animais inoculados e dois controles nos primeiros quatro dias após a inoculação.

O calicivírus foi recuperado durante os primeiros quatro dias de todos os "swabs" dos animais inoculados. Dos "swabs" dos animais controles, também houve recuperação viral a partir do segundo dia, persistindo até o sétimo dia. O período de excreção viral está de acordo com os encontrados por outros autores^(2 e 6), que obtiveram a maioria dos isolamentos na primeira semana após a inoculação, embora estes autores não tenham isolado vírus de animais controles. A contaminação dos controles ocorrida neste experimento, provavelmente foi através de fômites, uma vez que os animais controles ficaram em salas separadas dos animais infectados. A transmissão do calicivírus pode dar-se através de fômites, devido à resistência deste ao ambiente⁽⁸⁾. A precariedade das instalações pode ter favorecido a transmissão do vírus para os animais controles. A disseminação aos controles também demonstra a grande infectividade do vírus.

A porcentagem de isolamentos de calicivírus encontrada nos 162 "swabs" coletados dos animais ruidos ou com sinais clínicos de doença respiratória foi de 12,9% (7/54), 5,5% (3/54) e 1,8% (1/54) respectivamente para os "swabs" orofaríngeos, nasais e conjuntivais. Esses resultados foram inferiores aos encontrados por SPRADBROW e

colaboradores⁽¹²⁾, que isolaram o vírus de 100% dos "swabs" orofaríngeos, 31% dos nasais e 18% dos conjuntivais. Esta divergência de resultados, provavelmente se deva à diferença das populações estudadas. Devido à baixa porcentagem de isolamentos encontrada neste trabalho, é possível afirmar-se que o calicivírus ainda não está muito difundido entre a população felina amostrada. Pode-se, no entanto, afirmar que este vírus está envolvido no complexo respiratório felino por ter sido o único agente vírico isolado na população estudada.

Como não houve um acompanhamento contínuo dos animais dos quais o vírus foi isolado, não foi possível detectar a existência de portadores persistentes entre a população felina estudada. Neste trabalho observou-se que o vírus foi isolado com maior frequência da orofaringe que de outros locais. Esta observação já foi realizada por outros pesquisadores^(9, 10 e 14), que relataram a consistente persistência do vírus no trato faríngeo.

O efeito citopático das amostras suspeitas caracterizou-se pelo arredondamento e refringência celular devido ao intumescimento dessas, com posterior desprendimento das células da superfície do tubo, o que foi compatível com as descrições feitas por outros^(5 e 15) para o calicivírus. Este efeito apareceu entre 24 e 48 horas após a inoculação. Os materiais suspeitos quando tratados com clorofórmio apresentaram resistência, caracterizando-se assim como um vírus sem envelope. A neutralização do vírus foi indicada pela ausência de efeito citopático no cultivo celular.

CONCLUSÕES

1. A inoculação experimental permitiu a indução de sinais clínicos compatíveis com a enfermidade.
2. O período de excreção viral dos animais inoculados foi de uma semana.
3. O local de persistência mais comum do vírus foi a orofaringe.
4. O calicivírus não está muito difundido entre a população felina estudada.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao funcionário Jorge Rodrigues Martins, pela colaboração e amizade.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a) MEM - Eagle's Minimal Essential Medium GIBCO - Gran Island, USA.
- b) Penicilina G potássica - INLAB
- c) Sulfato de Estreptomicina - INLAB
- d) Fungizon - SQUIBB Industria Química - Av.João dias, 1084 - Santo Amaro, SP.

SUMMARY

Calicivirus: Experimental Inoculation and Isolation

An experiment with calicivirus was conducted using six cats with seven weeks of age, two were control animals. High temperature, nasal and ocular discharge, tongue ulcers and severe depression were the prominent clinical signs. A total of 96 swabs were collected from the oropharynx, nasal and conjunctival regions of the cats. The rates of viral isolation from the oropharynx, nasal and conjunctival mucosa were 59.3% (19/32), 43.7% (14/32) and 40.6% (13/32), respectively. The virus was recovered from all the swabs of the inoculated cats during the first four days. From the control animals, the virus could also be isolated by the second day after inoculation, which persisted until the seventh day. Also, a total of 162 swabs were collected from the oropharynx, nasal and conjunctival mucosa of healthy cats, or cats showing clinical signs of respiratory disease. The percentage of isolation in such cats was 12.9% (7/54), 5.5% (3/54) and 1.8% (1/54) from the oropharynx, nasal and conjunctival mucosa, respectively. The experimental inoculation of calicivirus could reproduce the clinical signs related to feline calicivirosis. The virus was more frequently isolated from the oropharynx swabs. The calicivirus seems to be not widely spread in among healthy animals or cats with clinical signs of respiratory disease.

KEYWORDS: isolaton, calicivirus, feline, swabs

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. BARTHOLOMEW, P.T.; GILLESPIE, J.H. Feline viruses. I. Characterization of four isolates and their effect on young kittens. *Cornell Vet*, v. 58, p. 248-265, 1968.

02. CRANDELL, R.A.; MADIN, S.H. Experimental studies on a new feline virus. *Am J Vet Res*, v. 21, n. 83, p.551-556, 1960.
03. CRANDELL, R.A.; NIEMANN, W.H.; GANAWAY, J.R.; et al. Isolation of cytopathic agents from the nasopharyngeal region of the domestic cat. *Virology*, v. 10, n. 2, p. 283-285, 1960.
04. FASTIER, L.B. A new feline virus isolated in tissue culture. *Am J Vet Res*, v. 18, p. 382-389, 1957.
05. GILLESPIE, J.H.; SCOTT, F.W. Feline viral infections. *Advanc Vet Sci*, v. 17, p. 163-200, 1973.
06. HOLZINGER, E.A.; KAHN, D.E.; Pathologic features of Picornavirus infections in cats. *Am J Vet Res*, v.31,n. 9, p. 1623-1630, 1970.
07. KAHN, D.E.; GILLESPIE, J.H. Feline viruses: Pathogenesis of picornavirus infection in the cat. *Am J VetRes*,v 32, n. 4, p. 521-530, 1971.
08. POVEY, R.C.; JOHNSON, R.H. Observations on the epidemiology and control of viral respiratory disease in cats. *J Small Anim Pract*, v.11, p. 485-494, 1970.
09. POVEY, R.C.; JOHNSON, R.H. A survey of feline viralrhinotracheitis and feline picornavirus infection in Britain. *J Small Anim Pract*, v. 12, p. 233-247, 1971.
10. POVEY, R.C.; WARDLEY, R.C.; JESSEN, H. Feline picornavirus infection: The "in vivo" carrier state. *VetRec*, v. 92, p. 224-229, 1973.
11. REED, R.M., MUENCH, H. A single method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*, v.27, p.493-497, 1938.
12. SPRADBROW, P.B.; BAGUST, T.J.; BURGESS, G.; et al. The isolation of picornavirus from cats with respiratory disease. *Aust Vet J*, v. 46, p. 105-108, 1970.
13. STUDDERT, M.J. Caliciviruses: Brief review. *Arch Virol*, v. 58, n. 3, p. 157-191, 1978.

14. WALTON,T.E.;GILLESPIE, J.H. Feline viruses. VI. Survey of incidence of feline pathogenic agents in normal and clinically-ill cats. **Cornell Vet**, v. 60, p. 215-230, 1970.
15. WEIBLEN, R. RAISER, A.G., RAHAL, S.C. et al. Isolation of feline calicivirus from cats in Brazil. **VetRec**, v. 4, n. 122, p. 94- 95, 1988.