

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA NO BRASIL

Dissertação de Mestrado

RENATA DA FONTOURA BUDASZEWSKI

Porto Alegre

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA NO BRASIL

Dissertação de Mestrado

Renata da Fontoura Budaszewski

**Dissertação apresentada como requisito
parcial para a obtenção do grau de mestre em
Ciências Veterinárias, especialidade Virologia.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal**

Porto Alegre

2013

CIP - Catalogação na Publicação

da Fontoura Budaszewski, Renata
Análise filogenética do vírus da cinomose canina
no Brasil / Renata da Fontoura Budaszewski. -- 2013.
84 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. cinomose. 2. cão. 3. genótipo. 4. américa do
sul. 5. diagnóstico. I. Wageck Canal, Cláudio,
orient. II. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA NO BRASIL

Renata da Fontoura Budaszewski

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela comissão formada pelos doutores:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Porto Alegre
2013

Renata da Fontoura Budaszewski

ANÁLISE FILOGENÉTICA DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA NO BRASIL

Aprovada em 04 MAR 2013

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, em primeiro lugar, pelo incentivo, apoio e compreensão que permitiu que eu completasse essa etapa da minha vida; sem a sua ajuda e seu carinho não conseguiria. Obrigada por compreender e dividir o meu amor pelos animais.

À Raquel, minha irmã, por sempre estar do meu lado me dando força e me incentivando, muito obrigada.

À minha avó Henny e meu avô Ney (*in memoriam*), que me ajudaram muito desde os tempos da graduação e me deram uma base para me apoiar; amo muito vocês. Obrigada por me permitirem encher a casa com meus gatos e minha “cadelinha”.

Ao meu pai pelo incentivo e palavras de apoio.

Ao Prof. Cláudio Wageck Canal, pela oportunidade, orientação e auxílio com seu conhecimento.

Ao Prof. Vagner Ricardo Lunge, pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Aos amigos do Laboratório de Virologia que me ensinaram e apoiaram durante o mestrado, em especial a Luciane, Matheus, Carine e Ângela.

Aos estagiários e alunos especiais, Christian, Oscar, Jéssica, Tuani, Ana Cristina e Priscilla por me ajudarem com os experimentos. Sou muito grata a vocês.

À Helena que sempre esteve disponível me ensinando e ajudando na análise dos resultados, aprendi muito contigo, obrigada.

Aos colegas veterinários que auxiliaram o projeto enviando amostras, em especial aos residentes do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, à Eloiza (UEL) e ao Daniel (UFMT).

À Simbios Biotecnologia por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Biologia Molecular e kits para a realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos os amigos que estiveram comigo durante o mestrado, muito obrigado a todos pelo apoio!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore filogenética demonstrando a relação entre os diferentes morbilivírus, baseada no gene da fosfoproteína	12
Figura 2	Organização esquemática da estrutura da partícula viral e organização do genoma de um vírus do gênero <i>Morbillivirus</i>	13
Figura 3	Eletromicrografia de contraste negativo de partículas virais intactas do vírus parainfluenza 5 (gênero <i>Rubulavirus</i>), pertencente a família <i>Paramyxoviridae</i>	14
Figura 4	Ilustração esquemática do ciclo replicativo da família <i>Paramyxoviridae</i>	19
Figura 5	Ciclo natural do vírus da cinomose e transmissão acidental para espécies de vida livre	20
Figura 6	Patogenia da cinomose canina em relação aos dias após infecção	24
Figura 7	Cão com cinomose. A. Hiperqueratose de coxim. B. Hiperqueratose de focinho	25
Figura 8	Conjuntivite com secreção periocular em cão com cinomose	25
Figura 9	Marcada hipoplasia dentária em um cão com cinomose	26
Figura 10	Teste de imunofluorescência para CDV em esfregaço conjuntival de cão	29
Figura 11	Células Vero infectadas pelo CDV com inclusões intracitoplasmáticas e intranucleares e sincício	30
Figura 12	Foco da replicação viral revelado por imunofluorescência em células Vero infectadas pelo CDV	31

RESUMO

O vírus da cinomose canina (CDV) é classificado no gênero *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae* e é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças virais de canídeos domésticos. A cinomose ocorre em todo o mundo e produz alta mortalidade em populações imunologicamente *naïve*. Apesar de encontrar-se bem controlada pela vacinação, casos de cinomose ocorrem esporadicamente tanto em cães vacinados quanto em não vacinados. Uma das causas suspeitas desta falha vacinal é a grande variabilidade genética entre cepas de CDV. O objetivo deste trabalho foi detectar e analisar a variabilidade genética do CDV circulante no País. Foram coletados 386 suabes retais de cães em diversas regiões do Brasil, dos quais se detectaram 155 positivos através de uma RT-nested-PCR de um fragmento do gene do nucleocapsídeo. Destes, 23 foram selecionados para amplificação parcial do gene da hemaglutinina, sequenciamento e análise filogenética. A grande maioria das sequências obtidas agrupou no genótipo América do Sul-I, que inclui isolados da Argentina e do Uruguai, com exceção de uma amostra similar à cepa vacinal Rockborn. A análise filogenética sugere a presença de pelo menos sete subgenótipos do genótipo América do Sul-I circulando neste continente. O grupo América do Sul-II é formado somente por isolados da Argentina. Além disso, propõe-se que este grupo e os clados Rockborn-*like* e Europa Selvagem sejam denominados subgenótipos dentro de um genótipo único.

Palavras-chave: cão, cinomose, genótipo, América do Sul, diagnóstico

ABSTRACT

Canine distemper virus (CDV) is classified in the genus Morbillivirus within the family Paramyxoviridae and is the etiologic agent of one of the most important viral diseases of domestic Canidea. It occurs worldwide and produces high mortality in immunologically naïve populations. Despite being well controlled by vaccination, cases of canine distemper occur sporadically in vaccinated and unvaccinated dogs. One of the suspected causes of this vaccine failure is the great genetic variability between strains of CDV. The objective of this study was to detect and analyze the genetic variability of CDV circulating in our country. Rectal swabs were collected from 386 dogs in various regions of Brazil, of which 155 were found positive by a nested RT-PCR of a fragment of the nucleocapsid gene. Of these, 23 were selected for partial amplification of the hemagglutinin gene, sequencing and phylogenetic analysis. The vast majority of sequences obtained grouped in genotype South America-I, which includes isolates from Argentina and Uruguay, with the exception of a sample similar to the vaccine strain Rockborn. Phylogenetic analysis suggests the presence of at least seven subgenotypes belonging to South America-I genotype, circulating in this continent. The group South America-II consists only of isolates from Argentina. Furthermore, it is proposed that this group and clades Rockborn-like and Europe Wildlife are denominated subgenotypes within a single genotype.

Keywords: dog, canine distemper, genotype, South America, diagnosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Histórico	11
2.2	Caracterização do vírus, genoma e replicação	11
2.3	Epidemiologia	19
2.4	Patogenia e sinais clínicos	22
2.5	Diagnóstico	28
2.6	Genotipagem	32
2.7	Controle	33
3	ARTIGO CIENTÍFICO	37
4	DISCUSSÃO	71
5	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (CDV), gênero *Morbillivirus* é um dos principais agentes virais na população canina, além de infectar diversas outras espécies de carnívoros. Em cães, a infecção acomete principalmente animais jovens, causando sinais respiratórios, digestivos e neurológicos. Está entre as principais causas de mortalidade, principalmente em filhotes não vacinados.

A partir da década de 60, quando foram produzidas as primeiras vacinas anti-CDV, houve grande redução do seu impacto na população canina. Em países desenvolvidos a cinomose está bem controlada pela vacinação, no entanto, casos ocorrem esporadicamente, tanto em animais vacinados quanto em não vacinados, e a gama de hospedeiros suscetíveis à infecção continua se expandindo.

Os sinais clínicos da cinomose, por ser uma afecção multissistêmica, são por vezes inespecíficos, sendo facilmente confundidos com outros agentes patogênicos. O diagnóstico laboratorial baseado em exame hematológico e sorológico muitas vezes não é conclusivo. A histopatologia possibilita o diagnóstico definitivo através da observação de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos, mas o resultado negativo não exclui a infecção.

Técnicas como a RT-PCR permitem a detecção do genoma viral com alta sensibilidade e especificidade, e estão se tornando exames de rotina. A análise filogenética do gene da hemaglutinina, o mais variável entre os morbilivírus, permite a classificação de cepas em genótipos, os quais se agrupam em relação à distribuição geográfica, independente da espécie do hospedeiro infectado.

O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção e análise filogenética das cepas do vírus da cinomose canina circulantes no Brasil, coletadas de cães de diversas cidades do País, apresentando ou não sinais sugestivos de cinomose, para comparação com amostras representativas e de referência, tanto vacinais quanto de campo e de diversas espécies animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

Estudos filogenéticos indicam que o vírus do sarampo e o vírus da peste bovina divergiram durante os séculos XI e XII. A divergência do vírus da cinomose canina parece ter ocorrido mais recentemente, com o primeiro caso descrito em 1905 por Henri Carré, que, então, mostrou que o agente infeccioso era ultrafiltrável. Assim, inicialmente, a cinomose foi denominada Doença de Carré. Sabe-se agora que o vírus afeta todas as populações de cães domésticos e muitas espécies de animais selvagens. O vírus contribuiu para a quase extinção de furões-de-patas-negras e para a extinção do tigre da Tasmânia e uma espécie de cão selvagem africano (MURPHY, 2012).

A cinomose é uma doença febril aguda altamente contagiosa que é conhecida desde, pelo menos, 1760. Edward Jenner descreveu pela primeira vez o curso e as características clínicas da doença em 1809. É hoje comparativamente rara em cães domésticos em muitos países desenvolvidos, sendo bem controlada pela vacinação. Os casos clínicos que ocorrem em países desenvolvidos invariavelmente estão ligados a cães não vacinados ou incompletamente vacinados, especialmente aqueles que vivem em abrigos ou centros de adoção (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

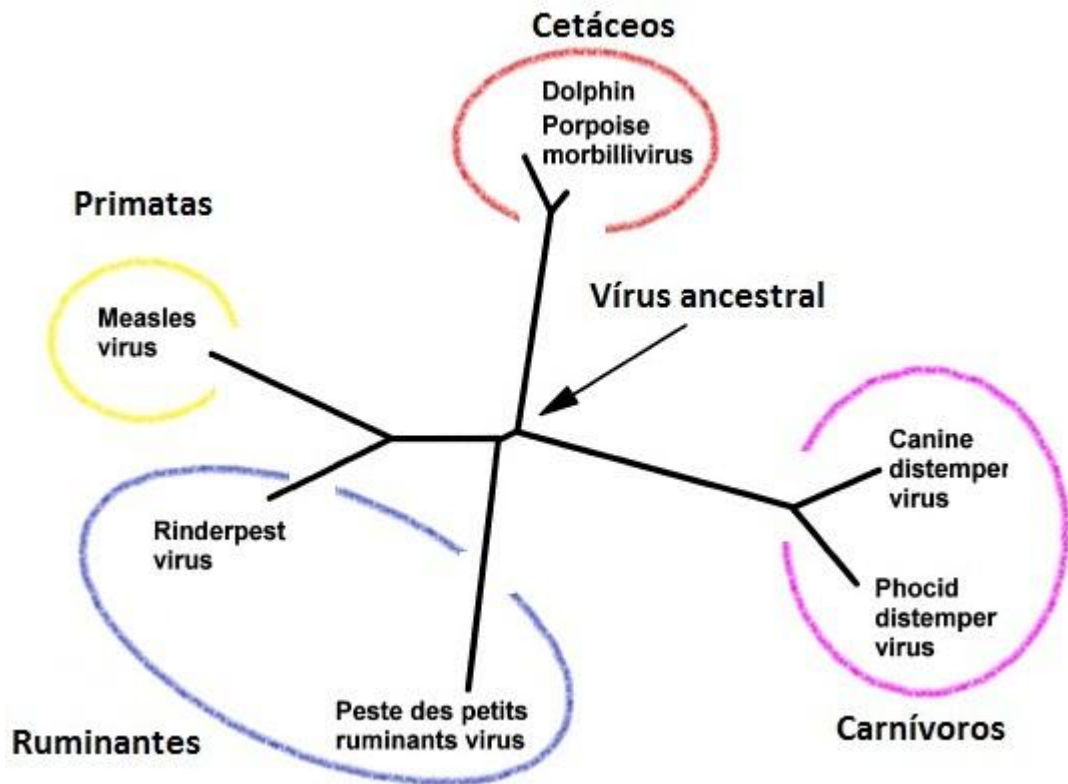
O primeiro projeto importante sobre o vírus da cinomose canina foi desenvolvido no Instituto Nacional para Pesquisa Médica de Mill Hill (NIMR), devido a sua semelhança com doenças humanas, tais como sarampo e gripe, no momento em que havia grandes surtos de sarampo e a pandemia de gripe de 1918. Contribuições de proprietários de cães permitiram que o patologista Patrick Laidlaw e o Médico Veterinário George Dunkin confirmassem o trabalho de Carré e, em 1929, desenvolveram a primeira vacina, utilizando tecidos de um cão infectado, os quais foram macerados, filtrados e tratados quimicamente, gerando uma vacina inativada (MURPHY, 2012).

2.2 Caracterização do vírus, genoma e replicação

O vírus da cinomose canina (CDV) é classificado como um membro do gênero *Morbillivirus*, juntamente com o vírus do sarampo (MV), vírus da peste bovina (RPV), vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV), morbilivírus dos cetáceos (CeMV) e vírus da cinomose focina (PDV), ordem *Mononegavirales*, da família *Paramyxoviridae*,

subfamília *Paramyxovirinae* (KING *et al.*, 2011). O CDV e o PDV são os morbilivírus mais relacionados, e é provável que o PDV tenha derivado do CDV (Figura 1) (BARRETT, 1999).

Figura 1. Árvore filogenética demonstrando a relação entre os diferentes morbilivírus, baseada no gene da fosfoproteína. Adaptado de Barrett (1999).

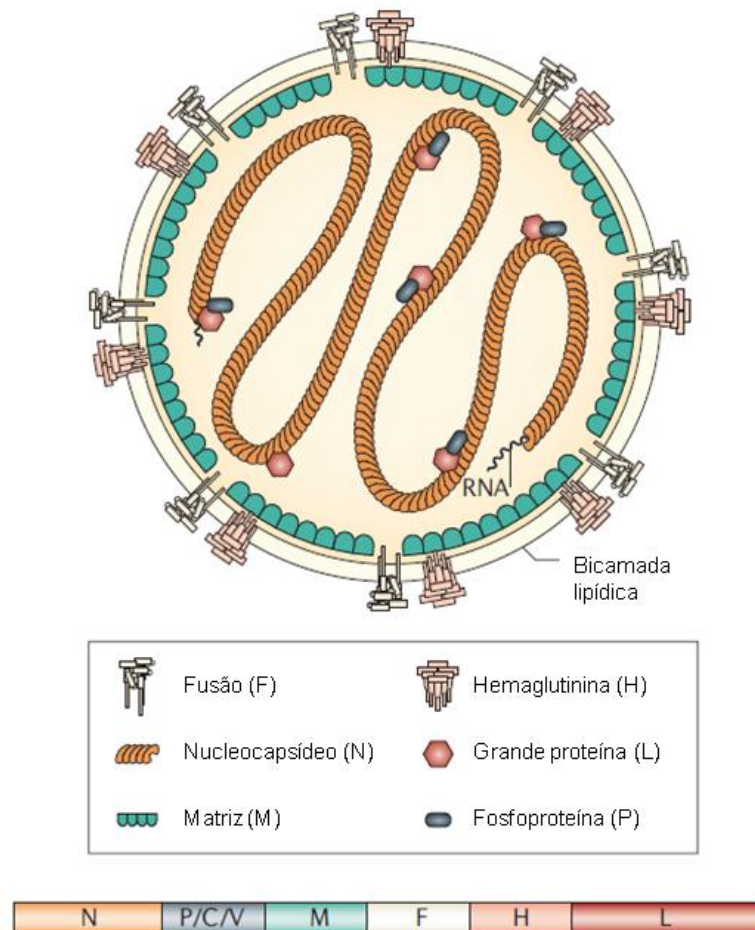


Por ser um vírus envelopado, o CDV é inativado por solventes lipídicos como clorofórmio e éter. Também é inativado por formalina, fenol, agentes oxidantes e soluções de hipoclorito (APPEL; GIBBS; MARTINS, 1981). É sensível a pH ácido e ao aquecimento a 56°C por 30 minutos. Os vírions são extremamente lábeis, mas permanecem viáveis a temperaturas de -50°C ou menos por muitos meses, porém episódios de congelamento e descongelamento podem inativar a infectividade. Os vírions apresentam uma densidade de 1,18 a 1,23 g/mL, determinada por centrifugação em gradiente de sacarose (ARNS *et al.*, 2012).

O genoma dos morbilivírus é constituído por uma cadeia de RNA de fita simples de polaridade negativa, não segmentada, de aproximadamente 15,9 kb. Possui seis genes que codificam oito proteínas virais, duas não estruturais, C e V, e seis proteínas estruturais: a proteína do nucleocapsídeo (NC), a fosfoproteína (P), a proteína da matriz

(M), a proteína de fusão (F), a hemaglutinina (H) e a grande proteína (L). O gene P gera três proteínas através da presença de fases de leitura sobrepostas. Das proteínas estruturais, três estão associadas ao nucleocapsídeo (a proteína do nucleocapsídeo, a fosfoproteína e a grande proteína) e três proteínas estão associadas à membrana (a proteína da matriz proteica não glicosilada, e duas proteínas de envelope glicosiladas - a proteína de fusão e a hemaglutinina) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; RIMA, 1983). Por possuir polaridade negativa, o genoma desnudo não é infeccioso quando introduzido em células permissivas (ARNS *et al.*, 2012). A Figura 2 apresenta uma representação esquemática da estrutura e genoma de um morbilivírus.

Figura 2. Organização esquemática da estrutura da partícula viral e organização do genoma de um vírus do gênero *Morbillivirus*. Adaptado de Moss & Griffin (2006).

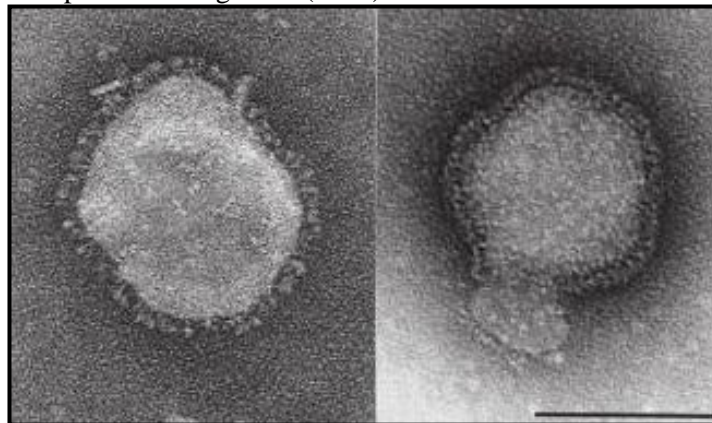


As partículas víricas são envelopadas, aproximadamente esféricas ou pleomórficas, com 150 a 300 nm de diâmetro. Partículas filamentosas são relativamente frequentes e podem ter entre 1.000 e 10.000 nm de extensão. Nos vírions intactos, a única estrutura visível por microscopia eletrônica (ME) é o envelope, com 7 a 15 nm de

espessura, recoberto por projeções de 8 a 20 nm de extensão, constituídas pelas glicoproteínas de superfície (APPEL, 1987). A Figura 3 apresenta uma fotografia de ME de vírus dessa família.

O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal, apresenta entre 13 e 18 nm de diâmetro por 600 a 1.000 nm de extensão. É formado por um complexo que inclui o genoma RNA, conjugado com aproximadamente 2.500 cópias da proteína NC, ao qual estão associadas 300 cópias da proteína P e 50 moléculas da proteína L. Além das glicoproteínas do envelope e das proteínas do nucleocapsídeo, os vírions contêm múltiplas cópias da proteína da matriz que preenchem o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope (ARNS *et al.*, 2012).

Figura 3. Eletromicrografia de contraste negativo de partículas virais intactas do vírus parainfluenza 5 (gênero *Rubulavirus*), pertencente a família *Paramyxoviridae*. A barra representa 10 nm. Adaptado de King *et al.* (2011).



As espículas do envelope são compostas por duas glicoproteínas, a proteína de fusão e a hemaglutinina. Ambas têm papéis importantes no patogenicidade das infecções. A glicoproteína H é responsável pela ligação aos receptores, enquanto a F medeia a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira. A fusão iniciada pela proteína F não é dependente de um ambiente com pH baixo (APPEL, 1987; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A função primária da proteína hemaglutinina é a ligação aos receptores celulares do hospedeiro. O principal receptor identificado é o CD150 (também conhecido como SLAM - molécula de ativação da sinalização de linfócitos). A SLAM é expressa em linfócitos T e B ativados e células apresentadoras de antígeno (MOSS; GRIFFIN, 2006). No entanto, as células epiteliais e neurais também são afetadas pelo CDV *in vivo*. Recentemente, foi sugerido que nectina-4 também está envolvida na virulência, como

receptora em células epiteliais (PRATAKPIRIYA *et al.*, 2012). Outra molécula que está envolvida na infecção de células em cultivo é a CD9, uma proteína transmembrana que facilita a infecção (LÖFFLER *et al.*, 1997; SCHMID *et al.*, 2000).

A proteína H interage com a F para mediar a fixação e fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira, permitindo a entrada do vírus na célula (MOSS; GRIFFIN, 2006). Possui atividade de hemaglutinação, a qual é utilizada na identificação de isolados e também em diagnóstico (VON MESSLING *et al.*, 2001).

A maior variação antigênica é encontrada na proteína H (BLIXENKRONE-MØLLER *et al.*, 1993), a qual pode variar cerca de 10% entre os isolados (HAAS *et al.*, 1997; HASHIMOTO; UNE; MOCHIZUKI, 2001; VON MESSLING *et al.*, 2001). Por este motivo, tem sido o foco primário de estudos epidemiológicos moleculares sobre CDV (MURPHY *et al.*, 1999). A sequência deduzida da proteína H mostra uma identidade de 36% com o vírus da peste bovina e com o vírus do sarampo. As identidades de nucleotídeos são mais elevadas (52% com RPV e 53% com MV) (CURRAN; CLARKE; RIMA, 1991).

A proteína de fusão é sintetizada como um precursor inativo (F0) que tem de ser ativado por clivagem proteolítica pelas proteases celulares. Os peptídeos clivados (F1 e F2) permanecem em estreita proximidade em virtude da ligação por pontes dissulfeto. A natureza específica do processo de clivagem e as características da proteína diferem entre os diferentes gêneros de paramixovírus. A clivagem do precursor é essencial para a infectividade e é um fator determinante da patogenicidade (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Esta glicoproteína é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular, permitindo a penetração do nucleocapsídeo na célula hospedeira. A clivagem ocorre nos estágios finais do ciclo replicativo, no interior de vesículas do complexo de Golgi, durante o transporte das proteínas virais para a membrana plasmática. Cepas que clivam a F0 com mais eficiência tendem a ser mais virulentas, em contraste com cepas deficientes na clivagem (ARNS *et al.*, 2012). Appel *et al.* (1984) propôs que a proteína F do MV seria a principal responsável pela proteção cruzada em cães.

A proteína do nucleocapsídeo é abundante nos vírions e se associa intimamente ao genoma viral, formando o nucleocapsídeo, sendo responsável pela proteção do genoma contra a digestão por nucleases. Essa proteína permanece associada com o genoma mesmo durante a transcrição e replicação. A proteína NC também participa da morfogênese das novas partículas virais, pela interação com a proteína M. A

concentração intracelular de proteína NC parece ser o principal fator que controla a transição entre transcrição (no início da infecção) e replicação do genoma (em etapas tardias do ciclo replicativo). Aproximadamente 80% da sequência da proteína NC é muito conservada entre os paramixovírus (ARNS *et al.*, 2012).

A proteína de matriz é a proteína mais abundante no vírion, preenchendo o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope. Ela interage com o envelope lipídico, as caudas citoplasmáticas das proteínas F e H, e a ribonucleoproteína (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Essa interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana da célula hospedeira é muito importante durante o processo de morfogênese, maturação e brotamento de novas partículas (ARNS *et al.*, 2012). A proteína M também está implicada no controle do nível de síntese de RNA (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A proteína L é a menos abundante dos vírions (aproximadamente 50 cópias por vírion) e representa a subunidade catalítica da RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp). A sequência de nucleotídeos do gene da proteína L é muito conservada entre os membros de uma mesma subfamília (ARNS *et al.*, 2012).

A fosfoproteína é um componente essencial do complexo replicase. Embora toda a atividade catalítica da transcriptase viral seja atribuída à proteína L, esta somente se liga ao complexo ribonucleoproteína (RNA:N) na presença da proteína P. O sítio de ligação da proteína P ao complexo RNA:N é relativamente conservado entre os membros da subfamília *Paramyxovirinae*. Um mecanismo, conhecido como edição de RNA, permite que várias proteínas diferentes sejam produzidas a partir do gene P; no caso dos morbilivírus, são produzidas as proteínas V e C (ARNS *et al.*, 2012). A proteína P regula a transcrição, a replicação e a eficiência com que a nucleoproteína se insere e monta os nucleocapsídeos. A proteína M liga ribonucleoproteínas com proteínas do envelope durante a montagem do vírion (MOSS; GRIFFIN, 2006). Juntamente com a proteína NC, a proteína P forma agregados citoplasmáticos conhecidos como corpúsculos de inclusão nas células infectadas (ARNS *et al.*, 2012).

As proteínas adicionais, V e C, são formadas pela alteração da fase de leitura do mRNA do gene P, resultando em uma sequência diferente de aminoácidos. Essas proteínas, embora não essenciais à replicação viral, auxiliam na sobrevivência do vírus *in vitro* e são importantes determinantes da virulência. Uma regulação da síntese do RNA genômico viral também é exercida pela proteína C. As proteínas V e C também possuem participação na evasão da resposta imune inata pelo vírus (ARNS *et al.*, 2012).

Com relação às estratégias de replicação, os paramixovírus são agrupados na classe V, conforme a classificação de Baltimore. Em cultivos celulares o ciclo replicativo geralmente se completa em 14 a 30 horas, mas pode ter menor duração (ARNS *et al.*, 2012).

Os paramixovírus replicam no citoplasma de células infectadas, sem a necessidade de funções nucleares. As proteínas de ligação reconhecem receptores compatíveis na superfície de células hospedeiras. O receptor CD150 é encontrado em linfócitos, macrófagos e células dendríticas, o que explica o forte tropismo destes vírus por estes tipos de células. Após a ligação, a proteína F serve de mediadora para a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, a um pH fisiológico (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Para que a proteína precursora F0 exerça sua função fusogênica, é necessária a sua prévia clivagem em F1 e F2 por proteases celulares. Células infectadas podem se fundir, formando sincícios ou células gigantes multinucleadas características, que podem produzir necrose tecidual *in vivo*. Por não requerer pH baixo para a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula, são chamados vírus pH independentes (ARNS *et al.*, 2012).

O nucleocapsídeo liberado no citoplasma deve permanecer intacto, com todas as suas três proteínas associadas (NC, P e L), sendo necessárias para a transcrição inicial do genoma RNA viral pela RdRp; a síntese de mRNA é iniciada na ausência de síntese proteica. O complexo polimerase inicia a síntese de RNA em um único local na extremidade 3' do RNA genômico, e o genoma é transcrito progressivamente em seis mRNAs por um mecanismo de síntese sequencial interrompida, devido a presença de uma região intergênica que pode desintegrar o complexo polimerase. Este processo de terminação-reiniciação controla a síntese do mRNA de tal modo que a quantidade de mRNAs individuais diminui com o aumento da distância da extremidade 3' do genoma, gerando um gradiente de mRNA policistrônico (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Os mRNAs contêm 5' *cap* na extremidade e são poliadenilados, sendo traduzidos em proteínas pelos ribossomos celulares (ARNS *et al.*, 2012).

As etapas de transcrição e tradução prosseguem até que ocorra o acúmulo das proteínas virais no citoplasma das células infectadas (ARNS *et al.*, 2012). Quando a concentração da proteína NC atinge um nível crítico, uma sequência promotora na extremidade 3' do genoma é transcrita e a proteína NC se liga à cadeia de RNA nascente. Isto altera a polimerase e a faz ignorar sinais de terminação, ou seja, o complexo polimerase cessa a produção de mRNAs individuais e uma fita antígenômica

completa é produzida (sentido positivo). Em seguida, esta fita antigenômica complexada com a proteína NC serve como molde para a produção de RNA genômico de sentido negativo. Então incia-se uma segunda fase de síntese de mRNA a partir do RNA genômico produzido, amplificando assim drasticamente a síntese de proteínas virais (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). As proteínas NC e P parecem desempenhar um papel importante nessa transição entre transcrição e replicação, fazendo com que o complexo replicase não reconheça os sinais de terminação existentes nas regiões intergênicas (ARNS *et al.*, 2012).

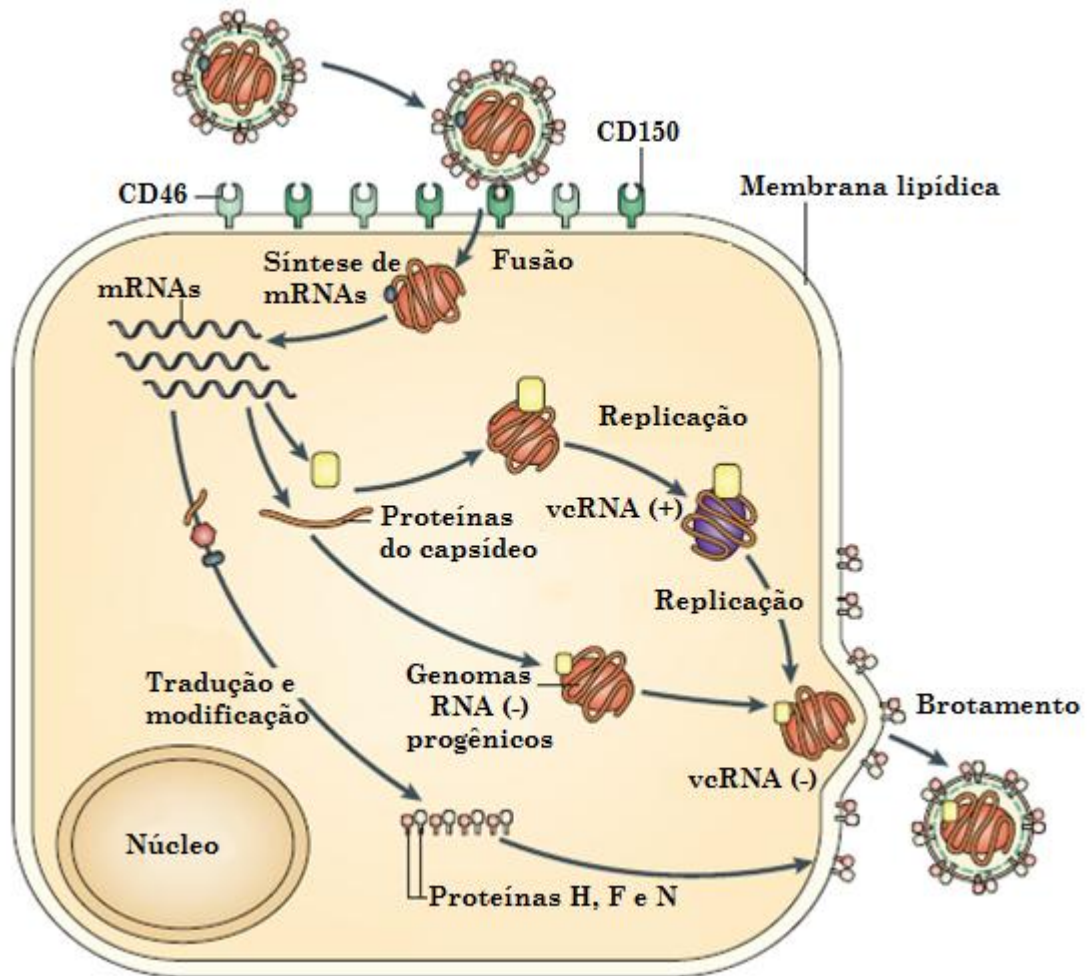
À medida que são sintetizadas, as moléculas de RNA de sentido negativo se associam com moléculas da proteína NC, formando nucleocapsídeos helicoidais flexíveis que, posteriormente, se associam com as proteínas P e L. A montagem dos nucleocapsídeos ocorre concomitantemente com a síntese do RNA antigenômico e genômico, e os RNAs virais somente são encontrados como nucleocapsídeos no interior da célula (ARNS *et al.*, 2012).

A primeira etapa da morfogênese envolve a associação entre as proteínas NC e o genoma, seguido da adição do complexo L-P. A segunda etapa da montagem ocorre na membrana plasmática. As glicoproteínas H e F são produzidas no retículo endoplasmático e modificadas no complexo de Golgi, e transportadas em vesículas trans-Golgi até a membrana plasmática, onde são inseridas. Durante este transporte, a proteína precursora F0 é clivada em F1 e F2 (ARNS *et al.*, 2012).

As etapas seguintes da morfogênese são pouco conhecidas. Acredita-se que múltiplas cópias da proteína M sejam transportadas até a membrana plasmática, onde se associariam com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas ali inseridas. Os nucleocapsídeos, então, interagiriam - através da proteína NC - com as moléculas da proteína M, resultando na sua protrusão e brotamento na membrana plasmática e no egresso dos vírions. A Figura 4 representa um esquema do ciclo replicativo dos paramixovírus (ARNS *et al.*, 2012).

Resumidamente, a maturação do vírion envolve: (1) a incorporação de glicoproteínas virais em fragmentos da membrana plasmática da célula hospedeira; (2) a associação da proteína de matriz e de outras proteínas não glicosiladas com esta membrana da célula hospedeira alterada; (3) o alinhamento do nucleocapsídeo sob a proteína M, (4) a formação e liberação via brotação dos vírions maduros (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

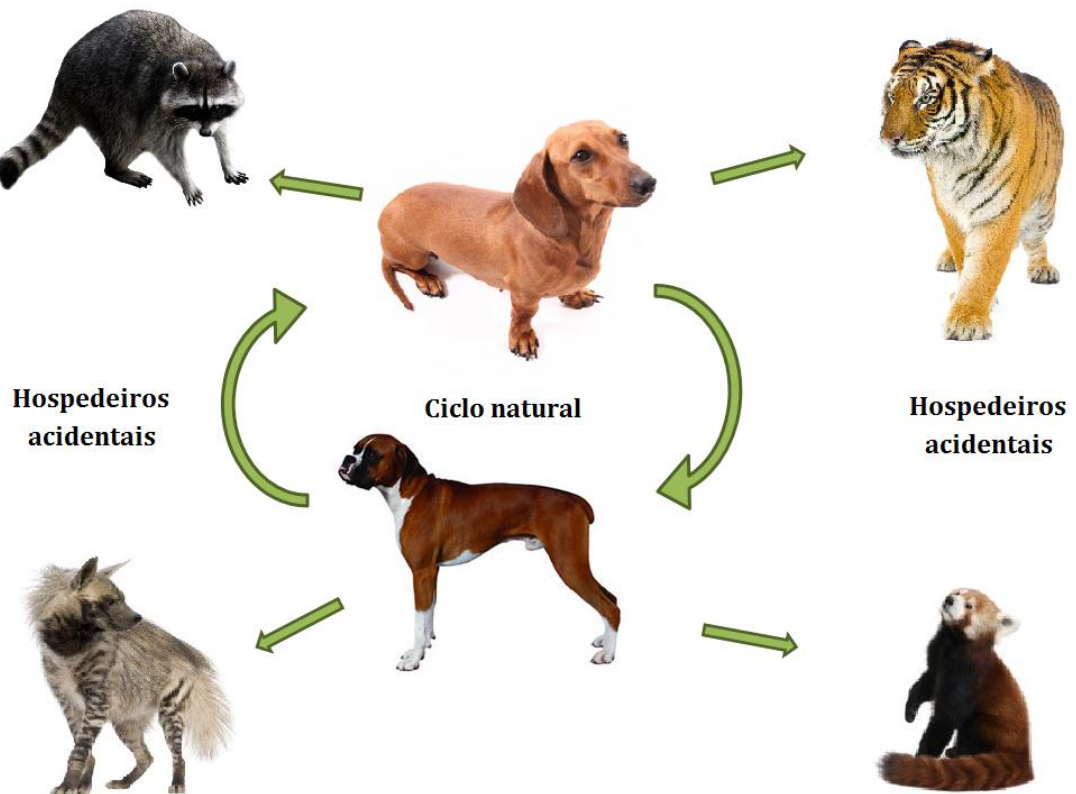
Figura 4. Ilustração esquemática do ciclo replicativo do vírus do sarampo. Adaptado de Moss; Griffin (2006).



2.3 Epidemiologia

Além de cães domésticos, a cinomose afeta várias outras espécies de carnívoros, incluindo demais espécies da família *Canidae* e membros das famílias *Ailuridae*, *Hyaenidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, *Viverridae*, *Felidae* e primatas não-humanos (*Cercopithecidae*), entretanto, o cão representa o principal reservatório para o vírus e serve como fonte de infecção para carnívoros selvagens (VAN MOLL *et al.*, 1995). O espectro de hospedeiros do CDV tem aumentado desde a década de 1990, quando diversas espécies de animais selvagens foram infectadas e morreram em zoológicos nos Estados Unidos da América e em parques na África (CARPENTER *et al.*, 1998). No entanto, a sua maior importância na rotina veterinária está relacionada com as manifestações clínicas em cães domésticos (ARNS *et al.*, 2012). A Figura 5 demonstra a distribuição do vírus entre cães e hospedeiros selvagens.

Figura 5. Ciclo natural do vírus da cinomose e transmissão acidental para espécies de vida livre.



A suscetibilidade ao CDV varia entre espécies de canídeos não domésticos, embora muitas vezes os sinais clínicos sejam semelhantes aos descritos em cães. Infecções naturais ou doenças induzidas por vacinação foram documentadas em cães caçadores africanos (*Lycaon pictus*) (ALEXANDER *et al.*, 1996), dingos australianos (*Canis dingo*) (ARMSTRONG; ANTHONY, 1942), cachorro-vinagre da América do Sul (*Speothos venaticus*) (MCINNES; BURROUGHS; DUNCAN, 1992), lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (THOMAS-BAKER, 1985), hienas (*Crocuta crocuta*) (HAAS *et al.*, 1996), otócions (*Otocyon megalotis*) (ROELKE-PARKER *et al.*, 1996), guaxinins (*Nyctereutes procyonoides*) (CHA *et al.*, 2012), coiotes (*Canis latrans*) (GESE *et al.*, 1997), raposas (*Vulpes vulpes*) (ZHAO *et al.*, 2010), raposas cinzentas (*Urocyon cinereargenteus*) (DAVIDSON *et al.*, 1992) e lobos selvagens (*Canis lupus*) (MÜLLER *et al.*, 2011).

Além dos canídeos, o CDV causa doença importante em várias espécies de felídeos, incluindo leopardos (*Panthera pardus*), tigres (*Panthera tigris*), onças-pintadas (*Panthera onca*) (APPEL *et al.*, 1994) e lince-ibérico (*Lynx pardinus*) (MELI *et al.*, 2010). Em 1994, uma epidemia de CDV foi responsável pela morte de 30% dos leões

(*Panthera leo*) no ecossistema do Serengeti, na África (ROELKE-PARKER *et al.*, 1996). Durante essa epidemia, espécies de outras famílias também foram infectadas, incluindo hienas (HAAS *et al.*, 1996) e otócions (ROELKE-PARKER *et al.*, 1996), assim como populações de cães domésticos nos arredores (CLEAVELAND *et al.*, 2000). Infecção experimental com CDV em gatos domésticos, assim como em suínos, resulta em soroconversão, mas não em doença clínica (APPEL *et al.*, 1974).

Entre os mustelídeos, foram relatados casos em martas (*Martes foina*) (ZHAO *et al.*, 2010), sendo um agente especialmente nocivo em furões domésticos (*Mustela putorius*) e furões-de-patas-negras (*Mustela nigripes*), altamente suscetíveis à infecção natural com taxa de mortalidade de 100% (DAVIDSON, 1986). Vários ursídeos e ailurídeos são suscetíveis ao CDV, mas o maior número de relatos é em pandas vermelhos (*Ailurus fulgens*), suscetíveis à infecção induzida por vacinação (BUSH *et al.*, 1976), e pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*) (QUI; MAINKA, 1993). Entre os viverrídeos, duas espécies são suscetíveis: o binturong (*Arctictis binturong*) (HUR *et al.*, 1999) e a civeta mascarada (*Paguma larvata*) (MACHIDA *et al.*, 1992).

Alguns surtos também foram relatados em primatas não-humanos na Ásia, incluindo macacos rhesus (*Macaca mulatta*) (SUN *et al.*, 2010) e macacos caranguejeiros (*Macaca fascicularis*) (SAKAI *et al.*, 2013).

No Brasil, o CDV foi detectado também em uma raposa do campo (*Lycalopex vetulus*) no Estado de São Paulo (MEGID *et al.*, 2010). Seis onças-pintadas e um puma (*Puma concolor*) foram soropositivos em outro estudo realizado em São Paulo (NAVA *et al.*, 2008).

Além disso, as populações de animais sensíveis parecem ainda estar se expandindo. Nos últimos anos, morbilivírus intimamente relacionados foram detectados em surtos de doenças fatais em focas (KENNEDY *et al.*, 2000) e catetos (*Tayassu tajacu*) (APPEL; REGGIARDO; SUMMERS, 1991).

A cinomose acomete cães de qualquer idade, raça e sexo (TIPOLD; VANDEVELDE; JAGGY, 1992), mas tem maior predileção por filhotes entre três e seis meses de idade, não vacinados, após terem perdido os anticorpos maternos (CHAPPUIS, 1995; GREENE; APPEL, 2006; HEADLEY; GRAÇA, 2000). Em um estudo conduzido por Figuera *et al* (2008), foram avaliadas as principais causas de morte ou razões para eutanásia de cães necropsiados na Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense, sendo a cinomose a doença mais diagnosticada em adultos (12,3%) e a segunda doença mais prevalente em filhotes (17,2%), com baixa frequência

(2,8%) em animais idosos. Headley & Graça (2000) apontam que raças dolicocefálicas aparentemente são mais afetadas que as braquicefálicas.

A morbidade e a mortalidade variam muito entre carnívoros. A taxa de letalidade de furões domésticos (*Mustela putorius furo*) se aproxima de 100% (DAVIDSON, 1986), enquanto que 50-70% de cães domésticos infectados podem permanecer portadores assintomáticos (GREENE; APPEL, 2006).

2.4 Patogenia e sinais clínicos

A rota principal de infecção por CDV é através da inalação de aerossóis com partículas virais (APPEL; SUMMERS, 1999). Os cães com infecção aguda sistêmica excretam o vírus em suas fezes, saliva, urina e exudatos conjuntivais e nasais, independentemente de apresentarem sinais clínicos ou não, a partir do 5º dia após a infecção, ou seja, antes do aparecimento de sinais clínicos, e continua, por vezes, por semanas (APPEL; GILLESPIE, 1972; APPEL, 1987).

Após infecção respiratória por aerossol, o vírus se replica primariamente dentro de macrófagos nos tecidos do trato respiratório superior, e, em seguida, rapidamente se espalha para as amígdalas e gânglios linfáticos regionais. O CDV infecta as células que expressam o receptor SLAM, que está presente nos timócitos, linfócitos ativados, macrófagos e células dendríticas. O tropismo do vírus da cinomose canina para estas células explica o seu grave efeito imunodepressor, o que provavelmente reflete a destruição das células imunes vírus-mediadas, bem como a indução de várias citocinas (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Os linfócitos T são mais afetados que os linfócitos B (IWATSUKI *et al.*, 1995). A diminuição de linfócitos T CD4+ é rápida e persiste durante várias semanas. Como a percentagem de linfócitos infectados é baixa, os mecanismos de imunodepressão não são claros (KERDILES *et al.*, 2006).

Diversas variações na duração e gravidade da doença têm sido relatadas em animais experimentalmente e naturalmente infectados. A virulência da cepa viral, as condições ambientais, a idade do animal e a resistência individual de cada hospedeiro contribuem para essa variação (APPEL, 1987).

Após a multiplicação em linfonodos regionais, o vírus entra na corrente sanguínea, onde circula dentro de linfócitos B e T infectados. A viremia primária é síncrona com o primeiro pico de febre, e o vírus, então, dissemina-se para todos os tecidos linfóides (baço, timo, linfonodos, medula óssea), incluindo tecidos linfóides

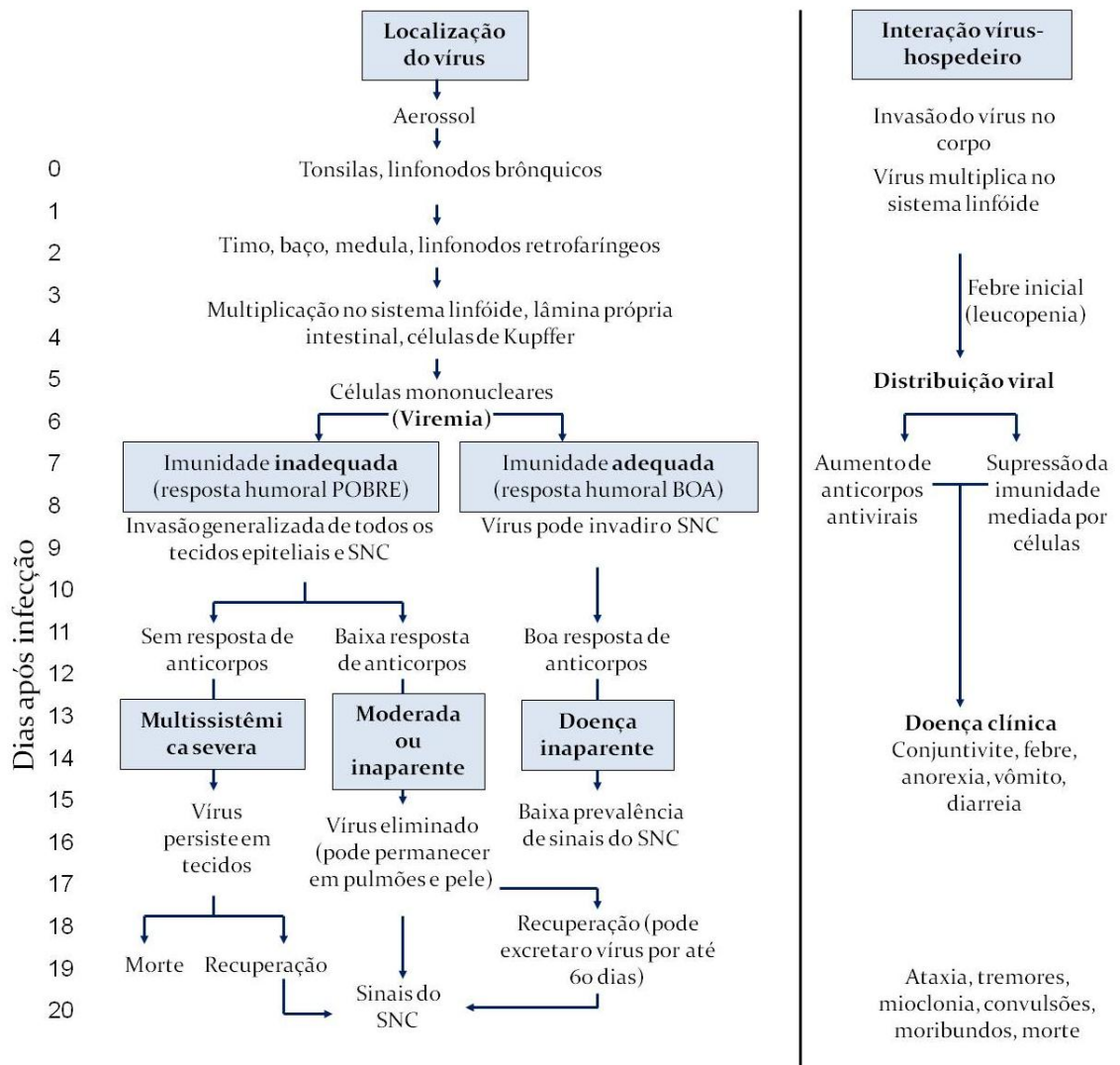
associados ao intestino e macrófagos de tecidos, tais como as células de Kupffer no fígado (APPEL, 1987; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A progressão da infecção depende da resposta imune do animal. A maioria dos cães desenvolve uma resposta imune celular e humoral eficaz e não manifesta sinais clínicos da doença. Os cães infectados que não conseguem montar uma resposta eficiente acabam por apresentar a doença em diferentes níveis de gravidade, em até três semanas após a infecção (ARNS *et al.*, 2012).

Víriões formados nos tecidos linfóides são carregados por células mononucleares no sangue durante a viremia secundária que coincide com o segundo pico de febre (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Na forma aguda, os sintomas mais comuns de CDV ocorrem após uma incubação de três a seis dias com esta febre bifásica atingindo picos superiores a 41°C, sendo o segundo pico associado com outros sinais clínicos. No decorrer da infecção podem ser observados anorexia, descarga nasal, conjuntivite, tosse, vômitos, diarreia e depressão (MURPHY *et al.*, 1999). Na forma amena da doença pode ser observado somente decréscimo no apetite, febre e infecção do trato respiratório superior. Descarga ocular serosa bilateral pode tornar-se mucopurulenta, com tosse e respiração difícil, sinais que são inespecíficos (APPEL, 1987). Uma proporção significativa (estimada em 50%) das infecções são subclínicas ou tão leves que não necessitam de tratamento (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). A forma aguda da doença é mais comum em animais com idade entre quatro e seis meses, pela perda da imunidade passiva (ARNS *et al.*, 2012).

Do 7° ao 14° dia de infecção, dependendo da cepa viral, o cão inicia uma vigorosa resposta imune humoral e celular e pode se recuperar. Entretanto, aqueles animais com uma resposta imune deficiente morrem na forma aguda ou subclínica da doença ou tornam-se persistentemente infectados. Nestes animais imunodeprimidos, o CDV se dissemina pelo epitélio dos tratos digestivo, respiratório e urogenital, glândulas exócrinas, endócrinas e pelo sistema nervoso central (SNC) (APPEL, 1987). O CDV provoca a fusão de células adjacentes, permitindo que o genoma viral se espalhe de forma contígua de célula para célula, sem nunca serem expostos a mediadores imunológicos do hospedeiro. Isso pode não ajudar o vírus em matéria de transmissão entre hospedeiros, mas é importante na propagação viral, especialmente no interior do SNC (MURPHY *et al.*, 1999). A Figura 6 representa esquematicamente a evolução da infecção em relação ao tempo.

Figura 6. Patogenia da cinomose canina em relação aos dias após infecção. Adaptado de MacLachlan; Dubovi (2011).



Sinais que ocorrem neste momento incluem anorexia, inflamação do trato respiratório superior com descarga nasal serosa ou mucopurulenta, conjuntivite e depressão. Alguns cães apresentam principalmente sinais respiratórios, enquanto outros desenvolvem sinais gastrointestinais. Os sinais respiratórios refletem inflamação e lesão do trato respiratório superior e grandes vias aéreas, causando uma tosse produtiva; em seguida se desenvolvem bronquite e pneumonia intersticial. O envolvimento gastrointestinal é manifesto por vômitos e diarreia aquosa. A duração da doença varia, muitas vezes dependendo das complicações causadas pelas infecções bacterianas secundárias (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; MURPHY *et al.*, 1999). Os sinais clínicos e lesões respiratórias, gastrointestinais, dermatológicas, oftalmológicas e

neurológicas podem ocorrer sequencialmente, simultaneamente ou isoladamente (GREENE; APPEL, 2006).

A infecção do epitélio celular do pulmão, pele e vesícula urinária ocorre relativamente no final da infecção, através de um mecanismo de ligação independente de CD150 que pode ser seguida da interação direta com linfócitos infectados (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Recentemente, relatou-se que o receptor que facilita a entrada do vírus nestas células é a nectina-4 (PRATAKPIRIYA *et al.*, 2012).

A infecção na pele produz pústulas abdominais e, no tegumento, resulta em hiperqueratose do focinho e das almofadas plantares, causada pela infecção das células basais do epitélio. Conjuntivite purulenta é outro achado frequente (ARNS *et al.*, 2012; GREENE; APPEL, 2006; MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Estes sinais estão demonstrados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Cão com cinomose. A. Hiperqueratose de coxim. B. Hiperqueratose de focinho. Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).

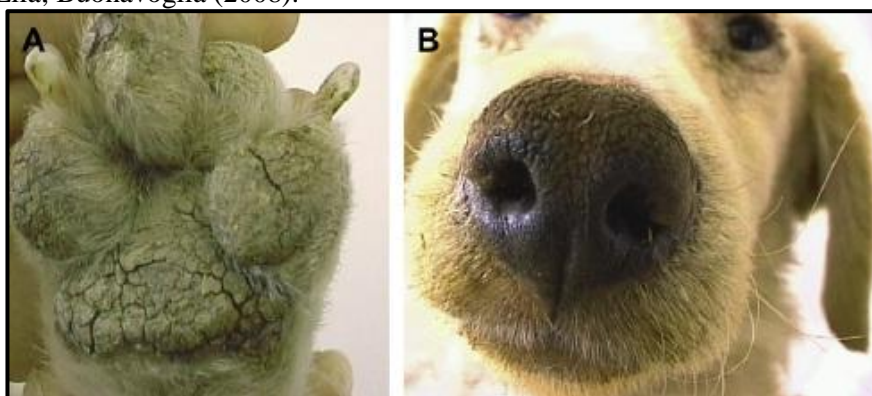


Figura 8. Conjuntivite com secreção periocular em cão com cinomose. Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).



Manchas marrom-escuras circundando o esmalte dos dentes de animais infectados quando filhotes também são achados relativamente frequentes. Essa alteração

é resultante da infecção das células que produzem o esmalte e é denominada hipoplasia do esmalte (Figura 9) (ARNS *et al.*, 2012).

A infecção de cadelas prenhes pode resultar em transmissão transplacentária do vírus, podendo causar abortos, natimortos, nascimento de filhotes fracos e imunodeprimidos (ARNS *et al.*, 2012).

Figura 9. Marcada hipoplasia dentária em um cão como sequela de cinomose. Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).



A infecção do SNC ocorre relativamente tarde no curso da infecção e apenas ocorre nos cães que não desenvolvem resposta imune protetora de forma suficientemente rápida para impedir essa propagação (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Ela pode surgir após qualquer das manifestações agudas ou pode aparecer após a infecção subclínica (MURPHY *et al.*, 1999). Infecção de neurônios e células gliais também ocorre por meio do receptor nectina4, independente de CD150 (PRATAKPIRIYA *et al.*, 2012). O CDV invade o parênquima cerebral através das vias de líquido cefalorraquidiano (HIGGINS *et al.*, 1982), ou atravessa a barreira hematoencefálica por meio de células linfóides infectadas. No SNC, se replica em neurônios e em células gliais, resultando em lesões na substância cinzenta e na substância branca, com desmielinização. Em muitos casos, a desmielinização é o achado mais importante (SUMMERS; GREISEN; APPEL, 1979). Quando a resposta imune é benéfica para o hospedeiro, o CDV é removido dos tecidos. No entanto, estudos mostraram que o CDV pode persistir em áreas da substância branca do SNC no exterior das lesões inflamatórias desmielinizantes. Parece, portanto, que uma doença crônica progressiva desenvolve-se e a resposta imune intratecal mantém-se atrasada em relação à replicação viral. Assim, a persistência do vírus é a chave para a patogênese da lesão crônica. A persistência do CDV pode estar relacionada com infecção restrita e propagação não

citólítica (BOLLO *et al.*, 1986). Informações a respeito da persistência do CDV no SNC são conflitantes, alguns autores afirmam que não tem significado epidemiológico, pois nenhum vírus infeccioso é gerado a partir deste local; neste caso a infecção teria um efeito grave sobre o cão, mas não teria importância para a sobrevivência do vírus (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Outros autores afirmam que a persistência do CDV se torna uma fonte contínua de antígenos virais, mantendo as reações danosas aos tecidos (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 1995, VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005).

Em formas crônicas da doença, as lesões desmielinizantes são atribuídas a uma reação inflamatória induzida por uma resposta imune específica contra o CDV e pela persistência da infecção nos tecidos. Experimentos *in vitro* sugerem que a desmielinização inflamatória crônica é atribuída a um mecanismo resultante de interações entre macrófagos e complexos de vírus-anticorpo (GRIOT *et al.*, 1989).

O resultado da infecção do SNC é bastante variável e depende da idade do animal, do estresse e, possivelmente, de fatores genéticos. Todas as infecções por CDV podem passar através de uma sequência de eventos a partir da entrada no SNC, passando pela infecção da substância cinzenta e infecção da substância branca, sendo o ponto final determinado, em grande parte, pela cepa viral. Estas diferenças biológicas entre as cepas podem ser um reflexo de variações no tropismo viral por células do SNC. Em um estudo experimental, a cepa Snyder Hill causou uma polioencefalomielite e as cepas A75-17 e R 252 causaram doença desmielinizante (SUMMERS; GREISEN; APPEL, 1984).

As manifestações neurológicas ocorrem entre uma a três semanas após o início dos sinais agudos, mas podem também aparecer depois de infecção subclínica. Convulsões, sinais cerebelares e vestibulares, paraparesia ou tetraparesia com ataxia sensitiva e mioclonias são comuns. Sinais neurológicos, agudos ou crônicos, geralmente são progressivos, o que leva a um prognóstico moderado e cães que sobrevivem podem ter seqüelas permanentes no SNC (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Finalmente, há uma forma tardia da doença em cães idosos, chamada de encefalite do cão idoso, pouco descrita, em que há uma perda lenta e progressiva das funções neurológicas (HEADLEY *et al.*, 2009; VANDEVELDE *et al.*, 1980). Esta manifestação tardia pode ocorrer em cães sem prévio histórico de doença aguda ou subaguda. Sinais neurológicos incluem (1) espasmos localizados de um músculo ou grupo de músculos, tais como nos membros ou músculos faciais; (2) paresia ou

paralisia, muitas vezes a partir dos membros posteriores, e ataxia seguida por paresia e paralisia ascendente, e (3) convulsões caracterizadas por salivação e movimentos de mastigação. As crises podem se tornar mais frequentes e graves e o cão pode então cair sobre o seu lado, com micção e defecação involuntárias (MURPHY *et al.*, 1999).

2.5 Diagnóstico

O CDV deve ser considerado no diagnóstico de qualquer doença febril de filhotes com sinais multissistêmicos. Deve ser realizado diagnóstico diferencial de tosse dos canis, parvovirose e coronavirose, infecções bacterianas, doença neurológica devido à toxoplasmose, neosporose, criptococose, intoxicação por chumbo e raiva (TILLEY; SMITH, 2008).

O diagnóstico de cinomose inicialmente é baseado em sinais clínicos, mas se torna complicado pela utilização de vacinas vivas modificadas. Casos de cinomose podem ocorrer em filhotes recentemente vacinados, gerando o questionamento se os sinais são causados pelo vírus vacinal ou por uma cepa de campo. Esta questão não é satisfatoriamente resolvida com o padrão sorológico, isolamento viral ou testes de detecção de antígeno (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). A ocorrência de lesão cutânea, doença respiratória e digestiva em cães jovens, associadas ou não com sinais neurológicos, são sugestivos de cinomose (ARNS *et al.*, 2012).

No exame hematológico, observa-se principalmente linfopenia durante a fase inicial da infecção (TILLEY; SMITH, 2008). Esta, às vezes, aparece combinada com leucopenia ou leucocitose com desvio à esquerda, anemia, monocitose e, raramente, trombocitopenia (GREENE; APPEL, 2006).

O exame do fluido cerebrospinal pode ser muito útil para o diagnóstico. No entanto, durante a fase aguda desmielinizante da doença, as reações inflamatórias são escassas e o teor de proteína e de células do fluido pode ser normal (BOLLO *et al.*, 1986).

A sorologia tem valor limitado para o diagnóstico, pois testes positivos não diferenciam a infecção natural da imunidade adquirida pela vacinação; além disso, o cão pode ir a óbito antes de produzir anticorpos neutralizantes. Anticorpos contra o vírus presentes no líquido cefalorraquidiano são sugestivos, mas não conclusivos, de cinomose em casos de encefalite (TILLEY; SMITH, 2008). Testes como ELISA, soroneutralização e imunofluorescência (IF) indireta podem detectar altos títulos de anticorpos contra o CDV vários meses após vacinação ou após infecção subclínica ou

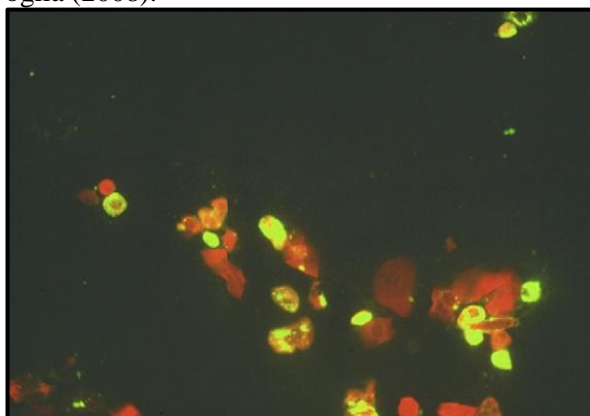
clínica. Imunoglobulina M específica para o CDV pode ser detectada por ELISA por pelos menos três meses após a infecção e é utilizada como marcador de infecção recente (BLIXENKRONE-MOLLER *et al.*, 1991).

Diversos testes laboratoriais estão disponíveis para confirmação da infecção. A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) está se tornando um método padrão. Esta técnica, assim como a RT-PCR em tempo real (ELIA *et al.*, 2006), são sensíveis e específicas. Um protocolo de RT-PCR com sondas específicas permite a caracterização dos vários genótipos de CDV e distinção entre cepas vacinais e de campo (MARTELLA *et al.*, 2007), mas essas reações especializadas não estão rotineiramente disponíveis (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Podem ser utilizados como amostras suabes conjuntivais, sangue (células mononucleares), urina e qualquer amostra de tecido que inclua epitélio (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Suabes retais e fezes também podem ser utilizados para realização destes testes (V. R. LUNGE, comunicação pessoal).

Diagnóstico rápido pode ser obtido através de um *kit* comercial de ensaio imunocromatográfico para detecção da proteína F do CDV, disponível em clínicas e consultórios, nos quais amostras de suabe conjuntival, urina, saliva, soro, plasma ou líquido podem ser utilizados (CURTI *et al.*, 2012).

A IF em esfregaço conjuntival, nasal e vaginal (Figura 10) não é muito sensível e pode detectar os antígenos somente três semanas após início da infecção, quando o vírus está presente nas células epiteliais (APPEL, 1987). No entanto, a IF, assim como a coloração por imunoperoxidase, pode detectar antígenos virais em locais onde não se observam corpúsculos de inclusão (TILLEY; SMITH, 2008).

Figura 10. Teste de imunofluorescência para CDV em esfregaço conjuntival de cão. Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).



O isolamento do vírus em cultivo celular a partir de amostras clínicas como suabe conjuntival, capa flogística e fragmentos de baço ou pulmão pode ser realizado, porém é fastidioso e não se aplica ao diagnóstico de rotina, pois o CDV necessita de adaptação aos cultivos celulares por várias passagens (ARNS *et al.*, 2012). No entanto, pode ser obtido com co-cultivo de linfócitos de animais suspeitos com linhagens celulares que expressam a molécula CD150, o que elimina a necessidade de usar células mononucleares ativadas para o isolamento de cepas de campo. Após o isolamento inicial, o vírus pode então ser adaptado para crescer em células primárias de pulmão canino ou linhagens convencionais, incluindo Madin-Darby Canine Kidney (MDCK), Vero e fibroblastos de embrião de galinha. Uma das características da replicação do vírus em cultivo é a formação de sincícios (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011), o que está ilustrado na Figura 11. A capacidade de formação de sincício é determinada principalmente pela proteína H, ou seja, este feito varia conforme a cepa viral (VON MESSLING *et al.*, 2001). Desprendimento do tapete e inclusões intracitoplasmáticas (Figura 11) também são observados no cultivo (BRUM; WEIBLEN, 2012). Células B95a, uma linhagem de células linfóides de sagui, também podem ser utilizadas para isolamento, gerando marcado efeito citopático. Nestas células observa-se formação de sincícios e/ou arredondamento, dependendo da cepa utilizada (KAI *et al.*, 1993). A confirmação da infecção em cultivo celular pode ser realizada por imunofluorescência (Figura 12) e imunocitoquímica (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008).

Figura 11. Células Vero infectadas pelo CDV com inclusões intracitoplasmáticas e intranucleares (setas finas) e sincício (seta larga). Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).

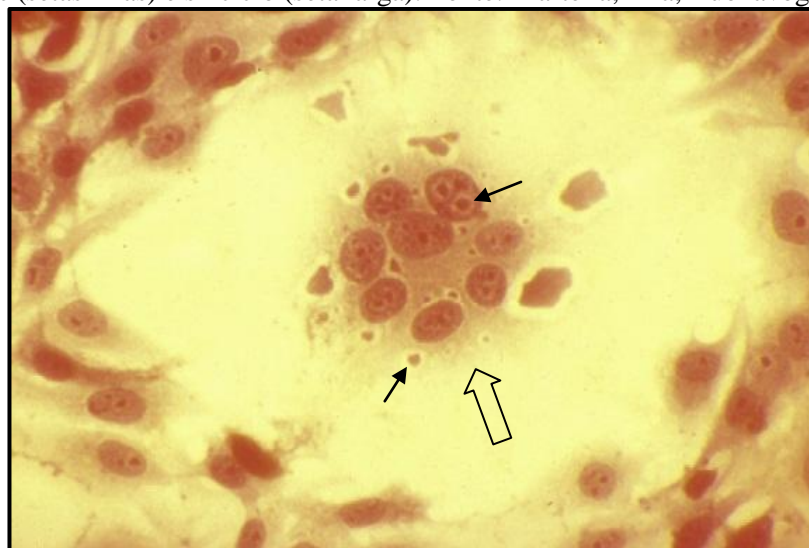
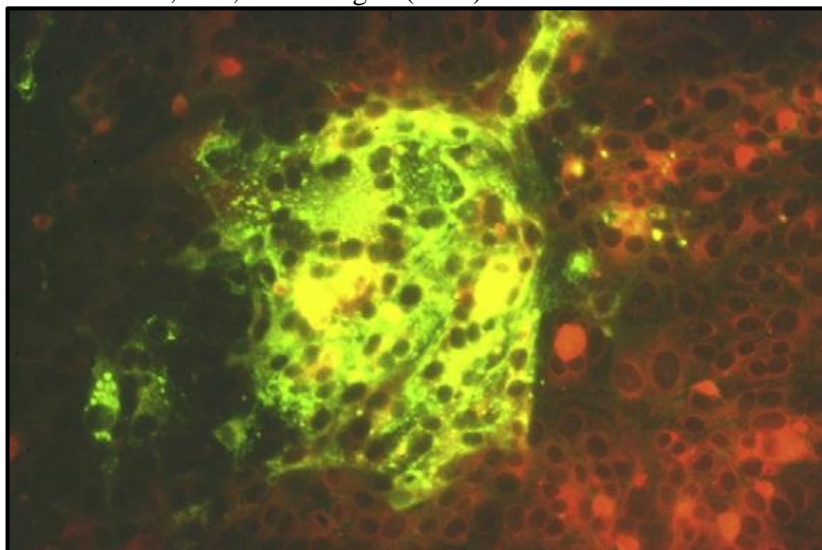


Figura 12. Foco da replicação viral revelado por imunofluorescência em células Vero infectadas pelo CDV. Fonte: Martella; Elia; Buonavoglia (2008).



Na necropsia, observam-se pulmões tipicamente edematosos e microscopicamente, se observa broncopneumonia com necrose do revestimento epitelial das pequenas vias aéreas e espessamento das paredes alveolares. A broncopneumonia é comum em consequência de imunodepressão vírus-mediada e inibição do mecanismo normal de depuração pulmonar (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Lesões no SNC são variáveis, as quais podem incluir desmielinização, necrose neuronal, gliose, e meningoencefalomielite não supurativa (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). No encéfalo, a desmielinização é a lesão proeminente (VANDEVELDE; ZURBRIGGEN, 2005), correspondendo a aproximadamente 89% dos casos em estudos realizados por Sonne *et al.* (2009) e Silva *et al.* (2007).

O estômago é um dos órgãos de eleição para o diagnóstico histológico e imunohistoquímico da cinomose por usualmente conter um grande número de corpúsculos de inclusão viral (DUCATELLE; COUSSEMENT; HOORENS, 1980; SONNE *et al.*, 2009).

A infecção em recém-nascidos pode resultar em falha de desenvolvimento do esmalte dos dentes permanentes (odontodistrofia) e osteosclerose metafisária dos ossos longos (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A replicação do vírus resulta na formação de estruturas com morfologia mais ou menos definidas, as quais são denominadas genericamente de corpúsculos de inclusão e são formadas pelo acúmulo de complexos de transcrição e replicação, produtos intermediários da replicação, proteínas estruturais e não-estruturais, capsídeos, nucleocapsídeos e vírions em determinados locais da célula. A localização dos

corpúsculos de inclusão reflete o local de replicação do vírus, assim, os corpúsculos de Lenz se localizam no citoplasma e são característicos da infecção pelo CDV (FLORES, 2012). Corpúsculos de inclusão citoplasmáticos eosinofílicos estão presentes no epitélio celular da pele, brônquios, trato intestinal, trato urinário, vias biliares, glândulas salivares, glândulas supra-renais, SNC, gânglios linfáticos e baço (GREENE; APPEL, 2006; PANDHER *et al.*, 2006). Os corpúsculos de inclusão nas células gliais e neurônios frequentemente se encontram intranucleares (TILLEY; SMITH, 2008).

As lesões macroscópicas incluem pulmões não colapsados, avermelhados e edemaciados (LÓPEZ, 2007), enterite catarral ou hemorrágica (LAN *et al.*, 2006) e atrofia parcial ou completa do timo (APPEL, 1987).

A confirmação do diagnóstico é feita pela demonstração de corpúsculos de inclusão e/ou de antígenos em esfregaços conjuntivais ou células da capa flogística. No entanto, estes testes são frequentemente negativos. É importante salientar que testes negativos não são excludentes. Corpúsculos de inclusão e demonstração de antígenos em tecidos *post mortem* são mais confiáveis (APPEL; SUMMERS, 1995). 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 linfonodo, língua e cerebelo são órgãos mais adequados para a detecção do antígeno viral da cinomose canina por imunohistoquímica ou imunofluorescência (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; SONNE *et al.*, 2009). Pulmão, baço, vesícula urinária, rim, intestino também podem ser testados (DUCATELLE; COUSSEMENT; HOORENS, 1980; KOUTINAS *et al.*, 2002). *Antemortem*, estas técnicas também podem ser aplicadas em esfregaços conjuntivais e biópsias de pele (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.6 Genotipagem

A maior variação antigênica é encontrada na proteína H (BLIXENKRONE-MØLLER *et al.*, 1993), podendo variar cerca de 10% entre cepas. Por esta razão, tem sido o principal foco de estudos moleculares epidemiológicos anteriores sobre CDV (MURPHY *et al.*, 1999).

As cepas de CDV agrupam em, pelo menos, 11 grandes linhagens genéticas designadas como América-I (cepas vacinais clássicas), América-II, Ásia-I, Ásia-II, Europa, Europa Selvagem, Ártico, África do Sul, América do Sul-I e América do Sul-II, de acordo com a sua distribuição geográfica (HAAS *et al.*, 1997; MOCHIZUKI *et al.*, 1999; MARTELLA *et al.*, 2006; WOMA *et al.*, 2010; PANZERA *et al.*, 2012). Cepas

Rockborn-*like* também foram descritas, formando um grupo que geralmente ocupa uma posição intermediária entre os genótipos Ásia-I e Europa Selvagem, dependendo da análise e dos autores que conduziram a pesquisa (MARTELLA *et al.*, 2011).

2.7 Controle

A única medida possível e eficaz para controlar a doença é a imunização, por meio de vacinação, ainda que as medidas de higiene clássicas devam ser aplicadas em paralelo. A imunização ativa tornou-se muito bem sucedida após vacinas vivas atenuadas se tornaram disponíveis (CHAPPUIS, 1995). No entanto, o controle desse vírus se torna difícil devido à cobertura vacinal ser insuficiente em diversas regiões menos desenvolvidas, fato relacionado com o tamanho da população canina, o pequeno volume de doses vacinais vendidas anualmente nessas regiões e o grande número de cães não domiciliados, resultando em muitos animais suscetíveis; e pelo grande número de espécies selvagens que podem ser infectadas (ARNS *et al.*, 2012).

Em meados de 1950, vacinas vivas modificadas contra CDV (ML-CDV) tornaram-se disponíveis e foram largamente utilizadas na década de 60 com uma drástica redução do impacto do CDV na população canina (HARDER; OSTERHAUS, 1997).

Diversos tipos de vacinas ML-CDV ainda são comumente utilizadas. Uma cepa foi oriunda de Onderstepoort, África do Sul, de 1956, e era inicialmente produzida em embrião de galinha e após em cultivo de células de galinha. A cepa Rockborn, relatada pela primeira vez na Suécia, da qual foram realizadas diversas passagens seriadas em cultivos de células de rim canino (ROCKBORN, 1959). Ambas têm suas vantagens e desvantagens. As cepas adaptadas em cultivo de células caninas induzem imunidade em praticamente 100% dos cães susceptíveis. No entanto, em casos raros, podem induzir uma encefalite pós-vacinal entre sete a 14 dias pós-vacinação (HARTLEY, 1974).

Outras cepas comumente utilizadas na produção de vacinas são a Snyder Hill, a qual foi isolada pela primeira vez em 1956 e tem sido mantida em laboratório desde essa época; na sua forma patogênica provocava doença grave levando a um estado moribundo 14 dias após inoculação experimental; a cepa Cornell A75-17, isolada a partir de um cão com encefalite, em 1975; cães infectados experimentalmente com esta cepa desenvolviam leve depressão e perda de peso, deterioravam-se mais lentamente e doença terminal grave não era evidente até a quarta semana após a exposição; alguns cães se tornavam relativamente estáveis ou se recuperavam. Outra cepa, a R252 é

menos patogênica, e a grande maioria dos animais experimentalmente infectados se recuperava. Cães infectados com as cepas A75-17 e R252 na sua forma patogênica mostram uma variedade de alterações neurológicas (SUMMERS; GREISEN; APPEL, 1984). Estas cepas se tornaram atenuadas após passagens seriadas em cultivos celulares, sendo assim utilizadas em formulações vacinais. A cepa Lederle, muito utilizada em formulações vacinais, cultivada em fibroblasto de embrião de galinha, é filogeneticamente relacionada à cepa Snyder Hill (HARDER; OSTERHAUS, 1997).

Desde a década de 1960, no entanto, são utilizadas as mesmas cepas vacinais e vários relatos e estudos epidemiológicos revelaram um aumento na incidência da infecção por CDV tanto em cães vacinados como em não vacinados (BLIXENKRONE-MØLLER *et al.*, 1993; CALDERÓN *et al.*, 2007; EK-KOMMONEN *et al.*, 1997; HAAS *et al.*, 1997; JÓZWIK; FRYMUS, 2002; SIMON-MARTÍNEZ *et al.*, 2008). Além disso, vários trabalhos evidenciam diferenças antigênicas entre as cepas vacinais e selvagens (HASHIMOTO; UNE; MOCHIZUKI, 2001; SI *et al.*, 2010).

No Japão, um estudo demonstrou que mais de 66% dos animais que desenvolveram infecção por CDV eram vacinados e tinham altos títulos de anticorpos frente à amostra vacinal (GEMMA *et al.*, 1996). A partir da constatação destes casos, alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de demonstrar as diferenças antigênicas entre as cepas selvagens e vacinais. Alguns trabalhos evidenciaram as diferenças antigênicas entre a proteína hemaglutinina das amostras vacinais e selvagens através da RT-PCR e RFLP (HASHIMOTO; UNE; MOCHIZUKI, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1999; SI *et al.*, 2010) e de análise com anticorpos monoclonais (IWATSUKI *et al.*, 2000). Também foi analisado o gene da fosfoproteína que, de maneira similar aos resultados dos trabalhos envolvendo o gene H, revelou uma similaridade relativamente baixa com as amostras vacinais de CDV (WAKASA *et al.*, 2000).

Vacinas vivas, contendo o vírus atenuado do sarampo, podem ser utilizadas com relativo sucesso, principalmente na primovacinação de filhotes. Essas vacinas tem a vantagem de não sofrer a interferência da imunidade passiva (CHALMERS; BAXENDALE, 1994).

Vacinas com vírus vivo modificado e vacinas recombinantes, utilizando um poxvírus aviário como vetor dos genes das proteínas H e F do CDV, são seguras e estão disponíveis comercialmente (ARNS *et al.*, 2012).

Recomenda-se a primovacinação aos 60 dias de idade, três reforços mensais e revacinação anual. Para filhotes oriundos de mães sabidamente não-imunizadas e

também em situações de risco (canis, colônias, pet shops), pode-se antecipar a primovacinação. Alguns estudos têm demonstrado que as revacinações poderiam ser realizadas em intervalos maiores que um ano, pois os cães vacinados apresentam títulos duradouros contra o vírus homólogo (ARNS *et al.*, 2012).

A imunidade celular é importante para a resposta imune protetora contra infecções por morbilivírus em geral (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). A sobrevivência do animal depende fundamentalmente do desenvolvimento de uma resposta imune celular efetiva. A resposta imune humoral também é importante, pois cães com títulos medianos de anticorpos (entre 16 e 64) parecem estar protegidos contra a doença aguda (ARNS *et al.*, 2012), ou seja, animais com qualquer título de anticorpo neutralizante são imunes à reinfecção e a imunidade, após infecções por morbilivírus, se mantém ao longo da vida (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Títulos de anticorpos inferiores a 16 não protegem os cães, porém interferem com o sucesso da vacinação. A imunidade passiva declina entre a 8ª e 14ª semanas de vida dos filhotes, deixando-os susceptíveis à infecção. Antes disso, a imunidade passiva pode comprometer o sucesso da vacinação, pela inativação do vírus vacinal pelos anticorpos (ARNS *et al.*, 2012).

Vacinas vivas atenuadas não devem ser usadas em outras espécies de canídeos. Reações adversas graves foram relatadas em outras espécies, incluindo pandas vermelhos e raposas. Vacinas inativadas foram utilizadas para imunizar animais de zoológico, no entanto, estas vacinas frequentemente têm baixa eficácia. A vacina recombinante contendo as proteínas H e F do CDV resolveu este dilema, já que oferece imunização segura e eficaz (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

A indução de encefalite após a vacinação com as vacinas vivas disponíveis está associada com a imunodepressão. Os sinais neurológicos geralmente ocorrem entre sete e 14 dias após a administração da vacina, porém o grau de imunodepressão e a presença de outras infecções podem agravar o quadro, tornando-o sistêmico. Deve-se evitar a vacinação de fêmeas lactantes em contato com seus filhotes não-imunizados, especialmente aquelas sem histórico de vacinação (ARNS *et al.*, 2012).

Além da vacinação, as pessoas envolvidas nos cuidados ambulatoriais com animais doentes devem utilizar medidas de biossegurança (luvas descartáveis, esterilização e descarte de fômites, higiene pessoal e do ambiente com desinfetantes), associadas com o isolamento dos animais, prevenindo a disseminação da enfermidade no ambiente residencial e hospitalar (ARNS *et al.*, 2012). O vírus é muito frágil e

suscetível a desinfetantes comuns. A desinfecção de instalações, no entanto, pode ser desafiadora (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

ARTIGO

Genotyping of canine distemper virus (CDV) strains circulating in Brazil

Genotyping of canine distemper virus (CDV) strains circulating in Brazil

Renata da Fontoura Budaszewski¹, Luciane Dubina Pinto¹, Matheus Nunes Weber¹,
Vagner Ricardo Lunge², Eloiza Teles Caldart³, Christian Diniz Beduschi Travassos
Alves¹, Oscar Fernando Ortiz Granados¹, Cláudio Wageck Canal^{1,*}

¹ Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9090, Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

² Laboratório de Diagnóstico Molecular, Universidade Luterana do Brasil, Av. Farroupilha, 8.001, prédio 22, 3 andar, São José, 92425-900, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil

³ Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445 Km 380, Jardim Alto da Colina, Londrina, 86051-980, Paraná, Brasil

*Corresponding author: Tel.: +55 51 33086926; fax: +55 51 33087305.

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C. W. Canal)

Abstract

Canine distemper virus (CDV) is classified in the genus *Morbillivirus* within the family *Paramyxoviridae* and is the etiologic agent of one of the most important viral diseases of domestic *Canidea*. It occurs worldwide and produces high morbidity and mortality in immunologically naïve populations. Considering the variability of the hemagglutinin (H) gene, wild-type strains of CDV cluster into genotypes according to their

geographical distribution. In this study, 155 positive samples were found by one-step nested-RT-PCR of the nucleocapsid gene in clinical specimens from Brazil. From these, 23 samples had the hemagglutinin gene partially sequenced to perform phylogenetic analysis. These sequences clustered in the South America-I genotype, which also includes isolates from Argentina and Uruguay, except for a sample similar to the Rockborn strain. Phylogenetic analysis suggests the presence of at least seven subgenotypes circulating in South America. Additionally, the South America-II group appears to be a subgenotype along with Rockborn-like and Europe Wildlife strains within a single genotype.

Keywords: canine distemper, genotype, South America, diagnosis

Introduction

Canine distemper virus (CDV) is the etiological agent of one of the most important viral diseases of wild and domestic *Canidae*. It occurs worldwide and produces high morbidity and mortality in immunologically naïve populations. CDV-infected dogs develops respiratory, gastrointestinal, dermatologic, ophthalmic and neurological disorders that may occur sequentially, simultaneously or separately (Greene and Appel, 2006). The CDV is classified in the genus *Morbillivirus* within the family *Paramyxoviridae* (King et al., 2011). The RNA encodes six structural proteins: two membrane glycoproteins, the fusion (F) and the hemagglutinin (H), the envelope-associated matrix (M) protein, the phosphoprotein (P), the large polymerase (L) and the nucleocapsid (NC) protein (Rima, 1983).

The highest antigenic variation is found in the H protein (Blixenkroner-Møller et al., 1993), that may vary by about 10%, and has often been used to assess genetic polymorphism in CDV isolates (Haas et al., 1997; Hashimoto et al., 2001; von Messling et al., 2001). For this reason it has been the primary focus of previous molecular epidemiological studies on CDV (Murphy et al., 1999).

Like measles virus, CDV is a monotypic virus as defined by polyclonal antisera and a single exposure to these viruses normally confers long-lasting immunity. In general, the introduction of live attenuated CDV vaccines in the 1950s and their extensive use have drastically reduced the incidence of canine distemper (CD) in dogs. However, CD outbreaks, in which previously immunized dogs become infected, have been observed (Ek-Kommonen et al., 1997; Jóźwik and Frymus, 2002; Simon-Martínez et al., 2008; Si et al., 2010). This raises the question of whether the vaccines currently used efficiently protect against present-day circulating wild-types. Furthermore, studies have shown antigenic differences between vaccine strains and wild-type isolates (Hashimoto et al., 2001; Si et al., 2010).

Considering the variability in the H gene, the strains of CDV cluster into at least 11 major genetic lineages designated as America-I (including classical vaccine strains), America-II, Asia-I, Asia-II, Europe, Europe Wildlife, Arctic, South Africa, South America-I and South America-II, according to their geographic spread (Haas et al., 1997; Mochizuki et al., 1999; Martella et al., 2006; Woma et al. 2010; Panzera et al., 2012). Rockborn-like strains were also described; this group usually occupies an intermediate position between the Asia-I and the Europe Wildlife genotypes (Martella et al., 2011). Since distemper is endemic in Brazil (Silva et al., 2007), investigations are being carried out by our group to study the genetic variability of CDV. A recent increase in CD has been detected in this country, including vaccinated dogs. In order to

characterize the strains and lineages of CDV involved in outbreaks, H gene sequences of selected CDV-positive field samples from the years 2008 to 2012 were amplified, sequenced and submitted for phylogenetic analysis.

Materials and methods

Samples

The study comprised a total of 386 rectal swab samples collected of dogs from April 2008 to June 2012. The samples were collected in seven Brazilian states, which were Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia and Mato Grosso. Samples were collected of dogs with or without clinical signs suggestive of CDV infection. Information on the animals, such as age, gender, breed, symptoms and vaccination status was recorded. Samples were diluted to 20% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). The solution was frozen and thawed three times and stored at – 80°C for further analysis.

RNA extraction

RNA was extracted from rectal swab suspensions using TRIzol LS Reagent® (Invitrogen, Carlsberg, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. The attenuated live vaccine Vanguard Plus® (Pfizer, New York, NY, USA) was used as positive control and ultrapure water and samples of rectal swabs from five adult healthy dogs were used as negative controls.

Primers

The primers used for amplification of fragments of NC and H genes were synthesized as described in previous reports with minor modifications (Frisk et al., 1999; Shin et al., 2004; Castilho et al., 2007). The NC primers were used for detection of positive samples, by a nested-RT-PCR. CDV-1F and CDV-2R were used for the first amplification, as CDV-3F and CDV-4R were used for the second amplification. For the phylogenetic analysis, partial H gene was amplified. For the first amplification, H2R and H2F primer pair was used. For the nested-PCR, inner primer pair CDVR10 and CDVF10 was used. The primers sequences are shown in Table 1.

Table 1. Oligonucleotide primers used in the PCR assays.

Primer	Sequence (5'-3')	Target	Reference
CDV-1F	ACTGCTCCTGATACTGC	NC	Castilho et al., 2007
CDV-2R	TTCAACACCRACYCCC	NC	Castilho et al., 2007
CDV-3F	ACAGRATTGCGYAGGACYTRT	NC	Frisk et al., 1999
CDV-4R	CARRATAACCATGTAYGGTGC	NC	Frisk et al., 1999
H2F	ARTRTGCTRACYKCTMTMTC	H	Shin et al., 2004
H3R	TCARGGWTTTKAACGRYYAC	H	Shin et al., 2004
CDVF10	TAYCATGAYAGYARTGGTTC	H	Shin et al., 2004
CDVR10	ARTYYTCRACACTGRTKGTG	H	Shin et al., 2004

One step RT-PCR followed by a nested-PCR for CDV detection

For CDV detection, one step RT-PCR for amplification of 480 bp of NC gene was performed, followed by a nested-PCR that amplified a 287 bp fragment (corresponding to positions 769–1055 of the Onderstepoort strain genome). Reactions were performed with the following conditions for the one step RT-PCR: 1 cycle at 37°C for 30 min and 35 cycles of denaturation at 94°C for 20 sec, annealing at 55°C for 40 sec and polymerization at 72°C for 1 min, for detection of positive samples. The second PCR assay (nested) was performed in the same equipment with the following steps: 1 cycle at 94°C for 3 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 20 sec, annealing at 59°C for 40 sec and polymerization at 72°C for 1 min, and a final extension cycle at 72°C for 5 min.

Nested RT-PCR for amplification of partial H gene

Amplification of a fragment of approximately 871 bp of the H gene (position 7991–8861 of the Onderstepoort strain) was performed with primers described by Shin et al. (2004) with minor modifications. Reverse transcription was carried out at 55°C for 60 min, followed by denaturation of the reverse transcriptase at 70°C for 15 min.

Amplification was conducted an initial denaturation at 94°C for 3 min followed by 35 cycles of 30 s for denaturation at 94°C, 30 s of primer annealing at 55°C, and 1 min of extension at 72°C, and 7 min of final extension at 72°C. To obtain PCR products suitable for phylogeny, the inner primer pair CDVF10 and CDVR10 was used to amplify in nested PCR the H gene, using Platinum® Taq DNA polymerase (Life Technologies, Foster City, CA, USA). The temperature cycling protocol consisted of an initial denaturation at 94°C for 3 min, 30 cycles of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of

primer annealing at 55°C, and 1 min of extension at 72°C, followed by 7 min of the final extension phase at 72°C.

Purification, DNA sequencing and phylogenetic analysis

Fragments of the H gene amplified using a nested-RT-PCR were purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Both DNA strands were sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer using a BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequence alignment was performed with MEGA5 (Tamura et al., 2011) software using CLUSTAL W. For phylogenetic analysis, amplified products and 56 reference and representative strains were used. MEGA5 (Tamura et al., 2011) was used for phylogeny inference according to the neighbor-joining criterion and the Tamura 3 parameter model. The robustness of the hypothesis was tested in 1000 non-parametric bootstrap analyses.

The number of base differences per sequence from between sequences was calculated to assess nucleotide identity. The analysis involved 76 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All ambiguous positions were removed for each sequence pair. There were a total of 700 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted using MEGA5 (Tamura et al., 2011).

Results

In the nested-RT-PCR for CDV detection, 40.26% (155/386) out of the 386 samples analyzed were positive (Table 1). From the 155 CDV-positive dogs, 37 (23.87%) were

asymptomatic, whereas 90 (58.06%) presented suggestive signs of CD. Among these, 59 had gastroenteritis, of which 20 were hemorrhagic; 21 dogs had respiratory symptoms such as nasal discharge, cough and sneeze; 23 presented ocular discharge; 12 had dermatological alterations such as nose and/or foot hyperkeratosis and abdominal pustule; and 26 dogs had neurological symptoms, such as myoclonus and seizure. 41 animals had only gastrointestinal symptoms; 11 had only neurological signs; three dogs had only respiratory symptoms; and 1 had only ocular/dermatological signs, each. From the CDV-positive dogs, 28 had no data on symptoms.

Regarding the immunization schedule of the positive dogs, 19 (12.2%) dogs had history of complete vaccination, 7 of them were asymptomatic, 11 had symptoms suggestive of CD, and one had no data on clinical signs; 15 (9.7%) animals had incomplete vaccination, which is thus considered when a dog up to 12 months didn't receive all the doses recommended for primary vaccination; 3 of them were asymptomatic and 12 had symptoms of CD. 76 (49%) had no vaccination history, 21 of them were asymptomatic and 29 had symptoms of CD. Of the CDV-positive dogs, 45 had no data on vaccination schedule.

From the positive animals, 45.8% (71/155) were aged less than 6 months, 18.7% (29/155) were between 7 and 12 months, and 21.3% (33/155) aged more than 12 months. Regarding breed, 87 were mongrel dogs and 51 were of different breeds.

From Rio Grande do Sul, 123 samples were positive, which were from the municipalities of Porto Alegre, Viamão, Cachoeirinha, Canoas, Caxias do Sul, Passo Fundo, Bagé, Glorinha, Gravataí, Pelotas and Santana do Livramento. The states of Santa Catarina (SC), Paraná (PR), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) and Mato Grosso (MT) had a total of 32 CDV-positive samples.

The NC positive samples were further screened by amplification of a fragment of the H gene. Primarily, samples to be sequenced were selected according to geographic region, however, probably due to mutations in the primer binding-sites of local circulating strains, it was not possible to amplify the H gene of all positive samples, thus it was decided to amplify as many samples as possible in different geographical regions. The nucleotide sequences of the amplicons were determined and deposited into the GenBank under the accession numbers: JX912956- JX912978. Phylogenetic analysis showed that most of the wild-type viruses from Brazil clustered with isolates from Uruguay and Argentina, separated from vaccine strains and other foreign strains, as part of the South America-I genotype (Figure 1). None of the samples from this study clustered with the South America-II genotype. The previously described lineages of CDV were clearly characterized. Local Bra-188/08 isolate (GenBank accession number JX912968) branches out of the root of the South American clade, closer to a Rockborn strain (GU810819.1), the N-CDV strain (FJ461702), to an isolate from a Lesser Panda (*Ailurus fulgens*) from China (AF178039) and an isolate from an American dog (AY964114).

Discussion

Canine distemper is one of the main viral diseases affecting dogs in Brazil (Figuera et al., 2008; Headley et al., 2012). There are recent reports of a reemergence and increased incidence of CDV on several continents, including South America (Calderón et al., 2007; Panzera et al., 2012; Rosa et al., 2012). In Brazil, epidemiological/prevalence studies have suggested that CD is endemic in urban canine populations, with indices of positive animals ranging from 6.1% in Belo Horizonte/MG (Gouveia et al., 1987) to

12.4% in Santa Maria/RS (Figuera et al., 2008), based on macroscopic lesions. Seroprevalence indices ranges from 27.3% in Santa Maria/RS (Dezengrini et al., 2007; Haas et al. 2008). Many animals are not vaccinated, mainly due to the economic situation of the owners, explaining the endemic situation of the virus in this region. In the present study, 23,9% of CDV-positive dogs were asymptomatic corroborating with previous works that estimated that 25% until 75% of the dogs susceptible to CD are sub-clinically infected and are transmitting the virus without any clinical sign of disease (Greene and Appel, 2006). The application of RT-PCR to CDV diagnosis has been successfully used in different types of samples collected from animals clinically suspected of infection (Frisk et al., 1999; Kim et al., 2001; Rzezutka and Mizak, 2002). It is a specific, practical and rapid tool in CDV diagnosis *ante mortem* considering the non-specific clinical signs of the disease. Hence, the use of detections tools is useful to detect CDV animals apart their clinical status.

In our study, 12.2% out of the positive-CDV dogs had historic of vaccination. The control of CD is only achieved by the use of vaccination (Chappuis, 1995). However, many outbreaks of the disease in vaccinated dogs have been documented (Blixenkrone-Møller et al., 1993; Ek-Kommonen et al., 1997; Haas et al., 1997; Iwatsuki et al., 2000; Józwik and Frymus, 2002; Lan et al., 2006; Calderón et al., 2007; Simon-Martínez et al., 2008;). Speculations put forth to explain these cases are varied but often include vaccine failures, reversion of attenuated CDV vaccine strains to virulence (Appel, 1978), the emergence of new strains that are sufficiently divergent to evade immune protection elicited by the vaccines used, the quality of the vaccine and a poor immune response (Lan et al., 2006). Vaccine failures are mostly attributable to incorrect vaccinal protocols or to vaccine alteration after improper storage. Immunization of immune-compromised dogs, due to presence of internal parasites, stress, or concomitant diseases

can interfere in the efficacy of the vaccine or result in reversion to virulence (Appel, 1978). Also, the storage and handling of the vaccine can influence its efficacy. Dogs are protected by a strong active immune response elicited by repeated vaccine administrations, but it is possible that critical amino acid substitutions in key epitopes of the H protein among circulating strains may allow immune evasion due to the limited antibody repertoire of maternal origin of unvaccinated pups born of vaccinated females. This could explain some cases of vaccinated pups being infected in the window period. Genetic diversity also may be associated with pathogenesis changes, which has been reported in other viruses of great relevance to dogs such as canine parvovirus and canine coronavirus (Decaro et al., 2010; Pinto et al., 2012). The H protein of CDV is one of the major target antigens for the host immune response, where the highest genetic/antigenic variation in the CDV has been found. In the cases studied here, vaccination with modified live vaccine was performed in 19 out of 155 cases. One of them was sequenced (Bra-110/12, JX912976) and the CDV isolate detected was clearly distinct from known vaccine strains, as has been demonstrated in previous studies of other CDV field strains (Haas et al., 1997; Mochizuki et al., 1999; Pardo et al., 2005). The CDV H glycoprotein determines the cytopathology and tropism of the virus and varies approximately 10% among the CDV isolates (von Messling et al., 2001). Previous works used P and NC genes sequences to assess the phylogenetic relationship among CDV samples, however H gene inferences results in more robust comparisons (Tan et al., 2011). In accordance with Mochizuki et al. (1999), which states that sequences with more than 5% of difference at the nucleotide level belong to distinct genotypes, at least nine separate genotypes of CDV can be distinguished. In Brazil, most of the phylogenetic analysis of CDV strains was based on partial NC gene sequences, which has some variation among CDV isolates, despite the fact that this

protein is part of the most conserved region of the CDV genome (Castilho et al., 2007; Headley et al., 2012). A previous phylogenetic analysis of H gene sequences suggested that there are two lineages of CDV circulating in Brazilian dogs in the area surveyed, but these sequences were not included in this study because the regions of the genome they cover are not the same as those in the samples investigated in this study (Rosa et al., 2012).

In our study, through phylogenetic analysis of the H gene, it is possible to observe the presence of two well defined genotypes circulating in South America, the first containing isolates from Brazil, Argentina and Uruguay, designated genotype South America-I, and the second containing mainly isolates from Argentina, designated genotype South America-II. A high degree of identity was detected among the Brazilian wild-type strains, ranging from 96.29% to 100% nucleotide identity (identical sequences were excluded from the alignment). Most of these could be grouped in a phylogenetic cluster clearly separate from the vaccine strains and from other wild-type CDV strains (genotype South America-I), although Bra-188/08 isolate (JX912968) was located in a clearly separated branch. The highest nucleotide sequence identity within South America-I, analyzing sequences from different countries, was 99,6% between a Brazilian strain (Bra-282/12) and an Uruguayan strain (Uy-102/7), detected in 2007. In Argentina, genotype South America-II seems to be prevalent, which is more related to the European genotype (Calderón et al., 2007). None of ours isolates branched in this group. Alignment of the H gene nucleotide sequences demonstrated that the sequences of the CDVs detected in cases Bra-5/09 and Bra-6/09 and cases Bra-382/12 and Bra-274/12 were 100% identical. Identical sequences were excluded from the analysis. By FASTA analysis, the Bra-188/08 isolate had high identity (99.6% nt identity in a 700-nt long fragment) to a CDV strain detected in 1999 from a Lesser Panda (*Ailurus*

fulgens) in China (AF178039). The virus was found to match (99.9% nt) the vaccine N-CDV strain (FJ461702) and the canine strain 25259 (98.7% nt identity) detected in 2004 in the United States of America (AY964114). In addition, the isolate was virtually identical (100% nt) in a 700-nt long fragment to a Rockborn strain (GU810819.1). Rockborn-like isolates had already been described. Recently, vaccine-like CDVs have been detected in wildlife animals but they have been reported only occasionally in dogs (Harder and Osterhaus, 1997; Pardo et al., 2005). A cluster of sequences including 25259 and the Lesser Panda strain usually occupies an intermediate position between the Asia-I and the European Wildlife group. Their classification into one of these two groups varies between the different genomic regions investigated and the authors who conducted the research (Martella et al., 2006; McCarthy et al., 2007; Benetka et al., 2011). In this study, this cluster is more related to South America-II and Europe Wildlife genotypes. We classified them as Rockborn-like strains, accordingly to a recent review (Martella et al., 2011).

Analyzing the nucleotide identity and the phylogenetic tree we suggest that Europe Wildlife, South America-II and Rockborn-like groups are subgenotypes of the same genotype. Isolate Bra-188/08 showed 98% identity to the Arg3 isolate of Argentina (AM422848), 98.7% with strain 25259 (AY964114), 99.6% with an Lesser Panda isolate (AF172411), 99.9% with the vaccine strain N-CDV (FJ461702) and 100% with the Rockborn vaccine strain (GU810819). It was already suggested that South America-II and Europe Wildlife clades were related (Panzera et al., 2012). The most distant in this group is the Austrian stone marten isolate (GQ214369), with the highest nucleotide identity to the Rockborn strain (95.3%) and the lowest to the Arg 9 isolate (AM422854). Excluding the Austrian stone marten isolate of the analysis, the nucleotide identity of the group is higher than 95%. Assuming that members of a

particular genotype of CDV have more than 95% identity in the nucleotides of the H gene sequences (Mochizuki et al., 1999), we could suggest that these three groups are part of the same genotype (genotype X) (Figure 2).

The Rockborn canine strain was attenuated on primary dog kidney cells. Although the virus was still pathogenic after 36 serial passages on primary dog kidney cells, it was completely attenuated after 56 serial passages (Rockborn, 1960). The Rockborn strain was withdrawn from several markets after the mid 1990s, as a consequence of reports of suspected cases of post vaccinal encephalitis, considering that it could be less attenuated and less safe than other CDV vaccines, e.g. Onderstepoort strain (Gloyd, 1995). Despite that, the strain is claimed to be part of a commercial vaccine available at the Brazilian market. Whereas most vaccines currently used are attenuated, there is the possibility of reversion to virulence. This could be the explanation why it is still circulating in this region, considering that the dog infected with the isolate Bra-188/08 was not vaccinated and presented gastroenteritis. Laboratory contamination could be ruled out since the positive control used in the reactions was a vaccine containing a different strain.

Reviewing the South America-I genotype separately, it could be suggested that there are more than one subgenotype circulating in this region, accordingly to geographical areas. At least seven subgenotypes could be circulating (Figures 2-3). Subgenotype A includes isolates from different cities, all belonging to the State of Rio Grande do Sul/Brazil, collected between 2008 and 2012; subgenotype B includes only isolates from Uruguay, collected between 2007 and 2009; subgenotype C includes isolates from Rio Grande do Sul/Brazil and Argentina collected in a period of 11 years (2003 to 2012); subgenotype D includes mostly isolates from the state of Paraná/Brazil and one from Rio Grande do Sul. Subgenotypes E and G includes only one isolate each, both from Paraná; the isolate CDVBR1 (EU098102) of subgenotype G, collected in the state of Paraná in 2007, was

distant from the others, with high bootstrap value and nucleotide identity higher than 99%. Subgenotype F includes Brazilian strains collected in Paraná in 2007. Also, most of the isolates from Rio Grande do Sul are more similar to isolates from Uruguay and Argentina than from other regions of Brazil, which is explained by the geographical proximity of these regions. The uncontrolled movement of dogs between continents has been blamed for the recirculation of CDV variants around the globe. In the United States and in Western Europe there is better vaccine compliance and wider use of the CDV vaccine in dogs than in parts of Central and Eastern Europe, where several different CDV variants have been reported (Ek-Kommonen et al., 1997; Haas et al., 1997; Martella et al., 2006; Benetka et al., 2011). The same scenario occurs in South America, which may explain the presence of different subgenotypes in this region. The proposal of the term genotype to distinguish among the various genetic lineages of CDV was made based on the classification used for measles virus (MV) (Bolt et al., 1997) and it is now widely accepted for defining novel CDV lineages (Mochizuki et al., 1999). However, CDV strains appear to be more heterogeneous and to differ more from currently used vaccine than comparable MV field and vaccine strains (Martella et al., 2007). In the case of measles virus, several genotypes and subgenotypes co-circulate at a given time (Zhang et al., 2012). In the present study subgenotypes were defined by the phylogenetic properties of the H gene nucleotide sequence (data not shown); that is, strains in the same clade showing at least 97% nucleotide identity were considered to belong to the same subgenotype. In addition, subgenotypes are clearly separated in the phylogenetic tree. The classification of clades into subgenotypes for CDV was not suggested before.

Conclusion

Our data indicates the presence of two co-circulating lineages with different prevalence in South America: 1) genotype South America-I, which includes isolates from southern Brazil, Uruguay and Argentina that grouped in subgenotypes A to G; 2) clade South America-II, formed exclusively by isolates from Argentina, which could be grouped with clades Europe Wildlife and Rockborn-like as part of genotype X. The level of genetic variation observed between the South American lineages and vaccine strains can lead to an antigenic variation that can be a possible factor involved in the resurgence of distemper cases in vaccinated dog populations. Also, we could conclude that CDV is circulating not only on non-vaccinated dogs, but also on vaccinated animals, either causing symptoms or not, impairing the control of the virus.

Acknowledgements

Financial support was provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Propesq/UFRGS. The authors would like to express their gratitude to clinical practitioners for generously providing samples for analysis and graduate and post graduate students of the Laboratório de Virologia for their collaboration in this work.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

REFERENCES

- Appel, M.J.G., 1978. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. Gen. Virol.* 41, 385–393.
- Benetka, V., Leschnik, M., Affenzeller, N., Möstl, K., 2011. Phylogenetic analysis of Austrian canine distemper virus strains from clinical samples from dogs and wild carnivores. *Vet. Rec.* 168, 377.
- Blixenkroner-Møller, M., Svansson, V., Have, P., Örvell, C., Appel, M., Pedersen, I.R., Dietz, H.H., Henriksen, P., 1993. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microbiol.* 37, 163–173.
- Bolt, G., Jensen, T.D., Gottschalck, E., Arctander, P., Appel, M.J.G., Buckland, R., Blixenkroner-Møller, M., 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J. Gen. Virol.* 78, 367–372.
- Calderón, M.G., Remorini, P., Periolo, O., Iglesias, M., Mattion, N., La Torre, J., 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341–349.
- Castilho, J.G., Brandão, P.E., Carnieli Jr, P., Oliveira, R.N., Macedo, C.I., Peixoto, Z.M.P., Carrieri, M.L., Kotait, I., 2007. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59, 654–659.
- Chappuis, G., 1995. Control of canine distemper. *Vet. Microbiol.* 44, 351–358.
- Decaro, N., Mari, V., Elia, G., Addie, D.D., Camero, M., Lucente, M.S., Martella, V., Buonavoglia, C. 2010. Recombinant canine coronaviruses in dogs, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 41–47.
- Dezengrini, R., Weiblen, R., Flores, E.F., 2007. Soroprevalência das infecções por parvovírus, adenovírus, coronavírus canino e pelo vírus da cinomose em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc. Rural*, 37, 183–189.

- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L., 1997. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet. Rec.* 141, 380–383.
- Figuera, R.A., Souza, T.M., Silva, M.C., Brum, J.S., Graça, D.L., Kommers, G.D., Irigoyen, L.F., Barros, C.S.L., 2008. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). *Pesq. Vet. Bras.* 28, 223–230.
- Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634–3643.
- Gloyd, J., 1995. Vaccines recalled. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1397.
- Gouveia, A.M.G., Magalhães, H.H., Ribeiro, A.L., 1987. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 39, 539–545.
- Greene, C.E., Appel, M.J.G., 2006. Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Elsevier, Saint Louis, pp. 25–41.
- Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., Barrett, T., 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.* 48, 165–171.
- Haas, R.; Johann, J.M.; Caetano, C.F.; Fischer, G., Vargas, G.D., Vidor, T., Hübner, S.O., 2008. Níveis de anticorpos contra o vírus da cinomose canina e o parvovírus canino em cães não vacinados e vacinados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 60, 270-274.
- Harder, T.C., Osterhaus, A.D.M.E., 1997. Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol.* 5, 120–124.

- Hashimoto, M., Une, Y., Mochizuki, M., 2001. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch. Virol.* 146, 149–155.
- Headley, S.A., Amude, A.M., Alfieri, A.F., Bracarense, A.P.F.R.L., Alfieri, A.A., 2012. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. *Semina Ciênc. Agrár.* 33, 1945–1978.
- Iwatsuki, K., Tokiyoshi, S., Hirayama, N., Nakamura, K., Ohashi, K., Wakasa, C., Mikami, T., Kai, C., 2000. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.* 71, 281–286.
- Jóźwik, A., Frymus, T., 2002. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* 49, 413–414.
- Kim, Y.H., Cho, K.W., Youn, H.Y., Yoo, H.S., Han, H.R., 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2, 59–63.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., 2011. II Section - The negative sense single stranded RNA viruses. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, p. 1338.
- 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.
- Martella, V., Blixenkron-Møller, M., Elia, G., Lucente, M.S., Cirone, F., Decaro, N., Nielsen, L., Bányai, K., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2011. Lights and

shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain.

Vaccine 29, 1222–1227.

Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C.,

Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Blixenkrone-Møller, M., Carmichael, L.E.,

Buonavoglia, C., 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116, 301–309.

Martella, V., Elia, G., Lucente, M.S., Decaro, N., Lorusso, E., Banyai, K., Blixenkrone-

Møller, M., Lan, N.T., Yamaguchi, R., Cirone, F., Carmichael, L.E., Buonavoglia,

C., 2007. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet. Microbiol.* 122, 32–42.

McCarthy, A.J., Shaw, M., Goodman, S.J., 2007. Pathogen evolution and disease

emergence in carnivores. *Proc. R. Soc. B* 274, 3165–3174.

Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S., 1999.

Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2936–2942.

Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999. *Veterinary*

Virology, 3rd ed. Academic Press, San Diego, CA, USA.

Panzerá, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B.,

Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J., Pérez, R., 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America.

Virus Res. 163, 401–404.

Pardo, I.D.R., Johnson, G.C., Kleiboeker, S.B., 2005. Phylogenetic characterization of

canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J.*

Clin. Microbiol. 43, 5009–5017.

- Pinto L.D., Streck A.F., Gonçalves K.R., Souza C.K., Corbellini A.O., Corbellini L.G., Canal C.W., 2012. Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 165, 29–33.
- Rima, B.K., 1983. The proteins of morbilliviruses. *J. Gen. Virol.* 64, 1205–1219.
- Rockborn, G., 1960. A preliminary report on efforts to produce a living distemper vaccine in tissue culture. *J. Small Anim. Pract.* 1, 53–55.
- Rosa, G.N., Domingues, H.G., Santos, M.M.A.B., Felipe, P.A.N., Spilki, F.R., Arns, C.W., 2012. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.* 32, 72–77.
- Rzezutka, A., Mizak, B., 2002. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. *Vet. Microbiol.* 88, 95–103.
- Shin, Y.J., Cho, K.O., Cho, H.S., Kang, S.K., Kim, H.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Park, N.Y., 2004. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Aust. Vet. J.* 82, 83–86.
- Si, W., Zhou, S., Wang, Z., Cui, S., 2010. A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. *Viol. J.* 7, 86.
- Silva, M.C., Figuera, R.A., Brum, J.S., Graça, D.L., Kommers, D., Irigoyen, L.F., 2007. Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. *Pesq. Vet. Bras.* 27, 215–220.
- Simon-Martínez, J., Ulloa-Arvizu, R., Soriano, V.E., Fajardo, R., 2008. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet. J.* 175, 423–426.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tan, B., Wen, Y.-J., Wang, F.-X., Zhang, S.-Q., Wang, X.-D., Hu, J.-X., Shi, X.-C., Yang, B.-C., Chen, L.-Z., Cheng, S.-P., Wu, H., 2011. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virology* 438, 517–524.
- Von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R., 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. Virol.* 75, 6418–6427.
- Woma, T.Y., van Vuuren, M., Bosman, A.M., Quan, M., Oosthuizen, M., 2010. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143, 126–32.
- Zhang, Y., Xu, S., Wang, H., Zhu, Z., Ji, Y., Liu, C., Zhang, X., Sun, L., Zhou, J., Lu, P., Hu, Y., Feng, D., Zhang, Z., Wang, C., Fang, X., Zheng, H., Liu, L., Sun, X., Tang, W., Wang, Y., Liu, Y., Gao, H., Tian, H., Ma, J., Gu, S., Wang, S., Feng, Y., Bo, F., Liu, J., Si, Y., Zhou, S., Ma, Y., Wu, S., Zhou, S., Li, F., Ding, Z., Yang, Z., Rota, P.A., Featherstone, D., Jee, Y., Bellini, W.J., Xu, W., 2012. Single endemic genotype of measles virus continuously circulating in China for at least 16 years. *PLOS ONE* 7, e34401.

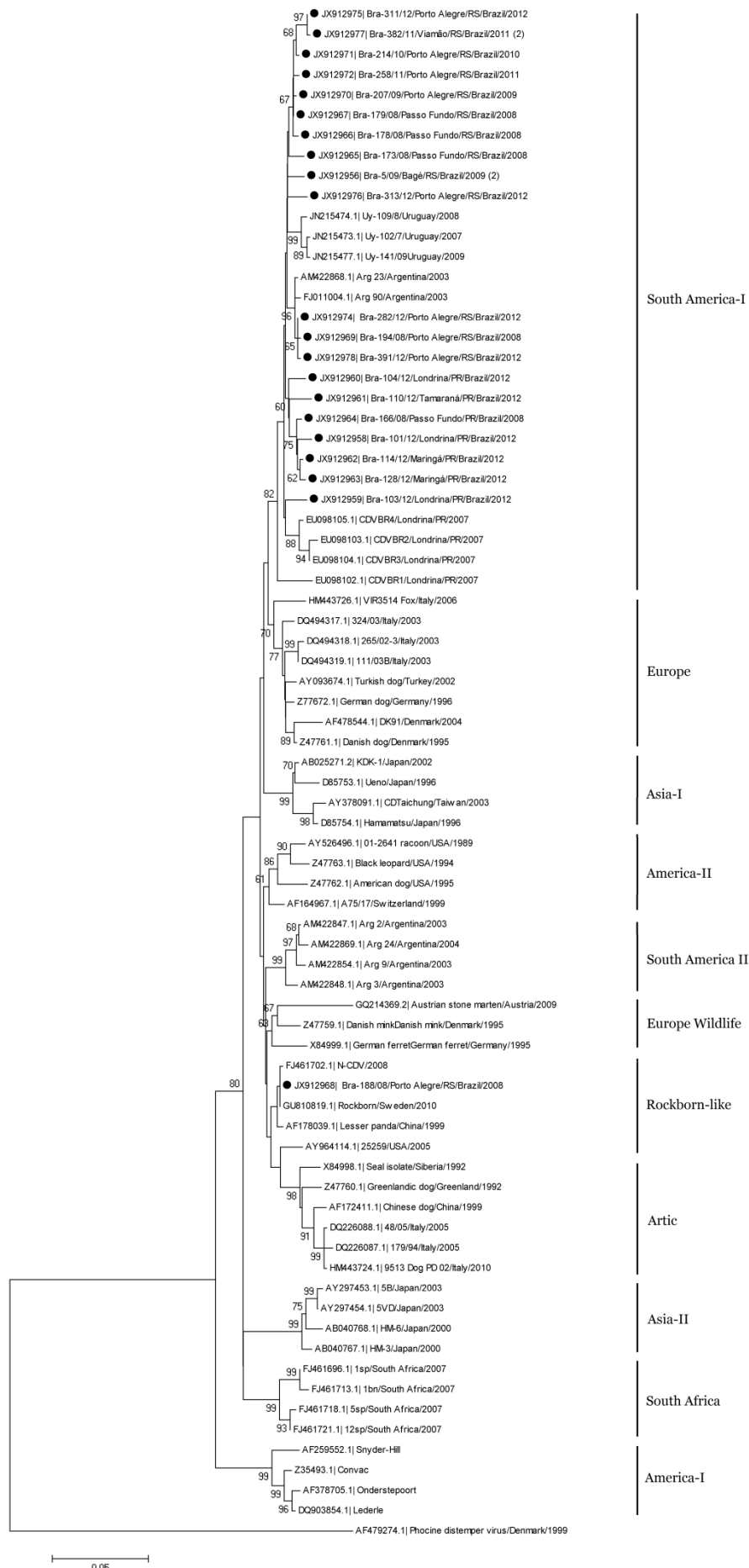


Figure 1. Phylogenetic neighbor-joining tree of the partial H gene. Bootstraps (1000 replicates) values >60 are indicated at the internal nodes. The samples obtained in the present study are highlighted with a symbol (●) Numbers in parentheses indicates a strain with identical sequences to that included in the tree. RS: Rio Grande do Sul state; PR: Paraná state, both in Brazil.

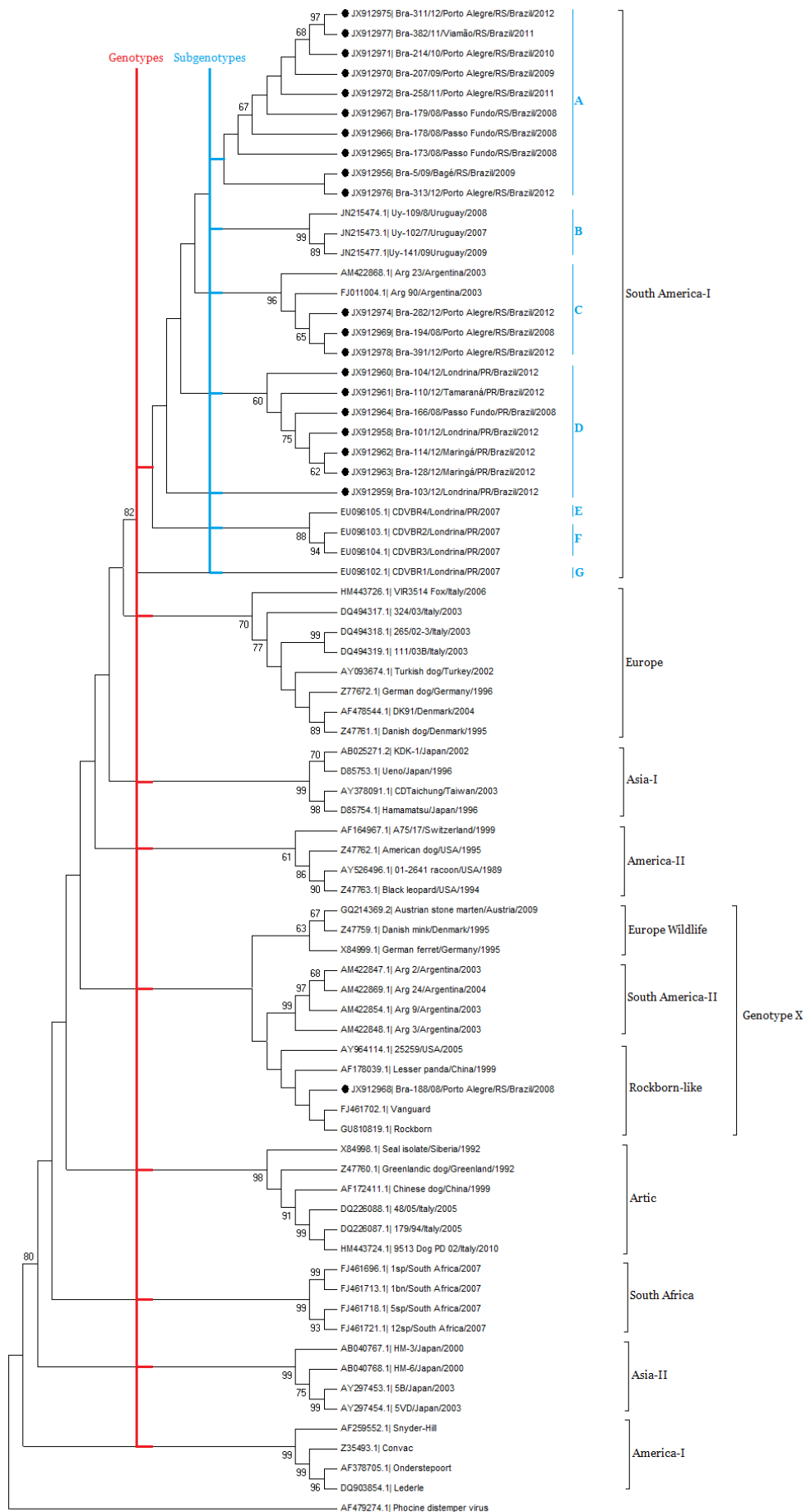


Figure 2. Phylogenetic tree of CDV hemagglutinin gene showing the genotypes and subgenotypes. Letters A to G correspond to suggested subgenotypes within the South America-I genotype. Genotype X corresponds to the junction of South America-II, Europe Wildlife and Rockborn-like clades. The phylogenetic tree of the partial H gene was inferred using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná.

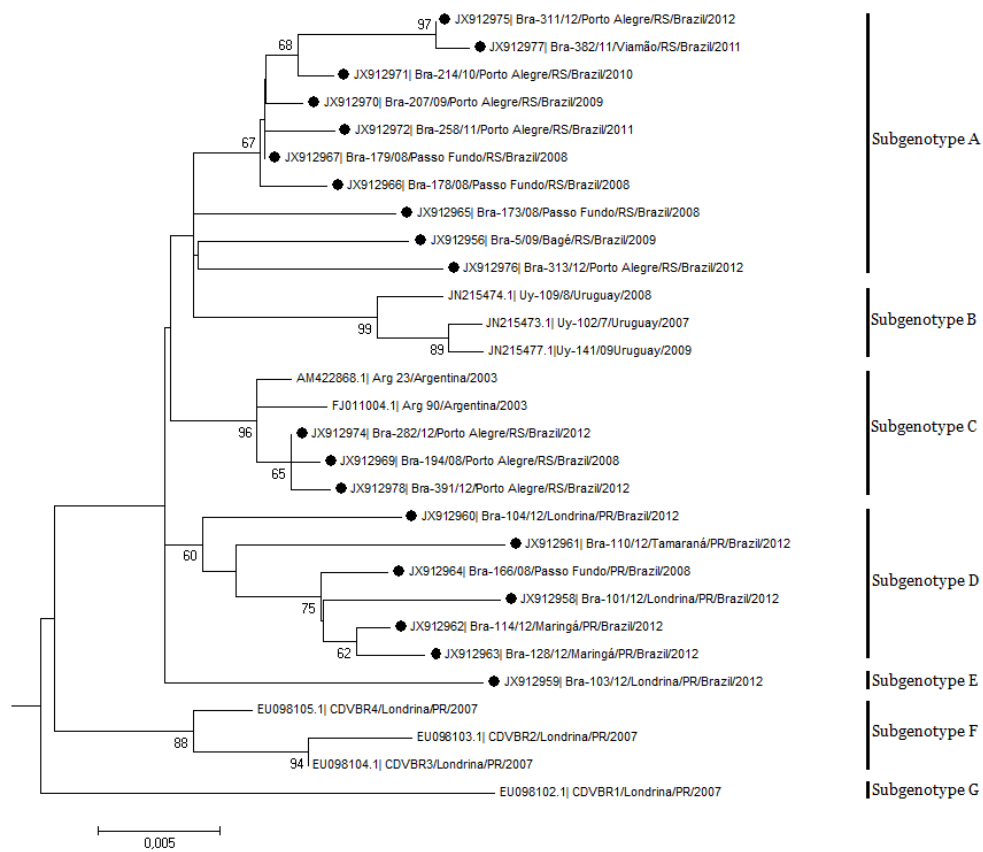


Figure 3. Subtree from the CDV partial hemagglutinin gene with details of the subgenotypes (A-G) of the South America-I genotype. Phylogenetic tree was inferred using the Neighbor-Joining method. The evolutionary distances were computed using the Tamura 3-parameter method and are in the units of the number of base substitutions per site. RS: Rio Grande do Sul; PR: Paraná.

Isolate	Year	Origin	Breed	Gender	Age (mo)	Vaccination record	Clinical signs				
							GE	R	O	D	N
1	2009	Bagé / RS	Mo	F	3	NV	-	-	-	-	-
2	2009	Bagé / RS	Mo	F	3	NV	-	-	-	-	-
5	2009	Bagé / RS	Mo	F	3	NV	-	-	-	-	-
6	2009	Bagé / RS	Mo	M	12	NV	-	-	-	-	-
8	2010	Bagé / RS	Mo	M	4	NV	-	-	-	-	-
21	2009	Cachoeirinha / RS	D	M	5	V	HGE	-	-	-	-
27	2011	Canoas / RS	LR	F	2	V(I)	+	-	-	-	-
105	2012	Cambé / PR	Mo	M	NA	NV	-	-	-	+	+
106	2012	Cambé / PR	Mo	F	NA	NV	-	+	-	-	+
107	2012	Cambé / PR	Bo	M	4	NV	-	+	-	-	-
30	2008	Caxias do Sul / RS	CC	M	6	V	-	-	-	-	-
35	2009	Caxias do Sul / RS	Mo	M	5	V	-	-	-	-	-
36	2009	Caxias do Sul / RS	Mo	M	5	V	-	-	-	-	-
38	2009	Caxias do Sul / RS	Mo	F	2	V(I)	-	-	-	-	-
44	2012	Cuiabá / MT	Mo	F	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
45	2012	Cuiabá / MT	LA	M	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
46	2012	Cuiabá / MT	Mo	F	8	NA	NA	NA	NA	NA	NA
47	2012	Cuiabá / MT	Pug	F	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
59	2012	Cuiabá / MT	BT	M	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
61	2012	Cuiabá / MT	Mo	F	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
64	2012	Cuiabá / MT	ST	F	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
72	2009	Florianópolis / SC	Mo	M	10	NV	HGE	-	-	-	-
73	2009	Glorinha / RS	Mo	M	4	NV	-	-	-	-	-
76	2009	Gravataí / RS	Mo	M	7	NV	-	-	-	-	-
80	2012	Gravataí / RS	D	M	10	V	-	+	+	+	-
100	2012	Londrina / PR	Mo	F	8	NV	HGE	+	+	+	-
101	2012	Londrina / PR	Mo	M	24	NV	+	-	+	+	+
102	2012	Londrina / PR	Mo	M	24	NA	+	-	+	+	-
103	2012	Londrina / PR	Mo	F	24	V(I)	+	+	+	+	-
104	2012	Londrina / PR	Mo	M	24	NV	-	+	-	-	+
108	2012	Londrina / PR	Mo	F	NA	NV	+	-	+	-	-
109	2012	Londrina / PR	Mo	F	18	V(I)	-	+	+	+	-
112	2012	Maringá / PR	NA	M	7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
114	2012	Maringá / PR	NA	F	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA
115	2012	Maringá / PR	NA	F	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
117	2012	Maringá / PR	NA	M	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
119	2012	Maringá / PR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
124	2012	Maringá / PR	NA	M	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA

126	2012	Maringá / PR	NA	M	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
128	2012	Maringá / PR	NA	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
160	2008	Niterói / RJ	BF	M	8	V	-	-	-	-	-
166	2008	Passo Fundo / RS (Mo	F	9	NV	-	-	-	-	-
167	2008	Passo Fundo / RS	Mo	M	5	NV	-	-	-	-	-
169	2008	Passo Fundo / RS	Mo	M	3	NV	-	-	-	-	-
173	2008	Passo Fundo / RS	Mo	M	3	NV	+	-	-	-	-
175	2008	Passo Fundo / RS	Ro	M	4	NV	+	-	-	-	-
176	2008	Passo Fundo / RS	Ro	M	6	NV	+	-	-	-	-
178	2008	Passo Fundo / RS	Mo	M	6	NV	+	+	+	-	-
179	2008	Passo Fundo / RS	Mo	M	96	NA	-	-	-	-	+
182	2012	Pelotas / RS	Mo	M	3	V(I)	HGE	-	-	-	-
184	2008	Porto Alegre / RS	Mo	F	2	NV	+	-	-	-	-
186	2008	Porto Alegre / RS	Mo	M	2	NV	+	-	-	-	-
188	2008	Porto Alegre / RS	Mo	M	2	NV	HGE	-	-	-	-
189	2008	Porto Alegre / RS	Mo	F	4	V	+	-	-	-	-
191	2008	Porto Alegre / RS	Mo	F	2	NV	HGE	-	-	-	-
193	2008	Porto Alegre / RS	Mo	M	3	V(I)	+	-	-	-	-
194	2008	Porto Alegre / RS	Mo	M	6	NV	+	-	-	-	-
196	2008	Porto Alegre / RS	Mo	F	2	NV	+	-	-	-	-
200	2008	Porto Alegre / RS	Mo	M	3	NV	+	-	-	-	-
204	2008	Porto Alegre / RS	GS	M	2	NV	-	-	-	-	-
207	2009	Porto Alegre / RS	Da	M	2	NV	HGE	-	-	-	-
208	2010	Porto Alegre / RS	Mo	M	2	NV	+	-	-	-	-
209	2010	Porto Alegre / RS	Mo	M	2	NV	-	-	-	-	-
214	2010	Porto Alegre / RS	ST	F	2	V(I)	HGE	-	-	-	-
215	2010	Porto Alegre / RS	Mo	M	120	NV	HGE	-	-	-	-
217	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	3	NA	+	-	-	-	-
219	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	3	NA	+	-	-	-	-
220	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	3	NA	+	-	-	-	-
221	2011	Porto Alegre / RS	Po	M	144	NA	+	-	-	-	-
224	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	4	NA	HGE	-	-	-	-
225	2011	Porto Alegre / RS	Po	M	3	NV	HGE	-	-	-	-
226	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	24	NV	+	+	-	-	-
228	2011	Porto Alegre / RS	Po	F	192	NV	-	-	-	-	+
230	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	2	NV	-	-	-	-	+
231	2011	Porto Alegre / RS	GS	M	3	V	HGE	-	-	-	-
233	2011	Porto Alegre / RS	Po	F	156	V	-	-	-	-	-
386	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	4	NA	+	-	-	-	-
387	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	24	NA	-	-	+	-	+

235	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	4	NA	+	-	+	+	-
236	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	3	NV	-	-	+	-	+
237	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	12	NV	-	+	+	-	+
238	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	NA	NV	-	+	-	-	-
239	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	36	NV	-	+	+	-	-
240	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	120	NV	-	+	+	-	-
241	2011	Porto Alegre / RS	Po	F	48	V	-	-	+	-	+
242	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	18	NV	HGE	+	-	-	-
243	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	9	NV	HGE	-	-	-	-
244	2011	Porto Alegre / RS	Da	M	7	V	-	-	-	-	-
245	2011	Porto Alegre / RS	Da	F	7	V	-	-	+	+	+
247	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	2	NV	+	-	-	-	-
249	2011	Porto Alegre / RS	NA	NA	NA	NA	-	-	-	-	-
250	2011	Porto Alegre / RS	ST	F	11	V	HGE	+	+	-	-
251	2011	Porto Alegre / RS	Da	F	NA	NV	+	+	+	-	+
253	2011	Porto Alegre / RS	Po	F	48	V	+	+	-	+	+
254	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	60	NA	-	-	-	-	-
258	2011	Porto Alegre / RS	BM	M	2	V(I)	+	-	-	-	-
259	2011	Porto Alegre / RS	BM	F	2	V(I)	+	-	+	-	-
260	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	12	V	+	-	-	-	-
261	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	4	NA	+	-	-	-	-
262	2011	Porto Alegre / RS	Mo	M	12	NA	+	-	-	-	-
263	2011	Porto Alegre / RS	Pi	F	12	NV	-	-	-	-	+
265	2011	Porto Alegre / RS	LA	M	5	NV	-	-	-	-	+
266	2011	Porto Alegre / RS	Mo	F	6	NV	-	-	-	-	-
267	2011	Porto Alegre / RS	Pi	M	24	NV	-	-	-	-	-
388	2011	Porto Alegre / RS	CC	M	36	NV	-	-	-	-	-
389	2011	Porto Alegre / RS	Pi	M	24	NV	-	-	-	-	-
268	2012	Porto Alegre / RS	Ro	M	120	NV	-	-	-	-	-
269	2012	Porto Alegre / RS	Ro	M	12	V(I)	+	-	-	-	-
390	2012	Porto Alegre / RS	NA	M	NA	NV	-	-	-	-	+
271	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	120	NV	-	-	-	+	-
273	2012	Porto Alegre / RS	ST	F	NA	NA	-	-	-	-	-
274	2012	Porto Alegre / RS	ST	M	NA	NA	-	-	-	-	-
275	2012	Porto Alegre / RS	BF	F	NA	NV	NA	NA	NA	NA	NA
277	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	3	NV	-	-	+	-	-
278	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	3	NV	-	-	-	-	-
279	2012	Porto Alegre / RS	Da	M	7	V	+	-	-	-	+
282	2012	Porto Alegre / RS	Po	F	NA	NV	-	-	-	-	+
283	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

285	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	180	NA	NA	NA	NA	NA	NA
286	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	4	NV	HGE	-	-	-	-
287	2012	Porto Alegre / RS	NA	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
288	2012	Porto Alegre / RS	NA	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
296	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	12	NV	HGE	-	-	-	-
297	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	24	V	-	-	-	-	-
391	2012	Porto Alegre / RS	NA	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
299	2012	Porto Alegre / RS	A	M	2	V(I)	+	-	-	-	+
301	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	4	NA	HGE	-	-	+	-
309	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	7	NV	-	-	-	-	-
311	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	12	NV	-	+	+	-	-
312	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	12	NV	-	-	-	-	+
313	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	36	NV	-	+	+	-	-
315	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	12	NV	+	-	-	-	+
316	2012	Porto Alegre / RS	LR	F	84	NA	-	-	-	-	-
317	2012	Porto Alegre / RS	LR	M	36	NA	-	-	-	-	-
318	2012	Porto Alegre / RS	Da	F	7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
321	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	36	NV	-	-	-	-	-
322	2012	Porto Alegre / RS	Mo	M	4	V(I)	-	-	-	-	-
324	2012	Porto Alegre / RS	PB	F	12	NV	-	-	-	-	+
325	2012	Porto Alegre / RS	Mo	F	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
326	2012	Porto Alegre / RS	LA	M	2	V	NA	NA	NA	NA	NA
334	2012	Porto Alegre / RS	BM	F	144	NV	-	+	-	-	+
340	2009	Santana do Livramento / RS	EB	M	2	V(I)	+	-	-	-	-
351	2012	São Paulo / SP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
358	2012	São Paulo / SP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
359	2012	São Paulo / SP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
363	2012	São Paulo / SP	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
110	2012	Tamaraná / PR	LA	M	6	V	+	-	-	-	-
371	2009	Viamão / RS	GS	M	2	NV	HGE	-	-	-	-
377	2011	Viamão / RS	Mo	F	9	V(I)	HGE	-	+	-	-
378	2011	Viamão / RS	Mo	F	12	NV	-	+	-	-	-
379	2011	Viamão / RS	Mo	M	2	V(I)	-	-	-	-	-
382	2011	Viamão / RS	CC	M	36	NV	-	-	-	-	-
383	2012	Viamão / RS	Mo	F	24	NV	-	-	-	-	+
384	2012	Viamão / RS	Mo	M	8	NV	+	-	-	-	-
385	2012	Viamão / RS	Mo	F	24	NV	-	-	-	-	+

Supplementary data.

Table 2. Description of CDV RT-PCR-positive dogs analyzed in this study.

Abbreviations: F: female; M: male; m: month; BF: Bichon Frisé; Bo: Boxer; BM: Brazilian Mastiff; BT: Brazilian Terrier; CC: Chow Chow; Da: Dachshund; EB: English Bulldog; FB: French Bulldog; GS: German Shepherd; LA: Lhasa Apso; LR: Labrador Retriever; Mo: Mongrel; Pi: Pinscher; Po: Poodle; Ro: Rottweiler; ST: Shi-Tzu; NA: not available; NV: not vaccinated; V(I): incomplete vaccination; V: vaccinated; D: dermatological; GE: gastroenteritis; HGE: hemorrhagic gastroenteritis; N: neurological; O: ophthalmic; R: respiratory; MT: Mato Grosso; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; RJ: Rio de Janeiro; SC: Santa Catarina; SP: São Paulo. Bold indicate isolates included on the phylogenetic analysis.

4 DISCUSSÃO

A cinomose é uma das principais doenças virais que afetam cães no Brasil. O objetivo principal deste trabalho foi detectar CDV de amostras clínicas de caninos utilizando RT-PCR e avaliar a variabilidade genética das cepas de campo obtidas.

Estima-se que 25% a 75% dos cães susceptíveis de CDV são infectados subclínicamente e transmitem o vírus, sem qualquer sinal clínico de doença (GREENE; APPEL, 2006). Além disso, os animais assintomáticos não são diagnosticados e permanecem como um reservatório de CDV. Portanto, a utilização de RT-PCR é útil para detectar CDV em animais assintomáticos. Em nosso estudo, 23,87% dos animais CDV-positivos eram assintomáticos.

Há relatos recentes de ressurgimento e aumento da incidência de CDV em vários continentes, incluindo a América do Sul. No Brasil, estudos epidemiológicos têm sugerido que a cinomose é endêmica em populações caninas urbanas, sendo uma das principais causas de morte (GOUVEIA; MAGALHÃES; RIBEIRO, 1987; FIGUERA *et al.*, 2008). Muitos animais não são vacinados, principalmente devido à situação econômica dos proprietários, o que explica a situação endêmica do vírus na região.

O controle da cinomose é alcançado, principalmente, através da vacinação (CHAPPUIS, 1995). No entanto, muitos surtos da doença em cães vacinados foram documentados (BLIXENKRONE-MØLLER *et al.*, 1993; HAAS *et al.*, 1997; JÓZWIK; FRYMUS, 2002; SIMON-MARTÍNEZ *et al.*, 2008). Em nosso estudo, 12,2% dos cães eram vacinados. A qualidade da vacina, uma resposta imune fraca e a diversidade genética do CDV são as principais causas de falhas na proteção conferida pelas vacinas contra a cinomose (LAN *et al.*, 2006). A proteína H do CDV é um dos antígenos alvo importantes para a resposta imune do hospedeiro, em que a maior variação genética/antigênica é encontrada (VON MESSLING *et al.*, 2001). Nos cães deste estudo, a vacinação com a vacina viva atenuada foi realizada em 19 de 155 casos positivos. O gene H do CDV de um destes foi sequenciado (Bra-110/12) e a sequência era claramente distinta das cepas de vacinas conhecidas, tal como foi demonstrado em estudos anteriores de outras cepas de campo (HAAS *et al.*, 1997; PARDO; JOHNSON; KLEIBOEKER, 2005).

Uma imagem mais refinada das relações filogenéticas entre cepas de CDV é obtida quando as sequências do gene H são analisadas. Analisando este gene, pelo

menos nove genótipos diferentes podem ser distinguidos, de acordo com a distribuição geográfica. Em nosso estudo foi possível observar a presença de dois genótipos bem definidos circulando na América do Sul. O genótipo América do Sul-I contém isolados do Brasil, Argentina e Uruguai, e um segundo grupo, designado América do Sul-II, o qual contém principalmente isolados da Argentina. A grande maioria das amostras agrupou em um *cluster* (genótipo América do Sul-I) claramente separado das cepas vacinais, embora a amostra Bra-188/08 ficou localizada próxima as amostras Rockborn-like. Na Argentina, o genótipo América do Sul-II parece ser prevalente, o qual é mais relacionado ao genótipo Europa Selvagem (CALDERON *et al.*, 2007).

Amostras Rockborn-like já foram descritas (MARTELLA *et al.*, 2011). Recentemente, isolados semelhantes à cepa vacinal têm sido detectados em animais selvagens, mas os relatos em cães são ocasionais (HARDER; OSTERHAUS, 1997; PARDO; JOHNSON; KLEIBOEKER, 2005). Um grupo de sequências, incluindo a cepa 25259 e o isolado do panda vermelho, geralmente ocupa uma posição intermediária entre a os genótipos Ásia-I e Europa Selvagem. Sua classificação em um desses dois grupos varia entre as diferentes regiões genômicas investigadas e os autores que realizaram a pesquisa (BENETKA *et al.*, 2011; MARTELLA *et al.*, 2006; MCCARTHY; SHAW; GOODMAN, 2007). Neste estudo, este *cluster* está mais relacionado aos genótipos América do Sul-II e Europa Selvagem. Nós o classificamos no grupo Rockborn-like, de acordo com uma revisão recente (MARTELLA *et al.*, 2011).

Analisando a identidade de nucleotídeos e a árvore filogenética, pode-se sugerir que os grupos Europa Selvagem, América do Sul-II e Rockborn-like são subgenótipos do mesmo genótipo. Já havia sido sugerido que os grupos América do Sul-II e Europa Selvagem são relacionados (PANZERA *et al.*, 2012). Supondo-se que os membros de um genótipo particular de CDV têm mais de 95% de identidade de nucleotídeos no gene H (MOCHIZUKI *et al.*, 1999), pode-se sugerir que estes três grupos são parte do mesmo genótipo.

A cepa Rockborn canina foi isolada em células primárias de rim canino, e alegou-se ser atenuada (ROCKBORN, 1958). O vírus se manteve patogênico após 36 passagens seriadas em células primárias de rim canino, mas tornou-se completamente atenuado após 56 passagens seriadas (ROCKBORN, 1960). A cepa Rockborn foi retirada de vários mercados, após meados de 1990, como consequência de notificações de casos suspeitos de encefalite pós-vacinal, considerando que poderia ser menos

atenuada e menos segura que outras cepas vacinais, como por exemplo a cepa Onderstepoort (GLOYD, 1995). Apesar disso, a cepa é reivindicada como parte de uma vacina comercial disponível no mercado nacional. Enquanto a maioria das vacinas atualmente utilizadas são atenuadas, existe a possibilidade, embora remota, de reversão à virulência. Esta poderia ser a explicação de porque ainda circula nesta região, uma vez que o cão infectado com o isolado Bra-188/08 não foi vacinado.

Analisando o genótipo América do Sul-I separadamente, pode-se sugerir que há mais do que um subgenótipo circulando nessa região, de acordo com as áreas geográficas. Pelo menos 7 subgenótipos parecem estar circulando (subgenótipos A-G). Além disso, a maioria dos isolados do Rio Grande do Sul é mais semelhante aos isolados de Uruguai e Argentina que de outras regiões do Brasil, o que é explicado pela proximidade geográfica destas regiões. O movimento descontrolado de cães entre continentes tem sido relacionado à recirculação de variantes de CDV ao redor do mundo. Nos Estados Unidos e na Europa Ocidental há melhor cumprimento dos protocolos vacinais que em partes da Europa Central e Leste Europeu, onde diversas variantes foram relatadas (DEMETER *et al.*, 2007). O mesmo cenário ocorre na América do Sul, o que pode explicar a presença de diferentes subgenótipos nesta região.

A proposta do termo “genótipo” para distinguir entre as várias linhagens genéticas de CDV foi feita com base na classificação utilizada para o vírus do sarampo (BOLT *et al.*, 1997) e é hoje amplamente aceito para a definição de novas linhagens de CDV (MOCHIZUKI *et al.*, 1999). No caso do vírus do sarampo, diferentes genótipos e subgenótipos co-circulam num dado momento (JIN *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2012). Os subgenótipos do presente estudo foram definidos pelas propriedades filogenéticas da sequência de nucleotídeos do gene H, isto é, cepas do mesmo clado com pelo menos 97% de identidade de nucleotídeos foram considerados como pertencentes ao mesmo subgenótipo. Além disso, estão claramente separados na árvore filogenética. A classificação destes clados em subgenótipos para CDV não havia sido sugerida anteriormente.

Em resumo, nossos dados indicam a presença de dois genótipos co-circulando com diferentes frequências na América do Sul: 1) genótipo América do Sul-I, que inclui isolados do sul do Brasil, Uruguai e Argentina, agrupados em sete subgenótipos denominados de A a G, 2) dentro do grupo América do Sul-II, formado exclusivamente por isolados da Argentina, que poderiam ser agrupados com os clados Europa Selvagem e Rockborn-like parte do genótipo X. O nível de variação genética observada entre esses

isolados desses genótipos e cepas vacinais indica que a reversão da virulência de cepas vacinais deve ser considerada um possível fator que conduz ao ressurgimento de casos de cinomose em populações de cães vacinados.

5 CONCLUSÕES

1. Os dados obtidos neste estudo indicam a presença de dois genótipos de CDV distintos circulando em cães na América do Sul.
2. A grande maioria das amostras coletadas de cães no Brasil pertence ao genótipo América do Sul-I, com exceção de uma amostra (Bra188/08) virtualmente idêntica, em relação à identidade da sequência de nucleotídeos, à cepa Rockborn, de origem vacinal. A amostra Bra188/08 é semelhante a outras amostras Rockborn-like já descritas.
3. O grupo América do Sul-II inclui somente isolados da Argentina.
4. A análise filogenética sugere a presença de sete subgenótipos circulando na América do Sul, como parte do genótipo América do Sul-I.
5. Propõe-se que as amostras Rockborn-like, o grupo América do Sul-II e o grupo Europa Selvagem sejam considerados subgenótipos do genótipo X.
6. Animais vacinados são afetados pela doença tanto quanto animais não vacinados.
7. Cães CDV-positivos podem apresentar sinais clínicos ou não.
8. Estudos mais aprofundados serão necessários para avaliar as consequências da variabilidade genética inerente ao CDV na proteção induzida pelas vacinas atualmente utilizadas e seu papel nas falhas vacinais observadas.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, K. A. *et al.* Canine distemper-related mortality among wild dogs (*Lycaon pictus*) in Chobe National Park, Botswana. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 27, p. 426-427, 1996.
- APPEL, M. J. G. *et al.* Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 277-288, 1994.
- APPEL, M. J. G. *et al.* Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, p. 803-806, 1974.
- APPEL, M. J. G. *et al.* Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. **Archives of Virology**, v. 82, p. 73-82, 1984.
- APPEL, M. J. G. Canine distemper virus. In: HORZINEK, M. C. (Ed.). **Virus Infections of Carnivores**. Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 133-159.
- APPEL, M. J. G.; GIBBS, E. P. J.; MARTINS, S. J. Morbillivirus diseases of animals and man. **Comparative Diagnosis of Viral Diseases.**, v. 4, p. 235-297, 1981.
- APPEL, M. J. G.; GILLESPIE, J. H. Canine distemper virus. **Virology Monographs**, v. 11, p. 1-96, 1972.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine Distemper: Current Status. In: CARMICHAEL, L. E. (Ed.). **Recent Advances in Canine Infectious Diseases**. [S.l.] International Veterinary Information Service, 1999.
- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 187-191, 1995.
- APPEL, M. J. G.; REGGIARDO, C.; SUMMERS, B. Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). **Archives of Virology**, v. 119, p. 147-152, 1991.
- ARMSTRONG, W. H.; ANTHONY, C. H. An epizootic of canine distemper in a zoological park. **Cornell Vet**, v. 32, p. 286-288, 1942.
- 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.
- BARRETT, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 3-13, 1999.
- BENETKA, V. *et al.* Phylogenetic analysis of Austrian canine distemper virus strains from clinical samples from dogs and wild carnivores. **The Veterinary Record**, v. 168, n. 14, p. 377, 2011.

BLIXENKRONE-MOLLER, M. *et al.* Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 1991.

BLIXENKRONE-MØLLER, M. *et al.* Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 1-2, p. 163-173, 1993.

BOLLO, E. *et al.* Canine distemper virus clearance in chronic inflammatory demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 72, p. 69-73, 1986.

BOLT, G. *et al.* Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. **The Journal of General Virology**, v. 78, p. 367-372, 1997.

BRUM, M. C. S.; WEIBLEN, R. Detecção, Identificação e Quantificação de Vírus. In: FLORES, E. F. (Ed.). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 3, p. 53-82.

BUSH, M. *et al.* Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 169, n. 9, p. 959-960, 1976.

CALDERÓN, 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**, v. 125, n. 3-4, p. 341-9, 2007.

CARPENTER, M. A. *et al.* Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, n. 2-4, p. 259-266, 1998.

CHA, S. Y. *et al.* Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 497-504, 2012.

CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 351-358, 1995.

CLEAVELAND, S. *et al.* Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v. 72, n. 3-4, p. 217-227, 2000.

CURRAN, M. D.; CLARKE, D. K.; RIMA, B. K. The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus. **Virology**, p. 443-447, 1991.

CURTI, M. C. *et al.* Avaliação de um kit de imunoensaio cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2383-2390, 2012.

- DAVIDSON, M. Canine distemper virus infection in the domestic ferret. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 8, n. 7, p. 448-453, 1986.
- DAVIDSON, W. R. *et al.* Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, n. 1, p. 28-33, 1992.
- DEMETER, Z. *et al.* Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 3-4, p. 258-269, 2007.
- DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W.; HOORENS, J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody-enzyme method. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 11, p. 1860-1862, 1980.
- EK-KOMMONEN, C. *et al.* Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **The Veterinary Record**, v. 141, p. 380-383, 1997.
- ELIA, G. *et al.* Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 136, n. 1-2, p. 171-176, 2006.
- FLORES, E. F. Interações dos vírus com as células e com os hospedeiros. In: _____. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. cap. 8, p. 201-252.
- GEMMA, T. *et al.* Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. **The Journal of Veterinary Medical Science: the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 58, n. 6, p. 547-550, 1996.
- GESE, E. M. *et al.* Serological survey for diseases in free-ranging coyotes (*Canis latrans*) in Yellowstone National Park, Wyoming. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 33, n. 1, p. 47-56, 1997.
- GLOYD, J. Vaccines recalled. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 207, p. 1397, 1995.
- GOUVEIA, A. M. G.; MAGALHÃES, H. H.; RIBEIRO, A. L. Cinomose canina: ocorrência em animais vacinados e distribuição por faixa etária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 39, p. 539-545, 1987.
- GREENE, C. E.; APPEL, M. J. G. Canine distemper. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2006. p. 25-41.
- GRIOT, C. *et al.* Antibody-induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine distemper encephalitis: a mechanism for bystander demyelination. **Acta Neuropathologica**, v. 78, n. 4, p. 396-403, 1989.
- HAAS, L. *et al.* Canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyenas. **Veterinary Microbiology**, v. 49, n. 1-2, p. 147-152, 1996.

- HAAS, L. *et al.* Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. **Virus Research**, v. 48, n. 2, p. 165-171, 1997.
- HARDER, T. C.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts? **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 120-124, 1997.
- HARTLEY, W. J. A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 11, p. 301-312, 1974.
- HASHIMOTO, M.; UNE, Y.; MOCHIZUKI, M. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. **Archives of Virology**, v. 146, n. 1, p. 149-155, 2001.
- HEADLEY, S. A. *et al.* Molecular detection of canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, n. 5, p. 588-597, 2009.
- HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 2, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200009&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 2 jun. 2011.
- HIGGINS, R. J. *et al.* Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. **Acta Neuropathologica**, v. 58, p. 1-8, 1982.
- HUR, K. *et al.* Canine Distemper Virus Infection in Binturongs (*Arctictis binturong*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 121, n. 3, p. 295-299, 1999.
- IWATSUKI, K. *et al.* Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 2, p. 185-190, 1995.
- IWATSUKI, K. *et al.* Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**, v. 71, n. 3-4, p. 281-286, 2000.
- JIN, L. *et al.* The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995. **The Journal of General Virology**, v. 78, p. 1287-1294, 1997.
- JÓZWIK, A.; FRYMUS, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 49, n. 9, p. 413-414, 2002.
- KAI, C. *et al.* Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 6, p. 1067-1070, 1993.
- KENNEDY, S. *et al.* Mass die-off of caspian seals caused by canine distemper virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 6, p. 637-639, 2000.

KERDILES, Y. M. *et al.* Immunomodulatory properties of morbillivirus nucleoproteins. **Viral Immunology**, v. 19, n. 2, p. 324-334, 2006.

KING, A. M. Q. *et al.* II Section - The negative sense single stranded RNA viruses. In: _____. **Virus Taxonomy**: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 9th ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 1338.

KOUTINAS, A. F. *et al.* Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 1, p. 47-56, 2002.

LAN, N. T. *et al.* Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 32-42, 2006.

LÖFFLER, S. *et al.* CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 42-49, 1997.

LÓPEZ, A. Respiratory System. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Eds.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 4th ed. St Louis: Mosby Elsevier., 2007. p. 463-542.

MACHIDA, N. *et al.* Canine distemper virus infection in a masked palm civet (*Paguma larvata*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 107, p. 439-443, 1992.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's Veterinary Virology**. 4th ed. [S.l.] Academic Press, 2011. p. 507.

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, 2006.

MARTELLA, V. *et al.* Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 32-42, 2007.

MARTELLA, V. *et al.* Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1222-1227, 2011.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper virus. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 4, p. 787-797, vii-viii, 2008.

MCCARTHY, A. J.; SHAW, M.; GOODMAN, S. J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 274, p. 3165-3174, 2007.

MCINNES, E. F.; BURROUGHS, R. E.; DUNCAN, N. M. Possible vaccine-induced canine distemper in a South American bush dog (*Speothos venaticus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 28, p. 614-617, 1992.

- MEGID, J. *et al.* First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 303-305, 2010.
- MELI, M. L. *et al.* Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 1-2, p. 132-7, 2010.
- MOCHIZUKI, M. *et al.* Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 9, p. 2936-2942, 1999.
- MOSS, W. J.; GRIFFIN, D. E. Global measles elimination. **Nature Reviews: Microbiology**, v. 4, n. 12, p. 900-908, 2006.
- MURPHY, F. A. *et al.* **Veterinary Virology**. 3th ed. San Diego: Elsevier, 1999. p. 629.
- MURPHY, F. A. **The Foundations of Virology**. Texas: Infinity Publishing, 2012. p. 533.
- MÜLLER, A. *et al.* Domestic dog origin of canine distemper virus in free-ranging wolves in Portugal as revealed by hemagglutinin gene characterization. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 3, p. 725-729, 2011.
- NAVA, A. F. D. *et al.* First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. **EcoHealth**, v. 5, n. 4, p. 513-518, 2008.
- PANDHER, K. *et al.* Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 2, p. 201-204, 2006.
- PANZERA, Y. *et al.* Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 401-404, 2012.
- PARDO, I. D. R.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5009-5017, 2005.
- PRATAKPIRIYA, W. *et al.* Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 10207-10210, 2012.
- QUI, X.; MAINKA, S. Review of mortality of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 24, p. 425-429, 1993.
- RIMA, B. K. The proteins of morbilliviruses. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 1205-1219, 1983.
- ROCKBORN, G. Canine distemper virus in tissue culture. **Archiv für die Gesamte Virusforschung**, v. 8, n. 4, p. 485-492, 1958.

ROCKBORN, G. An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. **Nature**, v. 184, n. 4689, p. 822, 1959.

ROCKBORN, G. A preliminary report on efforts to produce a living distemper vaccine in tissue culture. **Journal of Small Animal Practice**, v. 1, p. 53-55, 1960.

ROELKE-PARKER, M. E. *et al.* A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 441-445, 1996.

SAKAI, K. *et al.* Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan in 2008. **Journal of Virology**, v. 87, n. 2, p. 1105-1114, 2013.

SCHMID, E. *et al.* Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. **Journal of Virology**, v. 74, n. 16, p. 7554-7561, 2000.

SI, W. *et al.* A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. **Virology Journal**, v. 7, p. 86, 2010.

SILVA, M. C. *et al.* Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 5, p. 215-220, 2007.

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

SONNE, L. *et al.* Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 143-149, 2009.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. **Acta Neuropathologica**, v. 10, p. 1-10, 1979.

SUMMERS, B. A.; GREISEN, H. A.; APPEL, M. J. G. Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. **Journal of Comparative Pathology**, v. 94, p. 65-75, 1984.

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

THOMAS-BAKER, B. Vaccination-induced distemper in maned wolves, vaccination-induced corneal opacity in a maned wolf. **Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians**, p. 53, 1985.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta Veterinária em 5 Minutos: Espécies Canina e Felina**. 3. ed. Barueri: Manole, 2008. p. 1550.

TIPOLD, A.; VANDEVELDE, M.; JAGGY, A. Neurological manifestations of canine distemper virus infection. **Journal of Small Animal Practice**, v. 33, n. 10, 1992. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.1992.tb01024.x>> Acesso em: 13 jul. 2011.

VAN MOLL, P. *et al.* Distemper in wild carnivores: an epidemiological, histological and immunocytochemical study. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 193-199, 1995.

VANDEVELDE, M. *et al.* Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs. **Veterinary Pathology Online**, v. 17, n. 1, p. 17-29, 1980.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 271-280, 1995.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.

VON MESSLING, V. *et al.* The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, 2001.

WAKASA, C. *et al.* Sequence analysis of the genes encoding the phosphoprotein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science: the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 62, n. 1, p. 97-101, 2000.

ZHANG, Y. *et al.* Single endemic genotype of measles virus continuously circulating in China for at least 16 years. **PloS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34401, 2012.

ZHAO, J. J. *et al.* Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 34-42, 2010.