

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

MEDICINA VETERINÁRIA

BRUNO MELO TEIXEIRA

**DETECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO
GENE N DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA EM CÃES DE
PORTO ALEGRE, RS**

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

DETECÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE N
DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA EM CÃES DE PORTO ALEGRE,
RS

Autor: Bruno Melo Teixeira

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para a obtenção da
graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Michel Roehle

PORTO ALEGRE

2015/2

RESUMO

Vírus da cinomose canina (CDV) é um Morbillivirus que causa uma doença multissistêmica em cães e outros carnívoros com envolvimento respiratório, gastrointestinal, neurológico e cutâneo. O vírus possui um genoma de fita simples de RNA com aproximadamente 15.9 kb, composto de seis genes que codificam para oito proteínas virais. O gene *N* é utilizado como um marcador molecular epidemiológico para a comparação entre diferentes cepas de CDV. O objetivo do presente estudo foi de comparar os segmentos do gene *N* recuperados de urina e sangue coletados de cães de Porto Alegre, RS. No total, 41 amostras de urina e 19 amostras de sangue total foram coletadas de animais clinicamente suspeitos e submetidos à extração de RNA, transcrição reversa e amplificação por PCR, visando um fragmento de 335 pb do gene *N*. Quatorze amostras de urina e oito amostras de sangue apresentaram o amplicon esperado. Dezesesseis destas amostras foram clonadas e sequenciadas pelo método de Sanger. As sequências de nucleotídeos foram comparadas com as sequências de cepas vacinais e selvagens disponíveis no GenBank. A comparação genômica revelou que as cepas de CDV endêmico possuem similaridade entre elas de 96.25-100%; quando comparadas com as cepas “clássicas” vacinais Onderstepoort e Lederle, a semelhança variou entre 94.98 - 96.55%. Entretanto, filogeneticamente, as sequências recuperadas agruparam separadas das cepas vacinais. Quinze das dezesesseis sequências agruparam juntamente com cepas norte-americanas e uruguaia, ao passo que a sequência restante agrupou com sequências de vírus de origem chinesa e taiwanesa. Concluindo, nós descobrimos que ao menos duas variantes patogênicas diferentes de CDV estão circulando atualmente na população de cães domésticos de Porto Alegre e estas cepas são semelhantes às circulantes no resto do mundo.

Palavras-chave: CDV, gene do nucleocapsídeo, análise filogenética

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV) is a Morbillivirus that causes a multisystemic disease of dogs and other carnivores with respiratory, gastrointestinal, neurological and cutaneous involvement. The virus has a single stranded RNA genome with about 15.9 kb, comprising six genes that code for eight viral proteins. The N gene has been used as a molecular epidemiological marker for comparing different CDV strains. The aim of the present study was to compare segments of the N gene recovered from urine and blood collected from dogs in Porto Alegre, RS. In total, 41 urine samples and 19 whole blood samples were collected from clinically suspected animals and submitted to RNA extraction, reverse transcription and PCR amplification, targeting a 335 bp fragment of the N gene. Fourteen urine samples and eight blood samples gave rise to the expected amplicon. Sixteen of these were cloned and sequenced by the Sanger method. Nucleotide sequences were compared to those of vaccinal and wild type strains available at GenBank. Genomic comparisons revealed that endemic CDV strains share 96.25–100% similarity; when compared to classical vaccine strains Onderstepoort and Lederle, similarity ranged between 94.98 and 96.55%. However, phylogenetically, recovered sequences clustered apart from vaccine strains. Fifteen out of the sixteen sequences clustered along with Uruguayan and North American strains, whereas the remainder sequence clustered with sequences of viruses of Chinese and Taiwanese origin. In conclusion, we found that at least two different pathogenic CDV strains are currently circulating in domestic dog population from Porto Alegre, and those are similar to worldwide circulating strains.

Key words: CDV, nucleocapsid gene, phylogenetic analysis

LISTA DE FIGURAS

1. Figura 1	16
--------------------------	-----------

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1	13
-------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
1.1 Características gerais	07
1.2 Epidemiologia	08
1.3 Patogenia	08
1.4 Sinais clínicos em cães	09
1.5 Controle	10
1.6 Diagnóstico	10
1.7 Objetivos	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Amostragem, extração e DNA complementar	12
2.2 Primers e PCR	12
2.3 Clonagem	13
2.4 Sequenciamento e análise filogenética	13
3 RESULTADOS	15
4 DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais

O vírus da cinomose (CDV – *Canine distemper virus*) é o agente etiológico da cinomose, doença contagiosa prevalente no mundo inteiro. Este vírus é capaz de infectar mamíferos da ordem Carnivora e de outras ordens, inclusive animais marinhos (FRISK et al., 1999). O CDV é um Morbilivirus pertencente à família Paramyxoviridae. É um vírus envelopado com genoma de RNA fita simples de polaridade negativa, com uma extensão de aproximadamente 15.700 bases, que contem seis genes codificantes de oito proteínas (YI et al., 2012).

As proteínas estruturais são a nucleoproteína (NP), a proteína de matriz (M), as glicoproteínas de fusão (F) e hemaglutinina (H). As proteínas F e H estão envolvidas no reconhecimento do receptor na célula alvo e no processo de fusão que ocorre durante a infecção intercelular, comum entre os Paramyxovirus (ITO et al., 1997). Enquanto que a proteína M encontra-se em associação com as glicoproteínas F e H e com a NP, desta forma possui função na replicação viral e no processo de fusão celular na transmissão do vírus.

A nucleoproteína é uma importante proteína estrutural do vírus, encontrada em grande quantidade na partícula viral e que está associada ao genoma viral, protegendo-o de nucleases. Possui função regulatória na transcrição e replicação do vírus e influencia na morfogênese do vírion (BUDASZEWSKI, 2013).

As proteínas não estruturais codificadas pelo genoma viral são a fosfoproteína (P) e a proteína maior (L), que associadas formam a RNA-polimerase RNA-dependente. Além destas encontram-se ainda as proteínas V e C, codificadas pelo gene *P*, que possivelmente estão envolvidas nos processos de resistência do vírus à resposta imune inata (WIENER et al., 2007).

Apesar de apenas um sorotipo do CDV ser reconhecido até o momento, muitas variantes genotípicas estão sendo descobertas por meio de análises das sequências de nucleotídeos. Estes isolados revelaram diversos grupos de cepas semelhantes na sua composição genética e estas variantes circulam por todo o mundo. Cepas de diferentes virulências e tropismo celular tem sido relatadas e associadas a surtos da doença em animais (FRISK et al., 1999).

1.2 Epidemiologia

O CDV acomete principalmente membros das famílias canidae (cães, lobos e raposas), procionidae (guaxinins, mão-pelada e pandas-vermelho) e mustelidae (furões, texugos e visons). Diversas outras famílias de carnívoros também são infectados e isto pode levar até mesmo a morte de grande parte da população em questão. No caso dos felinos selvagens, muitas espécies são suscetíveis ao vírus e já foram relatados surtos em leões, tigres, leopardos, jaguares, lincês, entre outros (SUZUKI et al., 2015). Não se pode afirmar que a infecção pelo vírus da cinomose leva os felinos invariavelmente à morte, pois demonstrou-se que onças de vida livre eram soropositivas para anticorpos neutralizantes no Brasil, no entanto não havia relato de surto de mortes (FURTADO et al., 2013). Inclusive há relatos de infecção por CDV em ursos (COTTRELL et al., 2013). Surtos de cinomose em primatas não-humanos também foram descritos e isto leva à uma preocupação sobre a possível natureza zoonótica do vírus (QIU et al., 2011; SUN et al., 2010; YOSHIKAWA et al., 1989).

1.3 Patogenia

Qualquer cão não imune ou imunodeficiente está sujeito a contrair o vírus e desenvolver a doença clínica. Animais que foram imunizados ou filhotes que ainda possuem anticorpos maternos circulantes podem apresentar altos títulos de anticorpos neutralizantes contra o CDV (SHIN et al., 1995).

O CDV tem o tropismo pelas células do hospedeiro através da ligação entre a proteína H na superfície do vírion e o receptor CD50 (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) das células hospedeiras, como outros Morbilivirus (WENZLOW et al., 2007). Há relatos de que essa interação entre a hemaglutinina e o receptor celular é o que confere a especificidade do vírus pela espécie animal infectada (BIERINGER et al., 2013). Contudo, outros receptores celulares também são implicados na invasão do vírus na célula hospedeira e na fusão entre as células induzidas pelo CDV, como o receptor CD9 (BEINEKE et al., 2009).

O vírus é disseminado através da secreção oronasal e qualquer outro fluido corporal. A transmissão ocorre com a inalação de vírus carregados pelo ar e aerossóis contendo partículas virais (KRAKOWKA et al., 1980). Após a transmissão, inicialmente há uma replicação viral nas células linfoides e macrófagos do trato respiratório superior e, então, dissemina-se para os demais órgãos transportado pelos linfócitos, monócitos e plaquetas, ou por viremia (FRISK et al., 1999). As células epiteliais, mesenquimais, neuroendócrinas e hematopoiéticas estão entre

os tipos celulares infectados (BEINEK et al., 2009).

Nos casos crônicos de doença neurológica relacionada ao CDV, a persistência no sistema nervoso central está relacionada com a nucleoproteína (N). Anticorpos monoclonais anti-N foram capazes de reconhecer esta proteína em cepas atenuadas, porém não em cepas patogênicas (STETTLER e ZURBRIGGEN, 1995). A forma como esta proteína está relacionada à patogenia da cepa não está bem clara ainda. Entretanto, sabe-se que apesar da nucleoproteína não estar diretamente envolvida no processo de fusão intercelular mediada pelas proteínas F e H, a inibição do mecanismo ocorreu mais intensamente quando na presença da nucleoproteína em associação com a proteína da matriz. O processo de fusão intercelular que causa a lise das células é ausente durante a infecção por cepas virulentas que apresentam cronicidade no SNC (WIENER et al., 2007).

1.4 Sinais clínicos em cães

A apresentação da doença depende de fatores como a patogenicidade da cepa infectante, fatores relacionados ao hospedeiro, como estado imunológico, idade e infecções secundárias. Porém a maioria dos cães infectados são assintomáticos (ARNS et al., 2012). Os sinais clínicos são variados, a infecção pode manifestar-se nos tratos respiratório, digestivo, nervoso, tegumentar e/ou ainda afetar o sistema imune. A doença é de natureza sistêmica e uma infecção crônica pode ocorrer nos vários sistemas afetados, mas principalmente, nos sistemas nervoso central e linfóide, desencadeando as sequelas mais características da doença: imunossupressão e leucoencefalite desmielinizante (BEINEK et al., 2009).

Os sinais clínicos mais frequentemente observados na doença aguda são secreção nasal e ocular serosa a mucopurulenta, pneumonia intersticial e bronquite necrosante que podem ser agravados devido à infecção secundária, causando broncopneumonia supurativa. No sistema digestivo, são frequentes os sinais como enterite catarral apresentada através de diarreia. No sistema tegumentar causa lesões pustulares no abdômen, hiperqueratose dos coxins plantares e do plano nasal. Os animais podem apresentar também, conjuntivite, hipoplasia do esmalte dentário e sinais neurológicos agudos tais como hipersalivação, mioclonias, convulsões, parestesia dos membros pélvico, estupor e até mesmo coma. (BEINEK et al., 2009; ARNS et al., 2012)

1.5 Controle

O controle e profilaxia é realizado através de vacinação com vírus vivo atenuado, algumas vacinas incluem na sua formulação vírus recombinante. A vacina é muito eficaz, tornando a cinomose em uma doença esporádica em países onde a vacinação é regular e massiva. Entretanto, há relatos de falhas vacinais que tem sido associados a possíveis introduções de novas variantes do vírus, ocorrendo, desta forma, surtos de cinomose em cães domésticos não vacinados e vacinados (BEINEK et al., 2009; YI et al., 2012; CALDERON et al., 2007; MARTELLA et al., 2006). Quando comparadas as sequências de nucleotídeos de amostras de vírus selvagens e vírus “clássicos”, que são usados para imunização, estas diferem principalmente nos genes das proteínas hemaglutinina, de fusão e nucleoproteína. Foi sugerido que tais diferenças sejam resultantes de mutações que levariam a modificações na patogenicidade das cepas circulantes (YOSHIDA et al., 1998; SIMON-MARTINEZ et al. 2008).

1.6 Diagnóstico

A titulação de anticorpos neutralizantes através da vírus neutralização e ELISA não é uma ferramenta de valor diagnóstico (SHIN et al., 1995). No entanto, a detecção de anticorpos IgM em amostras pareadas através do método de ELISA tem sido usada como indicador de infecção ativa ou recente (ARNS et al., 2012).

O diagnóstico geralmente é presuntivo baseado nos sinais clínicos e histórico do paciente. Contudo, o diagnóstico laboratorial pode ser realizado através de imunofluorescência e imunoperoxidase utilizando o sedimento urinário, lavagem traqueal e líquido cefalorraquidiano. Outras técnicas como o *imprint* conjuntival ou vaginal, esfregaço sanguíneo e histopatologia também podem ser utilizados (KIM et al., 2006).

O isolamento viral não é amplamente utilizado para o diagnóstico pois demanda muito tempo e o vírus é de difícil isolamento. Na microscopia eletrônica, partículas virais podem ser visualizadas nas fezes (ARNS et al., 2012). Atualmente, o método diagnóstico mais difundido é a RT-PCR. A detecção molecular do RNA viral é rápida e altamente sensível e específica, a despeito de sinais clínicos, achados patológicos, títulos de anticorpos ou distribuição do vírus. Porém, a sensibilidade da RT-PCR é afetada pelo primer utilizado, dependendo da sua posição no gene (FRISK et al., 1999).

A nucleoproteína é utilizada mais frequentemente para a detecção molecular do vírus em amostras de animais suspeitos (DI FRANCESCO et al., 2012). O gene da proteína é composto pela região variável, a região média, e a região conservada, que codificam para os domínios terminal C variável e terminal N mais extenso e altamente conservado da proteína (KEAWCHAROEN et al., 2005). Como esta proteína encontra-se dentro da célula, não fica exposta a fatores mutagênicos externos, e sendo assim permanece mais conservada (ADASZEK et al., 2009). Apesar do gene N ser conservado, variações entre amostras de CDV foram relatadas (CASTILHO et al., 2007). Através de modificação no gene codificante pode-se confirmar o surgimento de outra cepa do vírus que poderá estar envolvida em um surto da doença (YOSHIDA et al., 1998; ADASZEK et al., 2009).

Sendo assim, demonstra-se a valor diagnóstico da detecção da presença dessa proteína nas amostras dos animais portadores. Por meio da análise das sequências nucleotídicas encontradas, podemos buscar novas variantes possivelmente envolvidas nos surtos da doença, assim como compararmos com as cepas existentes e disponíveis em bancos de dados.

1.7 Objetivos

Através da técnica da RT-PCR, objetivamos detectar a presença do gene *N* da nucleoproteína do CDV nas amostras de cães clinicamente suspeitos da cidade de Porto Alegre – RS. No passo seguinte caracterizar geneticamente as cepas encontradas e analisar filogeneticamente as sequências em comparação com as sequências disponíveis no GenBank. Portanto, a pesquisa visa fazer um levantamento da prevalência da cinomose nas amostras submetidas ao nosso laboratório para diagnóstico e um rastreamento das cepas circulantes e envolvidas na doença.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostragem, extração e DNA complementar

Amostras de urina e sangue total foram coletadas de cães da cidade de Porto Alegre, RS clinicamente suspeitos de cinomose e remetidos ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo laboratório parceiro. No total de 60 amostras, 41 amostras eram de urina e 19 de sangue total coletadas em tubos contendo EDTA. As amostras recebidas foram submetidas à extração de DNA e RNA viral total utilizando o kit PureLink™ Viral RNA/DNA da Invitrogen™ de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração do material genético viral foram utilizados 200 µl da amostra para cada reação, todas as amostras foram processadas em duplicata. Os extraídos contendo RNA viral foram armazenados a -80 °C, em seguida era realizado o DNA complementar (cDNA) utilizando *primers* randômicos.

2.2 Primers e PCR

A amplificação de um fragmento de 335 pb do cDNA do gene N da nucleoproteína foi realizada através de PCR utilizando 2,5 µl de solução tampão, 2,5 µl de dimetilsulfóxido, 1 µl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (10 mM), 0,5 µl de cloreto de magnésio (50 mM), 2 µl de cDNA amostral, 0,5 µl de *primer* senso e 0,5 µl de *primer* antisenso e 0,3 µl de Taq polimerase (1 U) para um volume final de 25 µl. Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento foram desenhados e descritos em trabalho anterior (WANG et al., 2005 apud YI et al., 2012). As sequências dos *primers* estão apresentados na tabela 1. Os *primers* foram desenhados baseados nas sequências genômicas das cepas de CDV disponíveis no GenBank usando o programa Primer Premier 5.0. As posições dos nucleotídeos na sequência genômica do CDV está igualmente apresentado na tabela 1, usou-se como parâmetro a sequência completa do gene da cepa Onderstepoort do CDV (YI et al., 2012). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 52 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos no termociclador. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5 % com brometo de etídio (0,5 µg/mL).

Tabela 1 - *Primers* utilizados para RT-PCR do gene N. (Adaptado de YI et al., 2012)

Oligonucleotídeos	Localização*	Sequência	Amplicon
P1	198	5' GATAAAGCATGTCATTATAGTCCTAA3'	335 pb
P2	533	5' CTTGAGCTTTCGACCCTTC3'	335 pb

* Localização dos nucleotídeos baseada na sequência completa do gene da cepa Onderstepoort.

2.3 Clonagem

Os fragmentos do gene *N* resultante da PCR de 16 amostras positivas foram inseridos em vetores de clonagem TOPO TA da Invitrogen™ e multiplicados em cepas *Escherichia coli* competentes. As bactérias foram transformadas através da eletroporação em banho-maria a 42 °C por 30-60 segundos. Em seguida foram colocadas em meio de cultura LB e incubadas a 37 °C *overnight*. As bactérias foram semeadas em placas com meio de cultura LB contendo 1,5 % de ágar bacteriológico e ampicilina ou canamicina a e deixadas a 37 °C *overnight*. Após seleção de 3 colônias de cada amostra, estas foram novamente colocadas em meio LB para multiplicação a 37 °C *overnight*. A extração plasmidial foi realizada com o kit PureLink® Quick Plasmid Miniprep da Invitrogen™ seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os insertos foram verificados com a enzima de restrição EcoRI e visualizados na eletroforese em gel de agarose a 1 %.

2.4 Sequenciamento e análise filogenética

O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger. As sequências de nucleotídeos foram analisadas e alinhadas com o programa Geneious versão 8.1.6. A análise filogenética foi realizada no programa MEGA6, para a construção da árvore filogenética incluiu-se as 16 sequências das amostras e outras 28 sequências da mesma região amplificada do gene *N* disponíveis no GenBank, incluindo duas cepas vacinais (Onderstepoort e Lederle) e o vírus da peste das focas (PDV – Phocine distemper virus) como outgroup. No total, 284 posições nas sequências foram analisadas. O método estatístico para análise das sequências durante a construção da árvore filogenética foi maximum-likelihood no modelo Tamura-Nei.

As sequências do gene *N* utilizadas para a análise filogenética estão sob os seguintes números de acesso no GenBank: Uruguay cepa Uy251 (KM280689); Germany isolado 2544/Han95 (AJ009656); Ferret US cepa 5804P (AY386316); Ferret US cepa 5804

(AY386315); Ferret US cepa R252 (KF640687); China cepa TN (AY390348); China isolado Hebei (KC427278); China cepa GZ0805 (KC667070); China cepa MS01 (DQ887066); Taiwan isolado Pingtung (DQ435615); Guaxinim China isolado CDV SY (KJ466106); China cepa PS (JN896331); China cepa HLJ2-07 (HQ540292); China isolado GS0904-8 (HM623892); China isolado XJ-5 (HM596313); China isolado GS0903-2 (HM596310); US isolado 164071 (EU716337); US isolado 01-2689 (AY649446); Suíça cepa A75/17 (AF164967); US isolado 98-2646 (AY542312); US isolado 98-2654 (AY466011); US isolado 98-2645 (AY445077); cepa Lederle (EF418783); cepa Onderstepoort (AF378705); Rinderpest virus Sokoto (EF186062); Rinderpest virus RBT1 (EF186058); Phocine distemper virus (D10371).

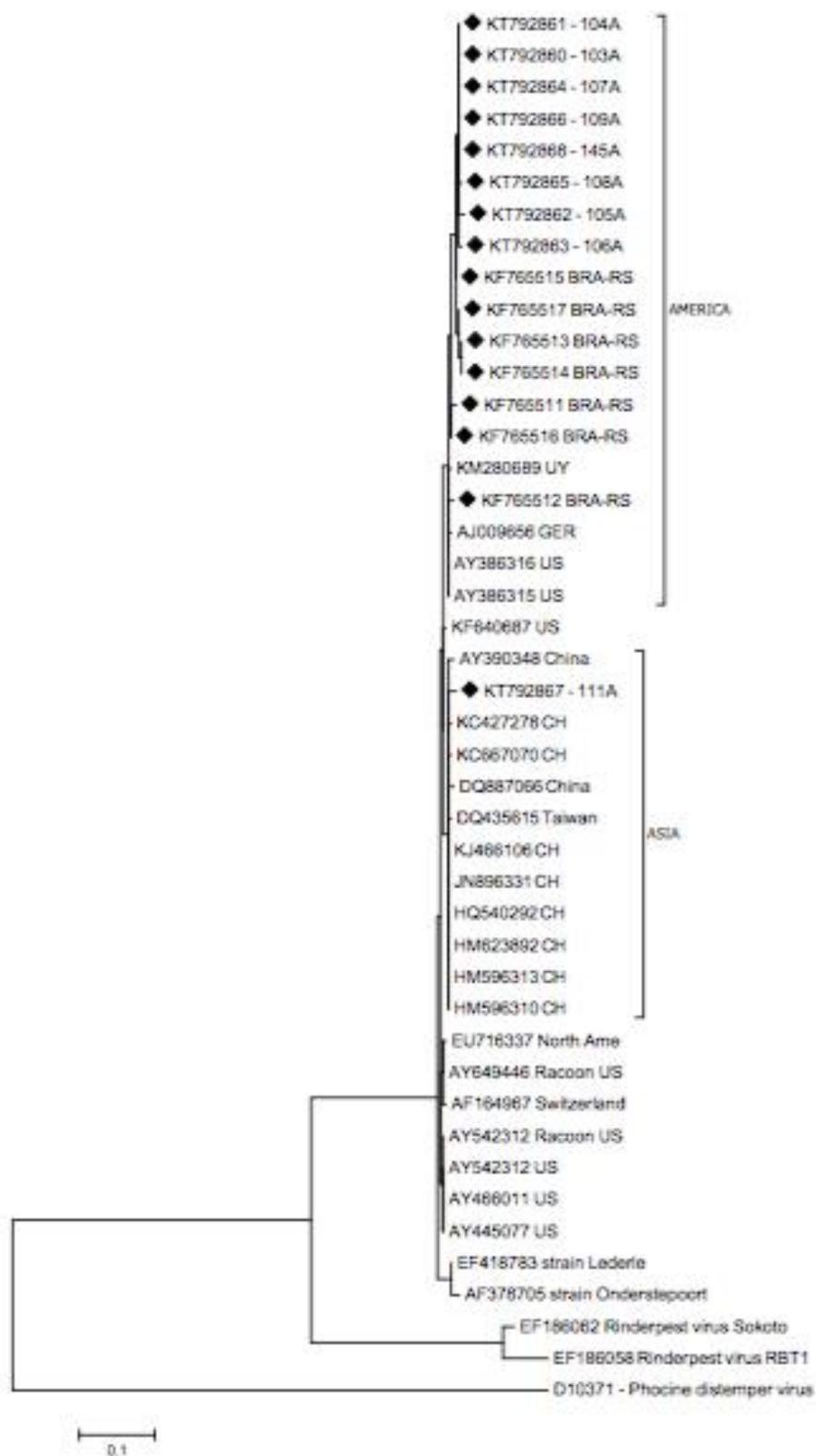
3 RESULTADOS

A RT-PCR revelou a presença de antígenos virais de CDV em 22 das 60 amostras iniciais (36,66%). Das 22 amostras positivas, 14 eram amostras de urina e 8 amostras de sangue total, representando 34,14 e 42,10 % de todas amostras de urina e sangue total submetidas à detecção molecular, respectivamente.

Dezesseis amostras positivas foram submetidas à clonagem e posteriormente sequenciadas, estas sequências de fragmento de 334 bases do gene *N* foram submetidas ao GenBank sob os números de acesso KT792860 - KT792868. Na comparação genômica entre as cepas de isolados dos animais de Porto Alegre- RS, as sequências possuíam 96,25 – 100 % de semelhança. Quando comparadas às sequências das cepas vacinais Ondersterpoort e Lederle, os isolados de Porto Alegre - RS apresentaram semelhança de 94-95,8 % e de 94,7-96,5 %, respectivamente.

A árvore filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do fragmento do gene *N* (figura 1) agruparam quinze sequências com cepas detectadas no Uruguai, América do Norte e Alemanha. Contudo, este cluster possui uma subdivisão em que 14 sequências brasileiras estão agrupadas entre si e outro *cluster* com um isolado brasileiro agrupado com cepas americanas, uruguaia e alemã. Uma amostra foi agrupada com vírus de origem chinesa e taiwanesa, apresentando homologia de 98.6 a 98.9 % com as variantes chinesas. Os isolados detectados em Porto Alegre - RS neste estudo foram agrupados em *clusters* separados das cepas vacinais.

Figura 1 – Análise filogenética de cepas e isolados de CDV baseados no fragmento de 335 pb do gene *N*. O vírus da peste das focas (PDV) foi incluído como outgroup.



4 DISCUSSÃO

A detecção do vírus da cinomose em amostras de animais clinicamente suspeitos através da RT-PCR mostrou-se sensível, rápida e específica para os fragmentos genômicos que busca-se amplificar e detectar, conforme relatado em estudo anterior (FRISK et al., 1999).

A urina é uma boa amostra clínica e amplamente utilizada para a detecção do RNA viral por sua alta sensibilidade e fácil obtenção. A urina é mais sensível que amostra de soro e leucócitos, e, ao menos, tão sensível quanto líquido cefalorraquidiano em casos de encefalite por cinomose; porém, a excreção urinária do vírus pode ser um importante meio de manutenção deste agente no ambiente (SHIN et al., 2004; SAITO et al., 2006). Estudos demonstraram que em amostras de urina, os amplicons de CDV são passíveis de detecção entre o 5º e 14º dia pós-infecção. Entretanto, em amostras de sangue total, o CDV é detectado posteriormente e por um período mais curto de tempo, entre 6 e 9 dias após a infecção, tornando este tipo de amostragem inadequada para o diagnóstico precoce da doença. Por outro lado, *swabs* da conjuntiva foram considerados altamente específicos e com capacidade de diagnóstico precoce a partir do dia 1 pós-infecção e detecção prolongada de até 14 dias pós-infecção (KIM et al., 2006).

A vacinação recente não é considerada um complicador diagnóstico em amostras de urina, devido a rápida eliminação do vírus vacinal (SAITO et al., 2006). Testes anteriores revelaram que a RT-PCR realizada em amostras de células mononucleadas sanguíneas periféricas não detectou antígenos de CDV em animais recentemente vacinados, desta forma sendo pouco provável a interferência no teste diagnóstico (SHIN et al., 1995).

A detecção de RNA em amostras biológicas é dificultado pela fragilidade do material genético envolvido. Enzimas RNase endógenas e exógenas podem degradar o RNA amostral devido à manipulação incorreta e o armazenamento em temperatura elevada. Portanto, compromete a eficiência e sensibilidade da RT-PCR (FRISK et al., 1999; DI FRANCESCO et al., 2012).

Apesar do controle vacinal, muitos surtos tem sido relatados ao redor do mundo (YOSHIDA et al., 1998; SIMON-MARTÍNEZ et al., 2007; CALDERON et al., 2007; KEAWCHAROEN et al., 2005). Em um estudo mais de 50% dos cães suspeitos clinicamente de serem portadores de cinomose tinham mais de 1 ano de idade e foram regularmente vacinados, demonstrando que o CDV ainda representa uma ameaça para a população canina a despeito de vacinação. (DI FRANCESCO et al., 2012). Alguns fatores são incriminados nas

falhas das respostas vacinais contra a cinomose, dentre elas podem ser citadas a qualidade da vacina, diversidade genética e resposta imune inadequada (LAN et al., 2006). Novas variantes genéticas das cepas de CDV podem estar associadas a alteração na patogenicidade e evasão do vírus do sistema imune em cães vacinados (MARTELLA et al., 2006). Apesar das proteínas H e F serem as principais envolvidas na resposta imune, como epítomos antigênicos, e as que apresentam maior variabilidade genética e antigênica (SIMON-MARTÍNEZ et al., 2007); variações antigênicas também foram identificadas na nucleoproteína (GIRAUDON et al., 1988).

O gene *N* é um dos mais conservados entre as cepas do CDV, então seria a região mais indicada para identificar novas linhagens genéticas através da análise filogenética (SIMON-MARTÍNEZ et al., 2007). Contudo, existem variações no gene *N* que podem influenciar o desenho dos *primers* utilizados interferindo na detecção molecular do vírus (PAWAR et al., 2011). Em geral, a semelhança de aminoácidos que compõem a nucleoproteína é alta. Porém, esta homologia é menor nos domínios terminais *N* e *C*.

A NP é composta por três regiões: um domínio terminal *N*, uma região central e um domínio terminal *C* (PARKS, WARD e LAMB, 1992). O domínio *N* terminal possui informações para a interação entre as nucleoproteínas e entre as NP e RNA e está envolvido, ainda, no processo de encapsidação e conformação do nucleocapsídeo. A região central é a mais conservada entre os Morbillivirus. Por sua vez, o domínio terminal *C* é hidrofílico e está exposto na superfície do nucleocapsídeo. Esta estrutura está relacionada com a proteína da matriz, a interação entre as proteínas NP e M é essencial para o processo de brotamento do vírus a partir das células hospedeiras. Portanto, uma diferença nesta região entre as cepas virulentas e atenuadas pode acarretar em diferenças na morfogênese, envelopamento e liberação do vírus. As diferenças citadas são importantes para a evasão vírus do sistema imune e persistência viral na doença crônica (STETTLER e ZURBRIGGEN, 1995).

Para que o sistema imune seja capaz de responder à um estímulo adequadamente, este antígeno deve possuir epítomos capazes de desencadear uma resposta inflamatória, seja ela humoral ou celular. Como já citado, as proteínas mais imunogênicas são a F e H, entretanto a NP também possui três domínios antigênicos identificados, sendo dois na região do domínio terminal *C* e um no domínio terminal *N*. As estruturas globulares da NP exerce um papel importante na composição do epítomo antigênico e no reconhecimento pelos anticorpos. Esta variabilidade na região terminal *C* pode ser implicada na heterogenicidade antigênica entre os morbillivirus (MASUDA et al., 2006).

Segundo Scaraglini et al. (2003), a virulência das diferentes cepas de CDV está

associada com a estrutura das proteínas componentes. Devido a trocas de nucleotídeos na sequência da região terminal C, mutações de aminoácidos ocorreram na NP. Estas mutações foram responsáveis pela alteração da estrutura secundária da proteína quando comparadas cepas atenuadas com cepas virulentas de CDV.

Num estudo realizado na Tailândia, foi detectado antígeno viral da nucleoproteína com sequência semelhante às de cepas vacinais. No entanto, o animal não havia histórico de vacinação e especulou-se que possa ter sido a exposição a animais vacinados como ocorreu a transmissão, conforme previamente descrito (MCCANDLISH et al., 1992). Neste mesmo estudo as sequências nucleotídicas do gene N foram agrupadas e não houve correspondência com os sinais clínicos confirmando a desconexão entre os dois fatores relatada por estudo anterior (YOSHIDA et al., 1998). A distribuição viral do CDV foi relatada como não citolítica e a sobrevivência do vírus associada à limitada expressão das proteínas F e H na superfície celular (KEAWCHAROEN et al., 2005).

O nosso trabalho foi realizado com o amplicon de 335 pb do gene *N* e as análises foram realizadas com uma sequência nucleotídica de 334 b. A análise filogenética revelou uma semelhança entre 15 amostras brasileiras e as posicionou no mesmo cluster de isolados americanos, uruguaio e alemão. Além disto, as amostras foram agrupadas em cluster separado dos vírus vacinais Onderstepoort e Lederle. Este fato é corroborado por estudo anterior que utilizou uma região mais conservada do gene *N*, a região média, ou seja, os isolados que circulam no município de Porto Alegre-RS estão relacionados com os isolados que circulam na região subjacente e com as cepas relatadas na literatura (CASTILHO et al., 2007).

Na análise filogenética do estudo realizado por Castilho et al. (2007), as cepas selecionadas foram agrupadas em 4 diferentes clusters, um contendo as amostras brasileiras, o segundo formado por amostras provenientes de guaxinins, o terceiro caracterizado por cepas orientais e um quarto cluster contendo as cepas vacinais Lederle e Onderstepoort. Os isolados brasileiros, nesse estudo, foram agrupados em *cluster* separado dos vírus vacinais, ainda, subdivididos em dois *clusters*, sendo que um destes clusters estava associado à uma cepa alemã. Tendo em vista esta subdivisão, foi relatado a ocorrência de ao menos duas linhagens de CDV circulantes no Brasil, mais especificamente no estado de São Paulo.

No entanto, neste presente estudo, uma amostra foi agrupada com o cluster composto por amostras chinesas e taiwanesas, apresentando homologia de até 98,9 % com as variantes chinesas. Esta cepa detectada em amostra de animal residente na localidade do estudo não pôde ser rastreada quanto ao seu histórico e proveniência, pois as análises são realizadas exclusivamente com as amostras, sem o acompanhamento de dados mais específicos como

histórico e sinais clínicos apresentados pelo animal.

As cepas detectadas nos animais positivos para o diagnóstico molecular de Porto Alegre, apresentam diferenças genéticas e, possivelmente, antigênicas de amostras vacinais. Este fato embasa, juntamente com os demais estudos e premissas avaliadas nesta discussão, que animais vacinados também estão sujeitos à infecção por vírus da cinomose. A caracterização molecular dos isolados apresenta uma importância ímpar no rastreamento do vírus e na implicação que a variabilidade molecular tem na virulência e persistência do vírus e na proteção imunológica contra estas diferentes cepas. Deve ser ressaltado que o monitoramento molecular do CDV é uma ferramenta efetiva de controle da doença da cinomose, que pode auxiliar tanto na detecção de novas linhagens regionais de cepas patogênicas, quanto no desenvolvimento de vacinas mais eficientes (ADASZEK et al., 2009).

5 CONCLUSÃO

Podemos concluir que ao menos duas cepas circulam entre animais do município de Porto Alegre-RS, ambas linhagens caracterizadas apresentam semelhanças a outras linhagens que circulam em diferentes regiões. Estas amostras estão relacionadas entre si e com isolados dos EUA, Alemanha e Uruguai, comprovando que a circulação regional do vírus é influenciada por áreas subjacentes, como no caso do Uruguai. Os vírus vacinais não foram associados aos surtos da doença que ocorrem no Brasil, tampouco na cidade do estudo em questão. Esta variabilidade genética pode estar envolvida na falha vacinal que são frequentemente relatados no mundo inteiro.

Pode-se inferir que apesar do vírus da cinomose canina ter sua virulência e persistência afetada pela modificação da sequência do gene *N* que altera a cadeia de aminoácidos e conseqüentemente a estrutura da nucleoproteína, estas alterações não são relacionadas ao desfecho clínico da doença. Porém, essas alterações moleculares podem estar envolvidas no estímulo da resposta imune eficiente através de vacinais. Torna-se importante a caracterização das cepas regionais e análise filogenética como método de rastreamento e acompanhamento do vírus na população canina, assim como uma ferramenta disponível no desenvolvimento de novas vacinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASZEK, Ł. et al. Molecular analysis of the nucleoprotein gene of canine distemper virus isolated from clinical cases of the disease in foxes, minks and dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, [S.i.], v. 12, n. 4, p. 433-437, 2009.
- ARNS, C. W. et al. Paramyxoviridae. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 27, p. 759-792.
- BEINEKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [S.i.], v. 127, n. 1-2, p. 1-18, jan. 2009.
- BIERINGER, M. et al. Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. **PLoS One**, v. 8, n. 3, mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595274>> Acesso em: 11 dez. 2015.
- BUDASZEWSKI, R. F. **Análise filogenética do vírus da cinomose canina no brasil**. 2013. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.
- CALDERON, M. G. et al. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v. 125, n. 3-4, p. 341-349, dez. 2007.
- CASTILHO, J. G. et al. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 654-659, 2007.
- COTTRELL, W. O. et al. First Report of Clinical Disease Associated with Canine Distemper Virus Infection in a Wild Black Bear (*Ursus americana*). **Journal of Wildlife Disease**, [S.i.], v. 49, n. 4, p. 1024-1027, nov. 2013.
- DI FRANCESCO, C. E. et al. Detection by hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and genetic characterization of wild type strains of *Canine distemper virus* in suspected infected dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. [S.i.], v. 24, n. 1, p. 107–115, jan. 2012.
- FRISK, A. L. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.i.], v. 37, n. 11, p. 3634-3643, nov. 1999.
- FURTADO, M. M. et al. Serosurvey for selected viral infections in free- ranging jaguars (*panthera onca*) and domestic carnivores in brazilian Cerrado, Pantanal, and Amazon. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 49, n. 3, p. 510–521, jul. 2013.
- ITO, M. et al. Role of a single amino acid at the amino terminus of the simian virus 5 F2 subunit in syncytium formation. **Journal of Virology**, [S.i.], v. 71, n. 12, p. 9855–9858, dez. 1997.

- KEAWCHAROEN, J. et al. Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v. 105, n. 2, p. 137-142, jan. 2005.
- KIM, D. et al. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S.i.], v. 68, n. 8, p. 877-879, ago. 2006.
- KRAKOWKA, S.; HIGGINS, R.J.; KOESTNER, A. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. **American Journal of Veterinary Research**, [S.i.], v. 41, n. 2, p. 284-292, fev. 1980.
- MARTELLA, V. et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 301-309, set. 2006.
- MASUDA, M. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, [S.i.], v. 29, n. 2-3, p. 157-165, mar-mai. 2006.
- MCCANDLISH, I. A. P. et al. Distemper encephalitis in pups after vaccination of the dam. **The Veterinary Record**, [S.i.], v. 130, n. 2, p. 27-30, fev. 1992.
- PARKS, G. D.; WARD, C. D.; LAMB, R. A. Molecular cloning of the NP and L genes of simian virus 5: identification of highly conserved domains in paramyxovirus NP and L proteins. **Virus Research**, [S.i.], v. 22, n. 3, p. 259-79, mar. 1992.
- PAWAR, R. M. et al. Isolation and molecular characterization of canine distemper virus from India. **Tropical Animal Health and Production**, [S.i.], v. 43, n. 8, p. 1617-1622, dez. 2011.
- QIU, W. et al. Canine Distemper Outbreak in Rhesus Monkeys, China. **Emerging Infectious Diseases**, [S.i.], v. 17, n. 8, p. 1541-1543, ago. 2011.
- SAITO, T. B. et al. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, [S.i.], v. 80, n. 1, p. 116-119, fev. 2006.
- SCARAGLINI, A. et al. Molecular Analysis of the NP Gene of Italian CDV Isolates. **Veterinary Research Communications**, [S.i.], v. 27, n.1, p. 355-357, jan. 2003.
- SHIN, Y.J. et al. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**, [S.i.], v. 82, p. 83-86, 2004.
- SHIN, Y. et al. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, [S.i.], v. 57, n. 3, p. 439-445, jun. 1995.

SIMON-MARTINEZ, J. et al. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. **The Veterinary Journal**, [S.i.], v. 175, n. 3, p. 423-426, mar. 2008.

STETTLER, M.; ZURBRIGGEN, A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/ 17.CDV strain of canine distemper virus. **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v. 44, n. 2-4 , p. 211-217, mai. 1995.

SUN, Z. et al. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v 141, n. 3-4, p. 374–378, mar. 2010.

SUZUKI, J. et al. Canine distemper virus infection among wildlife before and after the epidemic. **The Journal of Veterinary Medical Science**, [S.i.], v. 77, n. 11, p. 1457–1463, nov. 2015.

WENZLOW, N. et al. Immunohistochemical Demonstration of the Putative Canine Distemper Virus Receptor CD150 in Dogs with and without Distemper. **Veterinary Pathology**, [S.i.], v. 44, n. 6, p. 943-948, nov. 2007.

WIENER, D. et al. Synergistic inhibition in cell–cell fusion mediated by the matrix and nucleocapsid protein of canine distemper virus. **Virus Research**, [S.i.], v. 129, n. 2, p. 145–154, nov. 2007.

YI, L. et al. Development of a combined canine distemper virus specific RT-PCR protocol for the differentiation of infected and vaccinated animals (DIVA) and genetic characterization of the hemagglutinin gene of seven Chinese strains demonstrated in dogs. **Journal of Virological Methods**, [S.i.], v. 179, n. 1, p. 281–287, jan. 2012.

YOSHIDA, E. et al. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v. 59, n. 2-3, p. 237-244, jan. 1998.

YOSHIKAWA, Y. et al. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). **Veterinary Microbiology**, [S.i.], v. 20, n. 3, p. 193–205, jul. 1989.