

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 09/04/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CINOMOSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS:
TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO
GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE**

Romeu Moreira dos Santos

Médico Veterinário

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CINOMOSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS:
TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO
GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE**

Discente: Romeu Moreira dos Santos

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira

Coorientador: Prof. Dr. Helio José Montassier

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal.

2018

| | |
|-------|---|
| S237c | <p>Santos, Romeu Moreira dos</p> <p>Cinomose em cães naturalmente infectados: técnicas diagnósticas e análise filogenética do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose / Romeu Moreira dos Santos. -- Jaboticabal, 2018</p> <p>44 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira</p> <p>Coorientador: Helio Jose Montassier</p> <p>1. Virologia. 2. Diagnóstico. 3. Filogenética. 4. Clínica médica de pequenos animais. 5. Imunologia. I. Título.</p> |
|-------|---|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

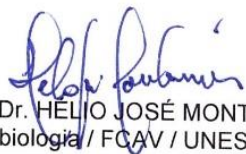
TÍTULO DA TESE: CINMOSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS: TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE

AUTOR: ROMEU MOREIRA DOS SANTOS

ORIENTADORA: MÁRCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

COORDENADOR: HÉLIO JOSÉ MONTASSIER

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:



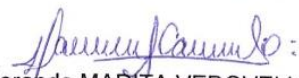
Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Microbiologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



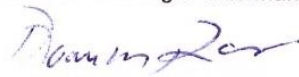
Prof. Dr. KETHERSON RODRIGUES SILVA
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



Prof. Dr. RUBEN PABLO SCHOCKEN ITURRINO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Pós-doutoranda MÁRITA VEDOVELLI CARDOZO
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. DIANE MEYRE RASSI
Departamento de Farmacologia / USP - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 09 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROMEU MOREIRA DOS SANTOS – Nascido em Maio de 1989 em Lagoa da Prata – MG. Graduado em Medicina Veterinária pela Faculdade Dr. Francisco Maeda (FAFRAM), Ituverava – SP, em dezembro de 2011. Realizou estágio no setor de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista - FCAV-UNESP Câmpus Jaboticabal-SP, entre agosto e outubro de 2011, sob orientação do Prof. Dr. Antônio Carlos Alessi. Entre outubro e dezembro de 2011 realizou estágio no Hospital Veterinário da FCAV-UNESP, sob orientação do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto. No início de 2012 foi inscrito no Conselho Regional de Medicina Veterinária do estado de São Paulo sob o número 31.854. Entre maio e julho de 2012 participou de um treinamento teórico e prático no laboratório de Imunologia e Virologia Veterinária na FCAV-UNESP, sob supervisão do Professor Dr. Helio José Montassier, nas área de imunologia, virologia e patologia aviária, onde também em agosto de 2012 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia Animal), sob orientação do Professor Dr. Helio José Montassier concluindo-o em dezembro de 2014. E em agosto de 2015 ingressou no Doutorado pelo mesmo programa, sob orientação da Professora Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira e coorientação do Professor Dr. Helio José Montassier.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS..... | ii |
| RESUMO..... | iii |
| ABSTRACT | iv |
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais..... | 1 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.2 REVISÃO DE LITERATURA | 4 |
| 1.2.1 Cinomose canina | 4 |
| 1.2.2 Etiologia..... | 4 |
| 1.2.3 Epidemiologia | 5 |
| 1.2.4 Patogenia | 6 |
| 1.2.5 Sinais clínicos..... | 8 |
| 1.2.6 Diagnóstico..... | 9 |
| 1.2.7 Tratamento e profilaxia | 12 |
| 1.2.8 Variantes do CDV | 12 |
| 1.3 REFERÊNCIAS | 14 |
| CAPITULO 2 - Comparação entre técnicas de Diagnóstico Direto para o Vírus da Cinomose | 17 |
| INTRODUÇÃO | 18 |
| MATERIAL E METÓDOS..... | 20 |
| RESULTADOS..... | 24 |
| DISCUSSÃO | 25 |
| CONCLUSÃO..... | 29 |
| REFERÊNCIAS..... | 29 |
| CAPITULO 3 - Caracterização filogenética do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina detectado em cães naturalmente infectados | 33 |
| INTRODUÇÃO | 34 |
| MATERIAL E METÓDOS..... | 35 |
| RESULTADOS..... | 37 |
| DISCUSSÃO | 39 |
| CONCLUSÃO..... | 41 |
| REFERÊNCIAS..... | 42 |

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 12209/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Citocinas inflamatórias e metaloproteinases em liquor e sangue associadas à análise filogenética do gene H do vírus da cinomose em cães naturalmente infectados**", sob a responsabilidade da Dr^a Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

Profª Drª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

CINOMOSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS: TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE

RESUMO - A cinomose canina é uma das enfermidades infectocontagiosas mais importantes que acomete os cães. É uma doença causada pelo vírus da Cinomose ("Canine Distemper Virus" - CDV), um *Paramyxovirus*, do gênero *Morbillivirus*, de ocorrência mundial, sem sazonalidade, sem predileção de sexo ou raça, apresenta maior incidência em animais jovens, podendo acometer todas as idades. No Brasil, pesquisas sobre o uso de técnicas que comparam os diferentes testes diagnósticos direto para o vírus da cinomose (CDV) associado a análise molecular e filogenética do mesmo ainda continuam escassas. Além disso, são poucos os estudos sobre epidemiologia molecular que relatam diferenças marcantes na análise filogenética do gene hemaglutinina (H) do CDV entre os isolados de campo e as cepas de referência do CDV, especialmente àquelas utilizadas na produção de vacinas. Dessa maneira, o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar os principais métodos diagnósticos laboratoriais para identificação do CDV em cães com suspeita de cinomose associando à análise filogenética do gene H dos isolados de campo. O Ensaio imunocromatográfico direto (IC), a RT-PCR e a Nested-PCR foram avaliados para detecção do CDV em diferentes amostras clínicas (urina, suabes retais e conjuntivais) de 62 animais suspeitos de cinomose, provenientes do atendimento ambulatorial do hospital veterinário da Unesp (Jaboticabal-SP) e de clínicas particulares da região. Após detecção viral as amostras foram submetidas a sequenciamento seguida de análise filogenética do gene H do CDV. Um total de 42 animais foram positivos em pelo menos uma das técnicas utilizadas neste experimento. As técnicas moleculares (RT-PCR e Nested-PCR) demonstraram maior sensibilidade que o ensaio comercial de IC. Os resultados obtidos da análise filogenética do gene H sugeriram que o grupo de isolados do CDV no Brasil são distintos das cepas vacinais e são mais relacionados genotipicamente aos isolados Europeus 1/Sul-Americanos 1. Em conclusão, a técnica Nested-PCR aplicada na detecção do CDV em suabes retais revelou-se o método mais eficaz e sensível para identificação desse vírus, que associado a análise filogenética pode ser classificado em um clado diferente das cepas vacinais sugerindo um potencial de infecção para os cães domésticos inclusive os vacinados.

Palavras-chaves: *Canis lupus familiaris*, Detecção viral, Filogenia, *Morbillivirus*.

DISTEMPER IN DOGS NATURALLY INFECTED: DIAGNOSTIC TECHNICAL AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE HEMAGGLUTININ GENE OF THE CANINE DISTEMPER VIRUS

ABSTRACT - Canine distemper is one of the most important infectious diseases that affects dogs. It is a Canine Distemper Virus (CDV), a Paramyxovirus, of the genus Morbillivirus, a global deforest, without seasonality, without predilection of sex or race, that is constituted by the majority of the animals, being able to affect all ages. In Brazil, research on the use of techniques that compare the different direct diagnostic tests for the distemper virus (CDV) associated with a molecular and phylogenetic analysis of the same are still scarce. In addition, there are some studies on molecular epidemiology that report differences in the phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene from CDV between the fields of action and as a reference for CDV, especially the practices used in the production of vaccines. Thus, the main objective of this study is to identify laboratory diagnoses for the identification of CDV in dogs with suspected pair association to the phylogenetic analysis of the H gene of the field isolates. The direct immunochromatographic (CI) assay, RT-PCR and nested-PCR were evaluated for the detection of CDV in different animal species (urine, swabs and conjunctival) of 62 suspected cases of distemper from the outpatient clinic of the Unesp (Jaboticabal-SP) and the private medical records of the region. After viral detection as sequential sequencing followed by phylogenetic analysis of the CDV H gene. A total of 42 animals were positive at least one of the experiment techniques in this experiment. As molecular techniques (RT-PCR and Nested-PCR) demonstrated greater sensitivity than the commercial IC test. The results obtained from the phylogenetic analysis of the H gene suggest that the group of CDV cells in Brazil are distinct from the vaccine strains and are more commonly genotyped to the following European 1 / South American 1. In conclusion, a Nested-PCR technique. CDV can be used as a more effective and sensitive method to virus infection, which is associated with a phylogenetic analysis that can be classified into one of the different clones of the vaccines, suggesting a potential for infection for animals that include the vaccinated.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, Viral detection; Phylogeny; Morbillivirus.

CAPITULO 1 - Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CC) é uma doença infectocontagiosa causada por um *Paramyxovirus*, do gênero *Morbillivirus*, de apresentação clínica sistêmica e/ou neurológica. O vírus da cinomose canina (CDV – “Canine distemper vírus”) é um vírus imunossupressor, com genoma constituído por RNA de fita simples e orientação negativa e, além disso, possui um envelope com duas proteínas estruturais (hemaglutinina e proteína de fusão) que lhe conferem, respectivamente, capacidade de tropismo tecidual e fusão celular com as células do hospedeiro.

Embora seja uma enfermidade mais comum em cães pode acometer outras espécies incluindo canídeos silvestres, mustelídeos e felídeos. Sua ocorrência é mundial, sem sazonalidade, sem predileção de sexo ou raça e apresenta maior incidência em animais jovens, embora possa acometer cães de todas as idades. A infecção pelo CDV apresenta uma alta taxa de morbidade e letalidade; aproximadamente cerca de 60-70% dos animais infectados vão a óbito, fazendo com que a letalidade dessa enfermidade fique atrás apenas da que é causada pelo vírus da raiva.

A CC ocorre frequentemente na rotina clínica com prognóstico, na maioria dos casos, de reservado a ruim, sendo que os animais que sobrevivem podem apresentar sequelas neurológicas principalmente caracterizadas pelos processos de desmielinização. Em geral, as alterações desmielinizantes estão relacionadas com a infecção direta pelo CDV em oligodentrócitos na fase aguda, e por processos imune-mediados na fase crônica.

O quadro clínico depende da idade do animal, do estado imunológico e da cepa viral. Somente um sorotipo do CDV tem sido descrito, porém tem sido demonstrado que os isolados de casos clínicos apresentam uma variabilidade genética que resulta em variabilidade antigênica considerável e ainda variações de patogenicidade (novos patotipos) e virulência nos hospedeiros.

A falta de padrões específicos nos exames laboratoriais de rotina torna o diagnóstico precoce mais laborioso. Na rotina clínica, o principal diagnóstico é

baseado nas manifestações clínicas dos cães, no entanto, as variações nos sinais clínicos da cinomose dificultam ainda mais sua diagnose.

Além disso, ensaios sorológicos diretos como testes de imunofluorescência, imunoenzimático (ELISA) e imunocromatográficos (IC) frequentemente utilizados para detecção viral podem confirmar a doença apenas no intervalo de 4 dias a 3 semanas após a infecção, pois após esse tempo o vírus geralmente desaparece no sangue e migra para outros órgãos ou para o sistema nervoso diminuindo a sensibilidade. Assim, nas formas subaguda ou crônica da doença, essas técnicas acabam produzindo resultados falso-negativos.

Por outro lado, os testes que priorizam a pesquisa de anticorpos anti-CDV, não possuem uma alta especificidade para diagnóstico da CC, pois altos títulos de anticorpos anti-CDV podem ser um resultado de vacinação prévia, bem como infecção subclínica ou clínica. Ademais, durante uma grave infecção, títulos de anticorpos podem ser baixos devido às fortes propriedades imunossupressoras do CDV.

Atualmente o teste imunocromatográfico direto para detecção qualitativa do CDV em diversos tipos de amostras (suabe conjuntival, sangue, urina e etc) é o método mais utilizado na prática ambulatorial veterinária. Normalmente em forma de kit, o exame é rápido, seguro, altamente específico e sensível, com leitura visual de fácil interpretação, não necessitando de instrumentação. Entretanto, cães vacinados contra a CC não devem ser testados pelo o kit, a menos que seja respeitado o intervalo de 15 dias entre a vacinação e a realização do teste, pois após esse período, os antígenos virais da vacina não são mais detectados, o que evita a ocorrência de falso-positivos. Já, animais tratados com soros hiperimunes anti-CDV podem gerar falso-negativos nesse teste, pois os anticorpos circulantes no sangue podem neutralizar o antígeno viral que seria detectado pelo kit cromatográfico.

Com o surgimento de técnicas de diagnóstico molecular, o genoma do CDV, ou partes dele podem ser detectados em amostras biológicas frescas com alta sensibilidade, especificidade e rapidez. Nesse contexto, sabe-se que a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), precedida de transcrição reversa (RT), vem sendo empregada com sucesso na detecção do CDV em diferentes tipos de amostras biológicas.

Segundo a literatura, o aparecimento de surtos de CC nas últimas décadas em animais vacinados e não vacinados foram consequência de infecções naturais com cepas de campo não relacionadas às vacinais. Isto levanta a questão de saber se as vacinas atuais efetivamente protegem contra isolados de campo do CDV.

Além disso, vários estudos mostraram diferenças antigênicas entre cepas de vacinas e isolados de campo. Recentemente, sugeriu-se que cepas distintas de CDV estavam circulando em algumas cidades brasileiras, no entanto, parecem fazer parte de um clado sul-americano distinto de CDV.

Embora a CC seja endêmica no Brasil, as informações sobre a epidemiologia molecular dessa infecção viral são escassas. Por isso há necessidade de desenvolver estratégias mais apropriadas e eficientes para fazer a caracterização mais completa dos novos isolados variantes do CDV no Brasil, em especial quanto às propriedades genotípicas do gene H e da glicoproteína correspondente e aos perfis de patogenicidade dessas cepas. Isso permitiria também caracterizar melhor os patotipos dos vírus envolvidos em surtos da doença, bem como estabelecer por estudos *in silico* as relações de variações encontradas na sequência deduzida de aminoácidos da glicoproteína H com variações nos sítios antigênicos neutralizantes mais importantes do CDV, que poderiam caracterizar o gradual distanciamento de novos isolados do CDV com relação às cepas vacinais de referência desse vírus, acarretando uma baixa imunidade-cruzada e conseqüentemente em menor nível de proteção contra essas variantes do CDV.

Dessa maneira o presente trabalho tem como principal objetivo avaliar os principais métodos de diagnósticos laboratoriais para identificação do CDV em cães com suspeita de cinomose associando à análise filogenética do gene H dos isolados de campo.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que um grupo de cepas do CDV da região Sudeste (Norte do Estado de São Paulo) no Brasil são, com base nas sequências do gene H, distintos das cepas vacinais e próximos genotipicamente dos

isolados Europeus 1/Sul-Americanos 1. Ademais, os nossos resultados indicam também para um maior potencial de infecção dessas cepas do CDV para cães domésticos, inclusive para os animais vacinados, apesar de que para melhor elucidar isso, estudos de imunogenicidade e patogenicidade mais amplos são necessários a fim de caracterizar mais acuradamente essas novas cepas e na tentativa de associar tais características com as falhas na proteção vacinal, e assim, futuramente propor uma nova estirpe homóloga vacinal para testes em experimentos de imunização e proteção cruzada de cães.

REFERÊNCIAS

An, D.J.; Kim, T.Y.; Song, D.S. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. **Journal of Virological Methods**, v. 147, p. 244-249, 2008.

Blancou, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? **The history of veterinary medicine**. 29, 35–41. 2004.

Brinkhof, B., Spee, B., Rothuizen, J., Penning, L. C. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Analytical Biochemistry**. 356, 36–43. 2006.

Budaszewski, R.F., Pinto, L.D., Weber, M.N., Caldart, E.T., Alves, C.D.T., Martella, V., Ikuta, N., Lunge, V.R., Canal, C.W. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. **Virus Research**. 180, 76–83. 2014.

Espinal, M.A., Díaz, F.J., Ruiz-Saenz, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. **Veterinary Microbiology**. 172, 168–176. 2014.

Fischer, C. D. B.; Gräf, T; Ikuta, N.; Makiejczuk, A.; Lehmann, F.; Passos, D. T.; Silveira Jr, M. A. T.; Fonseca, A. S. K.; Canal, C. W.; Lunge, V. R. Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. **Infection, Genetics And Evolution**, 41, p.135-141, 2016.

Hashimoto, M.; Une, Y.; Mochizuki, M. Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. **Archives of Virology**. 146: 149–155. 2001.

Headley, S.A., Amude, A.M., Alfieri, A.F., Bracarense, A.P.F.R.L., Alfieri, A.A. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus induced infections in Brazil: a review. **Semina Ciências Agrárias**. 33, 1945–1978. 2012.

Iwatsuki, K., Tokiyoshi, S., Hirayama, N., Nakamura, K., Ohashi, K., Wakasa, C., Mikami, T., Kai, C. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**. 71, 281–286. 2000.

Jóźwik, A., Frymus, T. Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. **Journal of veterinary medicine**. 49, 413–414. 2002.

Lan, N.T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S., Tateyama, S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. **Veterinary Microbiology**. 115, 32–42. 2006.

Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Blixenkron-Møller, M., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**. 116, 301–309. 2006.

Martinez-Gutierrez, M.; Ruiz-Saenz, J. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. **BMC Veterinary Research**. 12:78. 2016.

McCarthy, A.J., Shaw, M.A., Goodman, S.J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. 274, 3165–3174. 2007.

McCarthy, A.J., Shaw, M.A., Goodman, S.J. Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. **Proceedings of the Royal Society - biological sciences**. 274, 3165–3174. 2007.

Negrão, F.J., Gardinali, N.R., Headley, S.A., Alfieri, A.A., Fernandez, M.A., Alfieri, A.F. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. **Genetics and Molecular Research Journal**. 12, 2549–2555. 2013.

Nikolin, V.M., Wibbelt, G., Michler, F.U., Wolf, P., East, M.L. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. **Veterinary Microbiology**. 156, 45–53. 2012.

Norris, J.M., Krockenberger, M.B., Baird, A.A., Knudsen, G. Canine distemper: reemergence of an old enemy. **Australian Veterinary Journal** 84, 362–363. 2006.

Panzer, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J., Pérez, R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. **Virus Research**. 163, 401–404. 2012.

Panzer, Y., Sarute, N., Carrau, L., Aldaz, J., Pérez, R. Genetic Diversity of Canine Distemper Virus in South America. **British Journal of Virology**. 1: 48-53. 2014.

Panzer, Y., Sarute, N., Iraola, G., Hernández, M., Pérez, R. Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 92, 147–154. 2015.

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**. 8, p. 5009-5017. 2005.

Rosa, G. N., Domingues, H. G., Santos, M. M., Bianchi, F., Paulo, A. N., Spilki, F. R., Arns, C. W. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 32(1), 72-7. 2012.

Sarute, N., Pérez, R., Aldaz, J., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Name, D., Llanes, J., Hernández, M., Francia, L., Panzer, Y. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. **Virus Genes**. 48, 474–478. 2014.

Sattler, U., Khosravi, M., Avila, M., Pilo, P., Langedijk, J.P., Ader-Ebert, N., Alves, L.A., Plattet, P., Origgi, F.C. Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. **Journal of Virology**. 88, 8057–8064. 2014.

Sawatsky, B.; Von, V. M. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. **Journal of Virology**. 84, 2753–2761. 2010.

Simon-Martínez, J., Ulloa-Arvizu, R., Soriano, V.E., Fajardo, R. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. **Veterinary Journal**. 175,423–426. 2008.

Zhao, J.J., Yan, X.J., Chai, X.L., Martella, V., Luo, G.L., Zhang, H.L., Gao, H., Liu, Y.X., Bai, X., Zhang, L., Chen, T., Xu, L., Zhao, C.F., Wang, F.X., Shao, X.Q., Wu, W., Cheng, S.P. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. **Veterinary Microbiology**. 140, 34–42. 2010.