

**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.

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

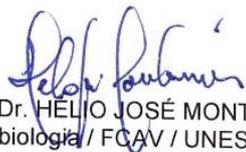
TÍTULO DA TESE: CINMOSE EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS: TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINMOSE

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:



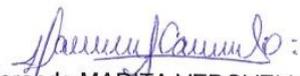
Prof. Dr. HÉLIO JOSÉ MONTASSIER
Microbiologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



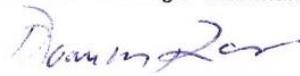
Prof. Dr. KETHERSON RODRIGUES SILVA
Departamento de Medicina Veterinária / Centro Universitário Barão de Mauá - Ribeirão Preto/SP



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 áreas 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.

Prof^a Dr^a 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 imunocromatográficos 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.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Cinomose canina (CC)

A cinomose canina (CC) é uma doença infecto-contagiosa febril que apresenta distribuição mundial e acomete diversas espécies de carnívoros, inclusive os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) (Arns et al., 2007).

A CC é mencionada desde o século XVIII, mas foi em 1809 que ocorreu a primeira descrição clínica e, apenas 100 anos depois, foi confirmada a etiologia viral dessa doença, com a consagração de tal postulado em 1926. A doença é descrita como enfermidade enzoótica e, em grande parte se apresenta na forma subclínica, na qual os animais infectados eliminam o vírus no ambiente, constituindo um relevante elemento e de difícil forma de controle dessa virose (Barret, 2010).

1.2.2 Etiologia

O vírus da cinomose (CDV – *canine distemper vírus*) é um membro da família *Paramyxoviridae* pertencente ao gênero *Morbillivirus*, sendo antigenicamente relacionado com o vírus do sarampo, com o vírus da peste dos pequenos ruminantes e com o vírus da peste bovina (Deem et al., 2000).

O genoma do CDV é composto de uma molécula de RNA de fita simples com cerca de 15,5 kb e polaridade negativa, que codifica seis proteínas: proteína da matriz (M), proteína de fusão (F), hemaglutinina (H), nucleoproteína (N), polimerase (L) e fosfoproteína (P), das quais as mais estudadas são a hemaglutinina e a nucleoproteína, cujos genes são comumente utilizados para estudos filogenéticos (Figura 1) (Pardo et al., 2005).

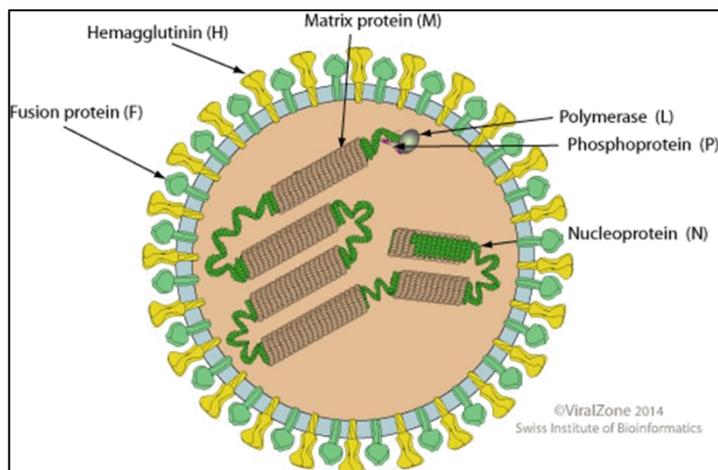


Figura 1. Partícula viral do vírus da cinomose canina (Fonte: VIRALZONE, 2018).

A hemaglutinina está presente na superfície do envelope viral e é responsável pela ligação dos vírions a receptores da célula hospedeira e tem um papel importante na indução de imunidade específica pelo hospedeiro, além de exercer função relevante na neuro-invasividade do CDV, em razão de possuir sítios envolvidos na interação com receptores presentes nas células do sistema nervoso. Além disso, o gene que codifica a proteína H é altamente polimórfico e pode ser utilizado para análises filogenéticas do CDV (Arns et al., 2007; Rosa et al., 2012).

Apesar de induzir altas taxas de morbidade e mortalidade, o CDV é facilmente destruído por desinfetantes comuns possuindo também alta sensibilidade às condições ambientais de temperatura e radiação solar (Martella et al. 2008; Rosa, et al., 2012; Sawatsky e Von, 2010).

1.2.3 Epidemiologia

A infecção pelo CDV é enzoótica no mundo inteiro, sendo que a doença por esse vírus ocorre com maior frequência em cães jovens não vacinados. Falhas vacinais, associadas com esquemas de vacinação inadequados ou mesmo com vacinas comerciais de baixa qualidade, podem resultar na ocorrência de doença mesmo em cães vacinados. No Brasil e em outros países em desenvolvimento a situação epidemiológica da cinomose é semelhante e apresenta uma frequência relativamente elevada da ocorrência dessa enfermidade. Entretanto, essa situação é diferente em países desenvolvidos que conseguiram reduzir a incidência da doença

pela vacinação massiva, mas ainda apresentam surtos esporádicos de cinomose (Arns, et al., 2007; Nelson e Couto, 2010).

O contato direto com as secreções nasais, orais e urina de animais infectados se constitui na principal forma de transmissão do CDV. A disseminação do vírus a curtas distâncias por aerossóis também parece ocorrer com certa frequência. A transmissão por fômites e no ambiente nosocomial também tem sido descrita. Após a infecção, os animais excretam o vírus nos fluidos corporais por períodos prolongados de até 90 dias (Arns, et al., 2007; Nelson e Couto, 2010).

1.2.4 Patogenia

Em relação a sua patogenia, durante a exposição natural, o vírus da cinomose se propaga de um hospedeiro para outro principalmente por gotas de aerossóis eliminadas por um animal infectado que entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior de outro animal. Em 24 horas, as partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pela via linfática local, para tonsilas e linfonodos brônquicos. Seguindo esta multiplicação local o CDV é então difundido pelo sistema linfático e sangue aos tecidos hematopoiéticos distantes durante a primeira fase de viremia em aproximadamente 48 horas após a exposição. Com a infecção do sistema linfoide, pode ocorrer imunossupressão, resultando em infecções bacterianas secundárias como conjuntivite, rinite e broncopneumonia, que são comumente vistas nas infecções por CDV (Figura 2) (Vandeveld e Zurbriggen, 1995).

Quatro a seis dias após a viremia preliminar, uma segunda viremia ocorre intensamente via tráfego leucocítico. O CDV passa a se disseminar a partir da mucosa respiratória, da vesícula urinária e do trato gastrointestinal, para o epitélio de outras superfícies mucosas e também para os tecidos do sistema nervoso central (SNC), no período de oito a 10 dias pós-infecção, por via hematogena ou pelo líquido, após viremia (Khuth, et al., 2001; Vandeveld e Zurbriggen, 1995).

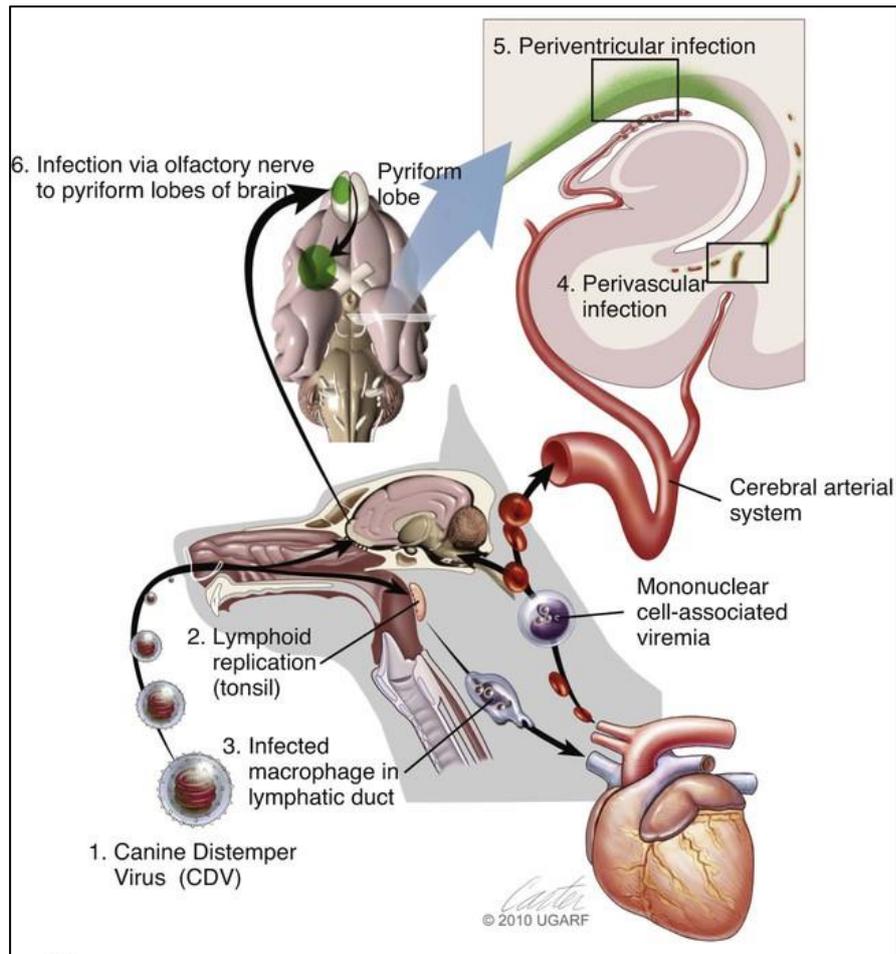


Figura 2. Fisiopatogenia do vírus da cinomose canina (Fonte: GREENE e VANDEVELDE, 2018)

Alguns estudos sugerem que a infecção do sistema nervoso central (SNC) pelo CDV ocorre precocemente, na fase sistêmica da doença. Neste caso, a cinomose progride da forma sistêmica para a neurológica, aparentemente por falha do sistema imune levando ao desenvolvimento de polioencefalomielite, encefalomielite desmielinizante ou de ambas (Khuth, et al., 2001; Mangia e Paes, 2008).

A encefalomielite de modo geral é iniciada após entrada viral no SNC, o tráfego leucocitário dissemina o CDV para as substâncias cinzenta e branca do SNC e para as células epiteliais e macrófagos do plexo coroide. O vírus é transferido das células epiteliais e endoteliais do plexo coroide para dentro do líquido cefalorraquidiano (LCR) nos macrófagos infectados. Ele é também disseminado através do sistema ventricular e das células endoteliais infectadas que revestem o sistema ventricular e, então, se espalha localmente para infectar astrócitos e micróglia. As lesões

periventriculares da substância branca, especialmente aquelas que circundam o quarto ventrículo, são o resultado dessa sequência de eventos (Mangia e Paes, 2008).

1.2.5 Sinais Clínicos

A maioria das infecções pelo CDV é, provavelmente, subclínica ou associada a sinais discretos de infecção na porção superior do trato respiratório que se resolvem sem tratamento, porém quando a imunidade do animal é afetada o mesmo desenvolverá a doença. O primeiro sinal de infecção é a presença de secreção nasal ou ocular, serosa a mucopurulenta, seguida por tosse seca e, às vezes, tonsilite. Com o desenvolvimento de pneumonia, a tosse se torna produtiva. Os cães acometidos apresentam depressão, inapetência e, com frequência, febre. Há diarreia, que pode ser discreta ou grave. Os coxins plantares e o nariz podem apresentar hiperqueratose (Figura 3) (Nelson e Couto, 2010).



Figura 3. Cão infectado pelo CDV apresentando secreção nasal e hiperqueratose em plano nasal (Fonte: Cristina, 2018)

Os sinais neurológicos se iniciam uma a três semanas depois que o cão começa a se recuperar da doença sistêmica e podem incluir demência, desorientação, convulsões, sinais cerebelares ou vestibulares, tetraparesia e ataxia. A dor cervical é incomum. As convulsões podem ser de qualquer tipo, dependendo da região do cérebro envolvida, mas as convulsões com movimentação intensa da mandíbula,

causadas pela polioencefalomalacia dos lobos temporais, são comumente descritas. A mioclonia, uma contração rítmica repetitiva de um grupo de músculos que resulta em flexão repetida de um membro ou contrações dos músculos mastigatórios, é muitas vezes denominada *coreia da cinomose* e é bastante comum em cães com encefalomielite relacionada com a doença (Dias et al., 2012).

Em alguns cães infectados, observam-se uveíte anterior, neurite óptica ou coriorretinite. Os cães que sobrevivem à infecção menos grave pelo CDV antes da erupção dos dentes permanentes costumam apresentar superfícies dentárias irregulares e descoloração dentária amarronzada, devido a hipoplasia do esmalte induzida pelo vírus. Animais mais velhos ocasionalmente desenvolvem encefalomielite crônica meses ou anos após se recuperarem de uma infecção prévia pelo CDV (encefalomielite do cão idoso), com anomalias neurológicas que incluem tetraparesia progressiva ou disfunção vestibular na ausência de sinais sistêmicos (Dias et al., 2012; Nelson e Couto, 2010).

1.2.6 Diagnóstico

O diagnóstico inicial de infecção pelo CDV baseia-se no histórico e nos resultados do exame físico enquanto que o diagnóstico confirmatório depende dos exames laboratoriais para isolamento do agente ou para a detecção de genes ou regiões gênicas específicas do CDV por técnicas moleculares ou alternativamente da detecção de antígenos virais por técnicas imunológicas, podendo também se buscar a detecção de anticorpos específicos contra o CDV por técnicas sorológicas (Elia et al., 2006; Noon et al., 1980).

Cães com cinomose podem apresentar alterações típicas ao hemograma como neutropenia, caracterizada pela redução absoluta do número de neutrófilos segmentados, que pode ser explicada por três mecanismos fisiopatogênicos, tais como a diminuição de produção pela medula óssea, a destruição e o aumento da demanda tecidual. A anemia é uma alteração relacionada ao CDV, assim como a imunossupressão e a encefalomielite. No entanto parece não haver fundamentação biológica entre a infecção pelo CDV e a anemia, uma vez que o vírus não tem tropismo por eritrócitos ou por seus precursores nucleados intramedulares (Greene e Appel, 1998).

A linfopenia é um achado consistente para auxiliar no diagnóstico clínico nos casos de cinomose aguda, já que o CDV tem tropismo por células linfóides. Além disso, pode-se observar trombocitopenia no início do curso da moléstia (Swango, 1997; Sherding, 2003; Silva et al, 2005).

Foi demonstrado também que filhotes de cães experimentalmente infectados com o CDV desenvolveram trombocitopenia, que parece ser provocada por um processo de destruição imunomediada de plaquetas e que é independente da ativação do sistema complemento, apesar de que a origem dos imune-complexos e sua orientação para a superfície das plaquetas são desconhecidas, bem como a trombocitopenia em infecções naturais pelo CDV em canídeos (Silva et al., 2005).

Ademais, cães e outras espécies vacinadas com vírus vivo modificado da cinomose podem desenvolver trombocitopenia branda a severa, com diminuições transitórias na concentração de plaquetas. Embora sangramento tenha sido relatado de 1 a 21 dias após a vacinação, estudos mais avançados dessas observações não foram publicados. É interessante ressaltar que a púrpura trombocitopênica aguda têm ocorrido em humanos vacinados contra o sarampo, caxumba e rubéola, geralmente 2 a 3 semanas após a vacinação. Ainda, a presença de auto-anticorpos específicos contra plaquetas, tem sido relatada em pessoas com sarampo, HIV, e outras doenças virais, mas o seu papel na patogenia da trombocitopenia viral é praticamente desconhecida (Scott, 2000).

O CDV pode ser detectado em secreções, excreções e em suabes de conjuntiva, através de kits de imunoenaios cromatográficos (IC) que detectam a presença de antígenos virais na amostra biológica (Figura 4). O kit comercial imunocromatográfico é um método modificado de detecção direta de antígeno que evidencia a interação antígeno-anticorpo, embora alguns trabalhos relatam interferência no padrão do teste em animais vacinados com vacinas vivas, ainda assim, ele tem sido utilizado nas clínicas e consultórios veterinários como apoio laboratorial no diagnóstico *ante mortem* do CDV (An et. al., 2008; Martella et al, 2008)

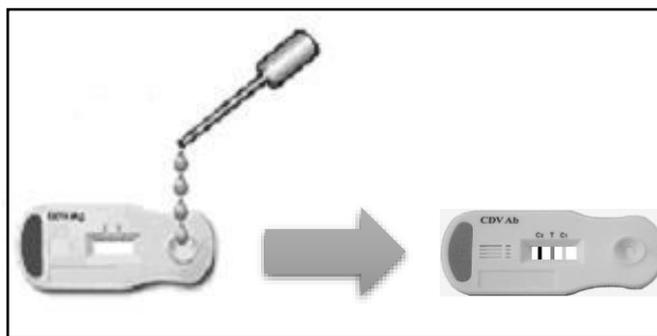


Figura 4. Teste imunocromatográficos utilizado para detecção direta do vírus da cinomose (Fonte: adaptado de Calado, 2018)

Outro método passível de ser realizado é a pesquisa de corpúsculos de inclusão, presentes em células de tecidos ou fluidos biológicos, observadas no esfregaço em lâmina. Por ser encontrada na fase de viremia da cinomose, apesar da baixa frequência, a detecção desses corpúsculos de inclusão é considerada uma ferramenta de diagnóstico precoce (Silva et al, 2005; Swango, 1997).

Além de exames laboratoriais, as técnicas moleculares de RT-PCR são altamente sensíveis para detectar e identificar a presença do vírus da cinomose em amostras biológicas. O CDV pode ser detectado pela técnica RT-PCR (reverse transcription – polymerase chain reaction), que é considerada um método específico de diagnóstico (Tozato et al., 2016). Segundo Fischer et al. (2016), amostras de sangue total, soro, urina e líquido podem ser mais sensíveis para a detecção de CDV por RT-PCR do que técnicas que demonstram antígenos e anticorpos, porém ainda essas técnicas têm custo oneroso para ser utilizada rotineiramente.

Diversos estudos com o uso da RT-PCR foram relatados, onde foram utilizados oligonucleotídeos direcionados para diferentes genes do CDV, principalmente da fosfoproteína, da hemaglutinina e da nucleoproteína (Elia et al., 2006; Tozato et al., 2016).

Embora, a sensibilidade e a especificidade da RT-PCR sejam influenciadas pelo tipo de oligonucleotídeo selecionado, os resultados mostram que esta é uma técnica confiável para a detecção do vírus da cinomose, inclusive para ser utilizada posteriormente em técnicas de sequenciamento (Espinal et al., 2014; Martinez-Gutierrez, Ruiz-Saenz, 2016).

No entanto, no intuito de aumentar a sensibilidade e especificidade para detecção do CDV nos métodos moleculares alguns autores recomendam o uso da técnica de Nested-PCR. Sua metodologia consiste em usar uma amostra primária derivada de um produto já amplificado por uma PCR anterior com um par de primers internos ao par utilizado na primeira reação, ou seja, é a PCR do produto da PCR. Apesar desta técnica apresentar demasiado tempo para aferição dos resultados finais é indicada para pequenas quantidades de amostras nas diferentes fases da doença viral (Silva et al., 2005; Tozato et al., 2016).

1.2.7 Tratamento e profilaxia

O tratamento para a cinomose é de suporte, não específico e, com frequência, insatisfatório. Já, a prevenção dessa enfermidade infecciosa depende da vacinação com cepas atenuadas ou vacinas com vírus vivo modificado e vacinas recombinantes (poxvírus aviário como vetor do DNA complementar [cDNA] dos genes das proteínas H e F do CDV), em formulações mono ou polivalentes, que é a estratégia mais utilizada no combate a cinomose. O sucesso das vacinas disponíveis depende da variabilidade antigênica existente entre isolados do CDV, além da qualidade dos imunógenos e da resposta dos indivíduos vacinados (Arns et al., 2007; Dias et al., 2012; Martella et al. 2008).

1.2.8 Variantes do CDV

Ainda que seja reconhecido um único sorotipo do CDV, surtos ocorridos nos últimos anos nos Estados Unidos e estudos de filogenia com base principalmente no gene H realizados também em outros países têm apontado para um distanciamento genético entre as amostras de CDV utilizadas como cepas vacinais e as cepas circulantes na população canina (Demeter et al., 2010; Iwatsuki et al., 2000; Martella et al., 2006; Wowa et al., 2010).

Estudos realizados no Brasil utilizando a análise filogenética dos genes H e/ou N do CDV apontaram diferenças entre amostras circulantes de cidades do estado de São Paulo e as cepas comumente utilizadas na produção de vacinas contra o CDV e comercializadas no país (Castilho et al. 2007; Rosa, et al., 2012).

Budaszewski et al. (2014) observaram com base na análise filogenética do gene H em amostras de animais colhidas de várias regiões do Brasil, variantes pertencentes ao genótipo América do Sul-1/Europa, que inclui isolados do sul do Brasil, Uruguai, Argentina e países europeus e ao genótipo Rockborn, que inclui genótipos isolados na China e EUA.

Adicionalmente Espinal et. al. (2014), através de estudos filogenéticos evidenciaram uma nova linhagem circulante em amostras colhidas na Colômbia, na qual denominou América do Sul-4, devido às diferenças marcantes entre os isolados colombianos e de outras regiões ao redor do mundo, inclusive as principais estirpes vacinais.

Assim, fica evidenciado que as relações dos parâmetros de patogenicidade e de filogenia, entre os isolados brasileiros e as estirpes de referência do CDV provenientes de outros países, especialmente àquelas utilizadas na produção de vacinas, ainda não é muito bem conhecida, de forma que investigações adicionais são necessárias para melhor caracterizar as mudanças causadas por mutações gênicas na proteína H dos isolados de CDV de nosso país.

1.3 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.

Arns, C. W.; Spilki, F. R.; Almeida, R. S. Paramyxoviridae: Vírus da Cinomose. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ufsm, p. 674-677, 2007.

Barret, T. Distemper viruses. In: Mahy BVRM, editor. **Desk encyclopedia of animal and bacterial virology**. Elsevier: San Diego;p. 221–31. 2010.

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

Calado, André. **Imunocromatografia e Dot-Elisa**. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/14012241-Imunocromatografia-e-dot-elisa-andrea-calado.html>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

Castilho, J. G.; Brandão, P. E.; Carnieli, J. R. P.; Oliveira, R. N.; Macedo, C. I.; Peixoto, Z. M. P.; Carrieri, M. L.; Kotait, I. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arq. Bras. Medicina Veterinária e Zootecnia*. 59:654-659, 2007.

Cristina. **Moquillo**. Disponível em: <<http://gossosgelida.blogspot.com/2012/12/que-es-el-moquillo.html>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

Deem, S.L.; Spelman, L.H.; Yates, R.A.; Montali, R.J. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. **Journal Zoo Wild Medicine**. 31, 441–51. 2000.

Demeter, Z.; Palade, E. A.; Hornyák, Á.; Rusvai, M. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, v.142, p. 420-426, 2010.

Espinal, M. A.; Francisco, J. D.; Ruiz-Saenz, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper vírus 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.

Greene, C. E.; Appel, M. J. Canine distemper. In: GREENE, G. E. **Infectious diseases of the dog and the cat**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 9-22, 1998.

Greene, C. E.; Vandeveld, M. **Canine distemper**. Disponível em: <<https://veteriankey.com/canine-distemper/>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

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.

Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K. Antigenic differences in the H proteins of caninedistemper viruses. **Veterinay Microbiology**. 71: 281-286. 2000.

Khuth, S. T. Morbillivirus Infection of the Mouse Central Nervous System Induces RegionSpecific Upregulation of MMPs and TIMPs Correlated to Inflammatory Cytokine Expression. **Journal of Virology**, 75, p. 8268-8282, 2001.

Mangia, S.H.; Paes, A.C. Neuropatologia da cinomose. **Veterinária e Zootecnia**. 3, p.416-427, 2008.

Martella, V.; Cirone, F.; Elia, G.; Lorusso, E. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**. 116: 301-309. 2006.

Martella, V.; Elia, G.; Buonavoglia, C. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. Italy, v. 38, p. 787-797, 2008.

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.

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** 12: 2549-2555. 2012.

Nelson, R. W.; Couto, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 4.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

Noon, K. F.; Rogul, M.; Binn, L. N.; Keefe, T. J.; Marchwicki, R. H.; Appel, M. J. Enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of antibody to canine distemper virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, n. 4, p. 605-609, 1980.

Norris, J.M.; Krockenberger, M.B.; Baird, A.A.; Knudsen G. Canine distemper: re-emergence of an old enemy. **Australian Veterinary Journal**.v.84, p.362-363, 2006.
Panzer, Y., Sarute, N., Iraola, G., Hernández, M., Pérez, R. Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. **Molecular Phylogenetic 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

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

Scott, M.A. **Immune-mediated thrombocytopenia**. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5^o ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. Cap. 68. pag 478 – 484. 2000.

Sherding, R. G. Cinomose. In: Birchard, S. J., Sherding, R. G., **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 2 ed. São Paulo: Roca, p. 117-120, 2003.

Silva, I.N.G., Guedes, M.I.F., Rocha, M.F.G., Medeiros, C.M.O., Oliveira, L.C., Moreira, O.C., Teixeira, M.F.S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57: 136-139. 2005

Swango, L. J. Moléstias virais caninas. In: Ettinger, S. J., Feldman, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4 ed. Manole, p. 576-580. 1997.

Tozato, C. C.; Zadra, V. F.; Basso, C. R.; Araujo Jr, J. P. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. **Ciência Rural**, 46, p.1601-1606, 2016.

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

Viralzone. **Morbillivirus**. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/86?outline=all_by_protein>. Acesso em: 10 nov. 2018.

Woma, T.; Van, V. M.; Bosman, A.; Quan, M. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. **Veterinary Microbiology**. 143: 126-132. 2010.

CAPÍTULO 2 – Comparação entre técnicas de Diagnóstico Direto para o Vírus da Cinomose

Direct comparison of diagnostic techniques for canine distemper virus

Resumo: No Brasil, existem poucos estudos que comparam os diferentes testes diagnósticos direto para o vírus da cinomose (CDV) e o tipo de amostra biológica utilizada para detecção do mesmo. Neste sentido, o objetivo deste experimento foi realizar uma análise comparativa entre as diferentes técnicas de detecção viral e avaliar quais delas constituem o melhor auxílio para embasar um diagnóstico de suspeição ou mesmo diagnóstico definitivo da cinomose canina. O Ensaio imunocromatográfico (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 Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Unesp - Câmpus de Jaboticabal-SP, e de clínicas particulares da região. 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. 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. A aplicabilidade imediata desta combinação na rotina clínica-laboratorial mesmo em animais assintomáticos para cinomose, poderia ajudar a reduzir a morbidade e a mortalidade da doença.

Palavras-chaves: *Morbillivírus*; Reação em cadeia da polimerase; Teste imunocromatográfico; Transcrição reversa.

Abstract: In Brazil, there are few studies that compare the different direct diagnostic tests for the distemper virus (CDV) and the type of biological sample used to detect it. In this sense, the objective of this experiment was to perform a comparative analysis between the different techniques of viral detection and to evaluate which of them constitute the best aid to support a diagnosis of suspected or even definitive diagnosis

of canine distemper. The immunochromatographic (IC) assay, RT-PCR and Nested-PCR were evaluated for the detection of CDV in different clinical samples (urine, rectal and conjunctival swabs) of 62 suspected cases of distemper from the outpatient clinic of the Veterinary Hospital Governador Laudo Natel of the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences (FCAV) - Unesp - Câmpus de Jaboticabal-SP, and private clinics in the region. A total of 42 animals were positive in at least one of the techniques used in this experiment. Molecular techniques (RT-PCR and Nested-PCR) demonstrated greater sensitivity than the commercial IC assay. In conclusion, the Nested-PCR technique applied in the detection of CDV in rectal swabs proved to be the most effective and sensitive method for identifying this virus. The immediate applicability of this combination in the clinical-laboratory routine even in asymptomatic animals for distemper, could help reduce the morbidity and mortality of the disease.

Key-words: Morbillivirus; Polymerase chain reaction; Immunochromatographic test; Reverse transcription.

INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CC) é uma doença infecciosa de etiologia viral que apresenta distribuição mundial. Essa doença acomete diversas espécies de carnívoros domésticos e selvagens como raposas, furões, leões, leopardos, guepardos e tigres. No entanto, são os cães domésticos (*Canis familiaris*) os principais animais afetados e nos quais a cinomose se manifesta como a principal enfermidade infecciosa (Barret, 1999; Martinez-Gutierrez e Ruiz-Saenz, 2016; Loots et al., 2017).

O vírus da cinomose (CDV – “canine distemper vírus”) é um membro do gênero *Morbillivirus*, pertencente à família *Paramyxoviridae*, apresenta vírion envelopado e pleomórfico contendo genoma constituído por uma única cadeia de RNA de sentido negativo. Ainda, o genoma viral codifica seis proteínas estruturais principais, sendo a hemaglutinina (H) e a proteína de fusão (F) as responsáveis pela interação do vírus com receptor da célula a ser infectado e pelo processo de fusão, respectivamente, que são críticos no início da infecção das células alvo desse vírus (Arns et al., 2007; MacLachlan e Dubovi, 2011).

A CC apresenta, para os cães domésticos, uma alta taxa de morbidade variando de 25 a 75%, e de mortalidade, que varia entre 50-90%, sendo que essas taxas ficam atrás apenas das apresentadas pela raiva. No Brasil a cinomose é endêmica e ocorre com maior frequência no inverno. Já, em países desenvolvidos localizados na América do Norte e na Europa, a cinomose se caracteriza por ser esporádica (Budaszewski et al., 2014; Greene e Vandeveld, 2012).

Os sinais clínicos da cinomose são variáveis, apresentando manifestações de acometimento neurológico e/ou multissistêmico, o que depende da virulência da cepa viral, das condições ambientais, da idade e do estado imunológico do hospedeiro (Arns et al., 2007; Loots et al., 2017).

Clinicamente, animais com CC podem apresentar febre bifásica, sinais gastrintestinais, respiratórios, neurológicos e lesões cutâneas. A mioclonia é altamente sugestiva da cinomose canina, porém, pode não estar presente (Amude et al., 2007; Greene e Vandeveld, 2012; Takenaka et al., 2016).

No entanto, devido à falta de um único padrão de sinais clínicos na cinomose, semelhanças com outras patologias que acometem os cães e em razão de sua rápida disseminação, as técnicas de diagnóstico laboratorial da CC são fundamentais para elucidar o diagnóstico etiológico dessa doença (Amude et al., 2006; Headley et al., 2015).

Historicamente, a CC tem sido diagnosticada por técnicas de imunofluorescência e soroneutralização. Essas técnicas, entretanto, demandam demasiado tempo para análise e amostras com grande quantidade de partículas virais. Com o surgimento de novos métodos de diagnóstico como o imunoenensaio cromatográfico e as técnicas moleculares de RT-PCR convencional, Nested-PCR e RT-PCR em tempo real, a aplicabilidade e acurácia analítica dos resultados aumentaram significativamente (Fischer et al., 2013; Kapil e Neel, 2015).

O teste imunocromatográficos (IC) tem sido utilizado com uma certa frequência para o diagnóstico direto do CDV, pois detecta antígenos desse vírus presentes em materiais biológicos como secreção ocular (conjuntiva), secreção nasal, urina, soro, líquido e plasma. Ademais, a realização deste exame pode ser feita no ambulatório veterinário e os resultados são obtidos entre 5 e 15 minutos. Por outro lado, as técnicas moleculares podem requerer condições mais complexas de laboratório e de

operação, mas fornecem resultados mais confiáveis na detecção do CDV, devido aos seus altos níveis de sensibilidade e especificidade (An et al., 2008; Basso et al., 2013; Di Francesco et al., 2012; Elia et al., 2006).

Embora existam diversos testes e ensaios diagnósticos para o CDV, pouco se tem investigado sobre técnicas mais relevantes que detectam com maior sensibilidade e especificidade esse vírus em amostras biológicas de animais clinicamente suspeitos de infecção pelo CDV. Por isso, torna-se importante conhecer a performance de diferentes técnicas de diagnóstico etiológico principalmente em relação a variações quanto aos sítios de colheita de material biológico para o diagnóstico do CDV com a finalidade de conduzir a um rápido e preciso diagnóstico para os cães suspeitos de infecção pelo CDV.

Baseado no que foi exposto anteriormente, esse estudo foi desenvolvido com o objetivo de comparar as diferentes técnicas diagnósticas, como o teste imunocromatográfico e as técnicas de RT-PCR e Nested-RT-PCR e tipos de amostras biológicas utilizadas para detecção do CDV em cães com sinais clínicos sugestivos de CC.

MATERIAL E MÉTODOS

Comissão de ética no uso de animais

O experimento obedeceu aos Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (CEBEA) da FCAV-UNESP, conforme o protocolo n° 12209/15.

Seleção dos animais e amostras biológicas

Foram selecionados 62 cães que apresentaram sintomatologia compatível com a cinomose para colheita de amostras clínicas *ante-mortem* (urina, suabe conjuntival e suabe retal). Os critérios de seleção foram baseados na anamnese clínica (sexo, raça, idade e estado vacinal) e exame físico (sinais clínicos) durante atendimento ambulatorial, conforme as recomendações de Headley et. al. (2015).

As amostras de suabe conjuntival foram submetidas ao teste imunocromatográfico e técnicas de diagnóstico molecular (RT-PCR e Nested-PCR),

já as amostras de suabe retal e urina foram submetidas apenas aos testes moleculares.

Cães que foram vacinados há 15 dias ou menos, foram excluídos do trabalho, devido a probabilidade de serem gerados resultados falso positivos nos testes com relação aos antígenos de estirpes de CDV vivas atenuadas presentes em algumas vacinas contra cinomose e que após administradas podem persistir por aproximadamente 2 semanas (An et al., 2008).

Para nível de comparação foram colhidas amostras de dez animais clinicamente saudáveis e sem alterações significativas ao exame físico.

Amostras biológicas

Suabe conjuntival

O material foi obtido por fricção da conjuntiva palpebral utilizando-se zaragatoas estéreis. Uma parcela das amostras foi ressuspensa em meio específico do Kit imunocromatográficos comercial Rapid CDV Ag Test (Alere®, São Paulo, Brasil) e destinada ao teste IC. Outra parte foi, então, imediatamente acondicionada em microtubos de 1,5mL contendo 500µL de meio mínimo essencial eagle (E-MEM) estéril para posterior extração de RNA e análise pela técnica de RT-PCR e de Nested-RT-PCR. Ao todo foram realizadas duas colheitas no mesmo momento em cada animal para obter um volume suficiente de amostra a ser processado pelos diferentes exames propostos nesse estudo.

Suabe retal

Para colheita de material retal foi utilizado uma zaragatoa estéril introduzida no orifício anal, após a colheita, as amostras foram imediatamente acondicionadas em microtubos de 1,5mL contendo 500µL de meio mínimo essencial eagle (E-MEM) estéril e congeladas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior extração de RNA e análise pela técnica de RT-PCR e Nested-PCR.

Urina

As amostras de urina foram colhidas por cateterização uretral no volume de 8mL e dispostas em microtubos estéreis de 1,5mL, a seguir foram congeladas em

nitrogênio líquido (-196°C) para posterior detecção do vírus por técnicas moleculares de RT-PCR e Nested-PCR.

Técnicas de diagnóstico direto do CDV

Teste imunocromatográfico

Os testes imunocromatográficos Rapid CDV Ag Test (Alere®, São Paulo, Brasil) foram usados para a detecção de antígenos do CDV nas amostras teciduais de suabes conjuntivais colhidas dos cães amostrados, a fim de classificar os animais como infectados ou apenas suspeitos para o CDV. Para a realização desse teste seguiram-se as recomendações do fabricante.

Extração do RNA viral e síntese de cDNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir do sobrenadante obtido do processamento das amostras de suabes e urina com o kit comercial Brazol Reagent (LGC, Biotecnologia), seguindo as recomendações do fabricante.

Em suma, aproximadamente um volume de cerca de 0,5 mL de cada uma das amostras em meio E-MEM foi misturada com 500µL de Brazol Reagent, em um microtubo isento de DNase e RNase. A mistura foi homogeneizada por 15 segundos em vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). Acrescentou-se 200µL de uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), realizando-se agitação por inversão por no mínimo 10 vezes. Após um período de cinco minutos à TA, as amostras foram centrifugadas a 12000g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, aproximadamente 500µL do sobrenadante foi separado e transferido para outro microtubo de 1,5mL livre de DNase e RNase. As amostras de RNA foram precipitadas em 500µL de isopropanol, após incubação por quinze minutos, a -70°C, e centrifugação a 12000g, por dez minutos a 4°C. O isopropanol suspenso foi descartado e as amostras foram lavadas em 1000 µL de etanol (75%), centrifugadas a 7500g por 5 minutos a 4°C descartando-se, ao final o sobrenadante e deixando secar à temperatura ambiente. Em seguida, os precipitados foram ressuspensos em 15µL de água tratada com dietil-pirocarbonato 0,1% (DEPC) e imediatamente submetidos a técnica de transcrição reversa (RT).

Transcrição reversa

A reação de transcrição reversa (RT) foi efetuada em um Termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). O protocolo começou incubando-se a 70°C durante cinco minutos: 50ng do RNA genômico extraído, 0,5µg de Randon Primer (Invitrogen, Life Technologies) e 2,5µL de água DEPC. Em seguida, acrescentou-se o 5µL de tampão da RT 5 x (Promega), dNTP 0,5mM (Invitrogen, Life Technologies), 40U de inibidor de ribonucleases (Invitrogen, Life Technologies), 50U da enzima M-MLV (Promega) completando-se com água DEPC até o volume final de 25µL. Posteriormente, incubou-se a 37°C durante 60 minutos, e a 38°C por 10 minutos. O DNA complementar (cDNA) obtido pela transcrição reversa foi armazenado a – 20°C para uso posterior na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A integridade do RNA foi avaliada por amplificação do gene de endógeno GAPDH seguindo a metodologia de Brinkhof et al. (2006).

PCR Convencional e Nested-PCR

Após a extração do RNA total e a síntese do cDNA pela técnica de RT, foi realizado o método de PCR seguindo os procedimentos descritos por Fischer et al. (2016). Em suma, a reação foi conduzida em um aparelho termociclador PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research), utilizando um volume de 5,0µL de cDNA proveniente da RT, ao qual acrescentou-se 10,0µL da mistura tampão buffer 10X (Promega), 6µL de cloreto de magnésio (1,5 mM), dNTP 0,5mM (Invitrogen, Life Technologies), 10pmol de cada “primer” H2F (5'-AATATGCTAACCGCTATCTC-3') e H3R (5'-TCAAGGTTTTGAACGGTTAC-3') específicos para regiões do gene da hemaglutina (H) do CDV e originalmente desenhados por An et al. (2008), completando-se com água DEPC para um volume final de 50µL. As reações foram realizadas em microtubos estéreis livres de Rnases e Dnases de 0,2mL. O protocolo de PCR foi constituído por um primeiro ciclo a 94 ° C por 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 ° C por 1 min, 48 ° C por 1:30 min e 72 ° C por 2 min, sendo a reação finalizada por mais um ciclo a 72°C por 10 min.

A Nested-PCR foi realizada para um volume final de 50 µL e usando-se: 5 µL do produto amplificado na primeira PCR e 45 µL da mistura de reagentes na mesma quantidade que a PCR anterior exceto que contendo um outro par de primers

específicos para regiões 5' e 3' internas ao produto amplificado na primeira PCR do gene da proteína H; CDVF10 (5'-TATCATGACRGYARTGGTTC-3') e CDVR10 (5'-AATYYTCRAYACTGGWTGTG-3 ') (Hashimoto et al., 2001). A reação de amplificação foi realizada no mesmo equipamento e seguindo-se os mesmos ciclos descritos para a primeira PCR.

Os produtos amplificados na RT-PCR e na Nested-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% acrescidos de SYBR SAFE (Thermo Fisher) e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta. Como controle positivo da reação foi utilizada amostra de CDV em cultura celular isolada a partir de urina colhida de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) infectado naturalmente com CC.

Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo método do qui-quadrado utilizando o software Graphpad prism 7.04. Diferenças foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Detecção do CDV por teste imunocromatográfico, RT-PCR e Nested-RT-PCR

No total, 62 amostras de urina, suabes conjuntival e retal, obtidas de 62 cães com suspeita de CC, foram testadas. As técnicas de imunocromatografia e moleculares em conjunto proporcionaram a detecção de 42 animais positivos (em pelo menos uma dessas técnicas) com diferentes sinais clínicos isolados ou em conjunto no mesmo animal; e nos 20 animais restantes cujos sinais clínicos foram menos evidentes não houve a detecção do CDV, assim como nos 10 cães normais (cl clinicamente saudáveis) que foram também testados.

As análises comparativas entre os testes diagnósticos para detecção do CDV nos diferentes tipos de amostras biológicas colhidas dos animais suspeitos com cinomose estão representadas na tabela 1.

Verifica-se que pelo teste imunocromatográfico (IC) apenas 15 animais (24,2%, 15/62) foram positivos para detecção do CDV em amostras de suabes conjuntivais, enquanto que na técnica de RT-PCR, 17 (27,4%, 17/62), 26 (41,9%, 26/62) e 9

(14,5%, 9/62) animais foram positivos para o CDV, nas amostras de suabe conjuntival, suabe retal e urina, respectivamente. Além disso, diferenças no desempenho entre as três técnicas para o diagnóstico direto do CDV, a Nested-RT-PCR mostrou sensibilidade significativamente ainda maior, detectando esse vírus em 22 (35,5%, 22/62), 35 (56,4%, 35/62) e 14 (22,6%, 14/62) das amostras de suabe conjuntival, suabe retal e urina, respectivamente obtidas de cães clinicamente suspeitos de cinomose.

Os dez animais clinicamente saudáveis não demonstraram a presença do CDV em nenhuma das técnicas testadas neste experimento.

Tabela 1. Frequência de diagnóstico direto do vírus da cinomose pelas técnicas imunocromatográfica, RT-PCR e Nested-RT-PCR em amostras biológicas colhidas de 62 cães suspeitos com CC.

Técnica diagnóstica	Amostra biológica	Cães suspeitos com cinomose (n=62)			
		Resultados positivos		Resultados Negativos	
		<i>f</i>	%	<i>f</i>	%
Imunocromatografia	Suabe conjuntival	15 a	24,2	47 a	75,8
PCR	Suabe conjuntival	17 a	27,4	45 a	72,6
	Suabe retal	26 b	41,9	36 b	58,1
	Urina	9 c	14,5	53 c	85,5
Nested-PCR	Suabe conjuntival	22 b	35,5	40 b	64,5
	Suabe retal	35 d	56,4	27 d	43,6
	Urina	14 ca	22,6	48 ca	77,4

Letras semelhantes na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo teste do qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

f – frequência absoluta

% - frequência relativa

DISCUSSÃO

No presente estudo foram testadas três técnicas de diagnóstico direto do CDV, como o ensaio imunocromatográfico e as técnicas moleculares de RT-PCR e Nested-RT-PCR. A técnica que se mostrou mais sensível em detectar o CDV foi a Nested-PCR, apresentando o maior número de resultados positivos em todas as amostras biológicas testadas, seguida pela RT-PCR. A propósito e com relação às técnicas moleculares para a detecção do CDV sabe-se que diferentes protocolos de RT-PCR e RT-qPCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa) foram desenvolvidos nos últimos anos, e têm mostrado resultados mais rápidos, sensíveis e específicos para

detecção do CDV em diferentes amostras clínicas de cães infectados (Headley et al., 2015; Scagliarini et al., 2007; Tozato et al., 2016).

Quanto à técnica de Nested-RT-PCR sabe-se que ela já havia demonstrado uma maior sensibilidade do que a RT-PCR convencional na detecção de CDV em diferentes amostras clínicas obtidas de cães suspeitos de infecção pelo CDV (An et al., 2008; Fischer et al., 2013). Nesses estudos prévios, o gene da nucleoproteína (NP) foi usado como alvo de detecção pelas técnicas moleculares, por ser uma das regiões mais conservadas do genoma do CDV, apresentando alta homologia entre as diferentes estirpes desse vírus já isoladas e sequenciadas (Castilho et al., 2007; Yoshida et al., 1998). No entanto, neste experimento o gene alvo escolhido foi o da hemaglutinina, que é uma glico-proteína da superfície do envelope viral, altamente variável e responsável pelo tropismo tecidual e neuro-invasividade do CDV (Arns et al., 2007; Beineke et al., 2009; Cullinane, 2013).

Apesar dessa maior variabilidade a escolha do gene da hemaglutinina baseou-se na possibilidade de conciliar a detecção do CDV com um futuro sequenciamento de nucleotídeos dos produtos amplificados desse mesmo gene, para a realização de estudos filogenéticos que será realizado posteriormente, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para regiões mais conservadas do gene da hemaglutinina, que tiveram inclusas algumas degenerações em sítios que apresentassem maior variabilidade (Hashimoto et al., 2001).

Em comparação com as técnicas moleculares (RT-PCR e Nested-RT-PCR), o ensaio de IC utilizando amostras de suabes conjuntivais revelou uma baixa sensibilidade (24,2%, 15/62). Esse resultado, provavelmente seja devido ao limiar de detecção da técnica IC que é maior do que os das técnicas de RT-PCR e de Nested-RT-PCR (An et al., 2008; Fischer et al., 2013).

Ainda, os diferentes resultados observados na comparação das técnicas moleculares de diagnóstico do CDV com o ensaio imunocromatográfico corroboram as afirmações de Fischer et al. (2013), destacando que os métodos moleculares são mais sensíveis e específicos do que os testes para detecção de antígenos do CDV como o teste IC, independente da fase da doença.

Apesar de An et al. (2008) terem relatado que os ensaios IC foram tão sensíveis quanto a análise molecular pela técnica de Nested-RT-PCR em sua pesquisa, é

importante destacar que o teste IC usado no estudo desses autores é diferente do que foi aqui usado e, ainda, o período pós-infecção em que os animais foram amostrados neste estudo difere dos casos relatados.

Além disso, o ensaio IC realizado com suabes conjuntivais pode apresentar resultados falso-negativos nas fases subaguda ou crônica da cinomose, provavelmente porque existe uma queda persistente do CDV nas mucosas conjuntivais, ao contrário de outros compartimentos corporais (An et al., 2008; Kim et al., 2006).

Entre as amostras biológicas avaliadas, os suabes retais demonstraram ser, no presente estudo, as amostras ideais para se buscar a detecção do CDV pelas técnicas moleculares (Nested-RT-PCR= 56,4%; RT-PCR= 41,9%), seguido pelos suabes conjuntivais (Nested-PCR= 35,5%; RT-PCR= 27,4%) e urina (Nested-RT-PCR= 22,6%; RT-PCR= 14,5%).

No entanto, é importante salientar que as amostras de urina foram colhidas em poucas quantidades para uso na avaliação da Nested-RT-PCR, e devido à baixa celularidade a detecção viral pode ter sido menos sensível (Kim et al., 2006).

Diversos trabalhos analisaram quais tipos de amostras biológicas são as mais apropriadas para detectar o CDV em testes moleculares. Um estudo utilizando a técnica de Nested-RT-PCR revelou que das 22 amostras de sangue, 20 de urina, 25 de saliva, e 27 de suabe nasal, provenientes de cães com suspeita de CC, 81,8%, 75%, 56% e 70,3% foram respectivamente positivas para presença do vírus (Shin et al., 2004). Fisher et al. (2013) em um experimento semelhante usando o método de RT-PCR, seguido de Nested-PCR detectaram o RNA genômico codificador da NP do CDV em 50 amostras de sangue total, 44 de urina, 38 de suabe retal, e 27 de suabe conjuntival em 53 cães suspeitos com cinomose. Segundo os autores a maior detecção do CDV em amostras de sangue nestes experimentos, se deve provavelmente a fase aguda da CC em que os cães dos quais essas amostras biológicas se encontravam e, conseqüentemente apresentavam uma acentuada viremia.

Em contraste aos achados anteriores Amude et. al. (2010) avaliaram 5 cães hospitalizados apresentando sinais neurológicos sugestíveis de CC, que foram testados posteriormente pela técnica de RT-PCR, cujo a presença do CDV não foi

detectada em nenhuma das amostras de soro, mais foi encontrada em apenas 1/5 (20%) de amostras do sangue total e 2/5 (40 %) das amostras de líquido cefalorraquidiano, enquanto que 4/5 (80%) das amostras de urina foram positivas.

Embora a literatura destaque que o RNA genômico do CDV seja mais detectado em amostras de tecido nervoso, suabe conjuntival, sangue e urina (An et al., 2008; Fischer et al., 2013; Headley et al., 2015), neste experimento os suabes retais mostraram-se mais apropriados para a detecção desse vírus quando comparados ao suabe conjuntival e urina. Esses achados fazem com os suabes retais passem a ser preferencialmente recomendados como material biológico para ser colhido na rotina clínica destinada ao diagnóstico direto do CDV, uma vez que, esse tipo de amostra é mais fácil de colher do que as outras amostras e ainda, pode ser usado para detectar outros agentes virais que provocam a gastroenterite em cães, como parvovírus canino 2, rotavírus e coronavírus (Budaszewski et al., 2014; Headley et al., 2013).

É importante ressaltar também que nas formas de evolução subaguda ou crônica da doença, ou ainda em cães assintomáticos, o CDV pode não estar presente em órgãos, tecidos, secreções e excreções de maneira uniforme. Nessas situações, a utilização de apenas um tipo de material biológico para a realização do diagnóstico pode ser responsável pela frequência mais elevada de resultados falso-negativos para o CDV (Amude et al., 2006; Fischer et al., 2013; Sonne et al., 2009; Saito et al., 2006).

Em suma, de todos os animais suspeitos de cinomose (n= 62), quarenta e dois cães (67,7%) foram positivos em pelo menos uma das técnicas de diagnóstico para detecção do CDV. Headley et al. (2015) obtiveram, 45,5% de cães positivos pela técnica de RT-PCR.

O diagnóstico *ante mortem* de cinomose baseia-se na demonstração de antígenos virais em raspados e fluidos corporais, como esfregaços conjuntivais e vaginais, lavados traqueais e sedimentos urinários (Silva et al., 2005). Várias técnicas têm sido usadas para detecção do CDV, incluindo imunofluorescência direta, ensaios IC, RT-PCR, Nested-PCR e PCR em tempo real (qPCR) (Amude et al., 2007; Fischer et al., 2013; Kapil e Neel, 2015; Józwik e Frymus, 2005). E, no presente estudo ficou evidenciado que a técnica de Nested-RT-PCR para amplificação do gene da hemaglutinina pode ser usada de forma bem sucedida para o diagnóstico direto do

CDV em cães suspeitos de infecção pelo CDV, notadamente em amostras de suabe retal.

CONCLUSÃO

As técnicas moleculares (RT-PCR e Nested-PCR) demonstraram maior sensibilidade do que o ensaio comercial de IC. A Nested-PCR usada para a análise de suabes retais revela ser o procedimento mais eficaz e sensível para detecção direta do CDV.

A aplicabilidade imediata desta combinação de procedimentos na rotina clínica-laboratorial mesmo em animais assintomáticos para infecção pelo CDV, poderia ajudar a reduzir a morbidade e a mortalidade da doença, pois permitiria um diagnóstico mais rápido e confiável, e assim possibilitaria a adoção de um tratamento apropriado antes que as lesões se agravassem mais, acarretando o aparecimento de sinais mais graves e pior prognóstico.

REFERÊNCIAS

Amude, A. M.; Alfieri, A. A.; Alfieri, A. F. *Ante mortem* diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. **Veterinary Research Communication**, v.30, p. 679-687, 2006.

Amude, A. M.; Alfieri, A. A.; Alfieri, A. F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, v.82, p. 416-422, 2007.

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.

Arns, C. W.; Spilki, F. R.; Almeida, R. S. Paramyxoviridae: Vírus Da Cinomose. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ufsm, p. 674-677, 2007.

Barret, T. Morbillivirus infections, with special emphasis on Morbilliviruses in carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 3-13, 1999.

Basso, C. R.; Tozato, C. C.; Ribeiro, M. C. M.; Araujo Junior, J. P.; Pedrosa, V. A. A immunosensor for the diagnosis of canine distemper virus infection using SPR and EIS. **Analytical Methods**, v.5, p.5089-5095, 2013.

Beineke, A.; Puff, C.; Seehusen, F.; Baumgartner, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 127, pg. 1–18. 2009.

Brinkhof, B.; Bart, S.; Jan, R.; Louis, C. P. Development and evaluation of canine reference genes for accurate quantification of gene expression. **Analytical Biochemistry**. 356(1): 36–43. 2006.

Budaszewski, R.; Pinto, L. D.; Weber, M. N.; Caldart, E. T.; Alves, C. D. B. 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**. 2014.

Castilho, J. G.; Brandão, P. E.; Carnieli, J. R. P.; Oliveira, R. N.; Macedo, C. I.; Peixoto, Z. M. P.; Carrieri, M. L.; Kotait, I. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59, pp. 654-659. 2007.

Cullinane, A. Virology: Paramyxoviridae. In: Marker, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Toronto: Elsevier, p. 645-651. 2013.

Di Francesco, C. E.; Di Francesco, D.; Di Martino, B.; Speranza, R.; Santori, D.; Boari, A.; Marsilio, F. Detection by hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and genetic characterization of wild type strains of canine distemper virus in suspected infected dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.24, p.107-115, 2012.

Elia, G.; Decaro, N.; Martella, V.; Cirone, F.; Lucente, M. S.; Lorusso, E.; Di Trani, L.; Buonavoglia, C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.36, n.1-2, p.171-176, 2006.

Fischer, C. D. B.; Ikuta, N.; Canal, C.W.; Makiejczuk, A.; Allgayer, M.C.; Cardoso, C.H.; Lehmann, F.K.; Fonseca, A.S.; Lunge, V.R. Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. **Journal of Virological Methods**, 1 (94), pp. 39-45. 2013.

Greene, C.E.; Vandeveld, M. Canine Distemper. In: **Infectious Diseases of the Dog and Cat** (Greene C.E., ed.). 4th ed. Elsevier, St Louis, 25-42. 2012.

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.; Alfieri, A. A.; Summers, B. A. 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, p.588-597, 2009.

Headley, S. A.; Santos, T. R.; Medeiros, A. A.; Bodnar, L.; Saut, J. P. E.; Silva, A. P.; Alfieri, A. F.; Soares, N. P.; Alfieri, A. A. Molecular detection and phylogenetic relationship of wild-type strains of canine distemper virus in symptomatic dogs from Uberlândia, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 6, p. 1510-1518, Dec. 2015.

Headley, S.A.; Alfieri, A.A.; Fritzen, J.T.T.; Garcia, J. L.; Weissenböck, H.; da Silva, A. P.; Bodnar, L.; Okano, W.; Alfieri, A. F. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.25, p.112 - 118, 2013.

Józwik, A.; Frymus, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Veterinary Research Communications**, 29, pp. 347-359. 2005.

Kapil, S.; Neel, T. Canine distemper virus antigen detection in external epithelia of recently vaccinated, sick dogs by fluorescence microscopy is a valuable prognostic indicator. **Journal of Clinical Microbiology**. 53:687–691. 2015.

Kim, D.; Jeoung, S.Y. ; Ahn, S.J. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n. 8, p. 877-879, 2006.

Loots, A. K.; Mitchell, E.; Dalton, D.L.; Kotzé, A.; Venter, E.H. Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. **Journal of General Virology**. 98:311–321, 2017.

MacLachlan, N.J.; Dubovi, E. J. Paramyxoviridae. **Fenner's Veterinary Virology**. 4th ed. Academic Press, San Diego, 299-325. 2011.

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.

Saito, T. B.; Alfieri, A. A.; Negrão, F.J.; Alfieri, A. F. Optimization and evaluation of the RT-PCR assay for *ante* and *post mortem* detection of canine distemper virus infection. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 13, p. 63-72, 2006.

Scagliarini, A.; Dal Pozzo, F.; Gallina, L.; Vaccari, F.; Morganti, L. TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. **Veterinary Research Communications**, 31 (Suppl. 1), pp. 261-263. 2007.

Shin, Y.J., Cho, K.O., Cho, H.S., Kang, S.K., Kim, H.J., Kim, Y.H., Park, H.S., Park, N.Y. Comparison of one-step RT-PCR and a nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. **Australian Veterinary Journal**. 82, 83–86. 2004.

Silva, I. N. G, Guedes, M. I. F.; Rocha, M. F. G.; Medeiros, C. M. O.; Oliveira, L. C.; Moreira, O. C.; Teixeira, M. F. S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.

Sonne, L.; Oliveira, E.C.; Pescador, C.A.; Santos, A. S.; Pavarini, S. P.; Carissimi, A. S.; Driemeier, D. Achados patológicos e Imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 143-149, 2009.

Takenaka A, Sato, H.; Ikeda, F.; Yoneda, M.; Kai, C. Infectious Progression of Canine Distemper Virus from Circulating Cerebrospinal Fluid into the Central Nervous System. **Journal of Virology**. 90:9285-9292, 2016.

Tozato, C. C.; Zadra, V. F.; Basso, C. R.; Araujo Junior, J. P. Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. **Ciencia Rural**. vol.46, n.9, pp.1601-1606. 2016.

Yoshida, E.; Iwatsuki, K.; Miyashita, N.; Gemma, T.; Kay, C.; Mikami, T. Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. **Veterinary Microbiology**, 59 (1998), pp. 237-244. 1998.

CAPÍTULO 3 - Caracterização filogenética do gene da hemaglutinina do vírus da cinomose canina detectado em cães naturalmente infectados

Phylogenetic characterization of hemagglutinin gene from canine distemper virus detected in naturally infected dogs

Resumo - A cinomose canina é uma das enfermidades infectocontagiosas mais importantes que acomete os cães. É uma doença causada pelo vírus da Cinomose (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. Ainda que seja reconhecido um único sorotipo do CDV, surtos ocorridos nos últimos anos nos Estados Unidos e estudos de filogenia com base principalmente no gene H realizados também em outros países têm apontado para um distanciamento genético entre as amostras de CDV utilizadas como cepas vacinais e as cepas circulantes na população canina doméstica e silvestre. Com base neste contexto, o objetivo deste estudo foi realizar a análise molecular e filogenética do gene H de estirpes isoladas do CDV em caninos domésticos naturalmente infectados. Para análise filogenética foram selecionadas sequências completas do gene H de variantes do CDV isoladas no Brasil e em outros países de canídeos domésticos e silvestres, em seguida foram analisadas pelo programa PAUP v.4.0 utilizando o método de Máxima Parcimônia com modelo de busca Branch-and-Bound. Os resultados obtidos sugerem 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. Conclui-se que as cepas isoladas na região norte do estado de São Paulo são distintas das comumente utilizadas em vacinas. Este tudo sugere uma um potencial de infecção para os cães domésticos inclusive os vacinados, no entanto estudos de imunogenicidade e patogenicidade são necessários para caracterizar essas novas estirpes.

Palavras-chaves: Epidemiologia molecular. Filogeografia. *Morbillivírus*.

Abstract - *Canine distemper is one of the most important infecto-contagious diseases that affects dogs. It is a disease caused by the virus of Cynomysis (CDV), a Paramyxovirus, of the genus Morbillivirus, worldwide, without seasonality, without predilection for sex or race, has a higher incidence in young animals, and can affect all ages. Although a single CDV serotype has been recognized, outbreaks in recent years in the United States and studies of phylogeny based primarily on the H gene, also conducted in other countries, have pointed to a genetic distance between the CDV samples used as vaccine strains and the circulating strains in the domestic and wild canine population. Based on this context, the objective of this study was to perform the molecular and phylogenetic analysis of the H gene from strains isolated from CDV in naturally infected domestic and wild canines. For phylogenetic analysis, complete sequences of the H gene of CDV variants isolated from Brazil and other countries from domestic and wild canids were selected and then analyzed by the PAUP v.4.0 program using the Maximum Parsimony method with Branch-and search model -Bound. The*

results suggest that the group of CDV isolates in Brazil are distinct from the vaccine strains and genotypically close to European isolates 1 / South American 1. It is concluded that the strains isolated in the region north of the state of São Paulo are distinct from those commonly used in vaccines. This all suggests an infection potential for domestic dogs including those vaccinated, however immunogenicity and pathogenicity studies are needed to characterize these new strains.

Keywords: Molecular epidemiology. Phylogeography. *Morbillivirus*.

INTRODUÇÃO

A cinomose canina (CC) é uma doença infecciosa viral importante que afeta vários carnívoros selvagens e principalmente os cães domésticos. Considerada uma enfermidade grave, apresenta diversas manifestações clínicas que frequentemente podem levar à morte do hospedeiro. O agente etiológico é o vírus da cinomose canina (CDV – “canine distemper virus”), pertencente à família Paramyxoviridae, gênero *Morbillivirus*, é constituído genotipicamente por um RNA de fita simples com polaridade negativa que codifica seis proteínas principais, sendo as glicoproteínas hemaglutinina (H) e fusão (F) responsáveis pela ligação do virion e processo de fusão, respectivamente (Sawatsky e Von, 2010). Além disso, a glicoproteína H também desempenha um papel importante na imunidade específica do hospedeiro e, devido a pressões externas do sistema imunológico, apresenta alta variabilidade genética no genoma do CDV (Iwatsuki et al., 2000).

Alterações em receptores celulares, gravidade dos sinais clínicos e resistência viral do CDV têm sido associados aos polimorfismos encontrados no gene H. Substituições encontradas neste gene, que estão relacionadas ao local de ligação ao receptor de sinalização da molécula de ativação de linfócitos (SLAM), foram determinantes para o tropismo da célula hospedeira (McCarthy et al., 2007). Ademais, Sattler et al. (2014) relata que alterações na proteína H afeta fortemente a resistência do CDV em estudos realizados *in vitro*.

Estudos de filogenia com base principalmente no gene H obtidos de surtos ocorridos nos últimos anos em regiões das Américas, Ásia e Europa têm apontado para um distanciamento genético entre as amostras de CDV utilizadas como cepas vacinais e as cepas circulantes na população de canídeos domésticos e selvagens desses países e regiões (Martella et al., 2006; Panzera et al., 2012; Sarute et al., 2014; Espinal et al., 2014; Zhao et al., 2010).

No Brasil, a cinomose é endêmica com 58% de soroprevalência em populações caninas urbanas. E embora esforços de imunização com cepas atenuadas tenham sido amplamente utilizadas para prevenir a doença, surtos têm sido relatados com frequência na última década (Headley et al., 2012).

Embora estudos de genotipagem e caracterização filogenética do CDV demonstrem diferenças entre as amostras brasileiras e as amostras isoladas de outros países (Budaszewski et. al., 2014; Rosa et. al., 2012), são poucos os estudos sobre epidemiologia molecular que relatam diferenças marcantes na análise filogenética do gene H do CDV entre os isolados de campo e as estirpes de referência do CDV, especialmente àquelas utilizadas na produção de vacinas. De forma que investigações adicionais são necessárias para melhor caracterizar as mudanças causadas por mutações e/ou recombinações gênicas na proteína H das variantes do CDV no Brasil nestes últimos anos.

Com base neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a análise molecular e filogenética do gene H de estirpes isoladas do CDV em amostras biológicas colhidas de cães com cinomose.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-protocolo nº 12209/15) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal-SP (FCAV-UNESP).

Cães com sinais clínicos de cinomose (sinais oftálmicos, respiratórios, dermatológicos, gastroentéricos e neurológicos) foram atendidos e examinados na rotina normal do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Unesp (FCAV-UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e em clínicas particulares de março de 2017 a junho de 2018 da mesma região. Dados gerais dos animais (Anamnese) e exame clínico foram registrados durante atendimento.

Detecção do CDV e sequenciamento do gene H

Foram colhidas amostras de urina, suabe conjuntival e retal de 62 cães com sinais clínicos sugestivos de cinomose para ensaios moleculares de PCR seguido de Nested-PCR. A extração do RNA viral foi realizada a partir do sobrenadante obtido do processamento das amostras de suabes e urina com o kit comercial Brazol Reagent (LGC, Biotecnologia), seguindo as recomendações do fabricante.

O CDV foi detectado pela presença do RNA viral em urina, suabe conjuntival e retal baseada na detecção de parte do gene H (nucleotídeo 7991 ao nucleotídeo 8861) pela técnica de Nested-PCR seguindo a metodologia descrita por Fischer et. al. (2016).

A integridade do RNA foi avaliada por amplificação do gene de endógeno GAPDH seguindo a metodologia de Brinkhof et al. (2006).

A reação de transcrição reversa (RT) foi efetuada utilizando 50ng do RNA genômico extraído em 20µL de mistura de reação (primers randômicos, enzima M-MLV, dNTPs, tampão apropriado e inibidor de ribonucleases). O DNA complementar (cDNA) obtido pela transcrição reversa foi armazenado a -20°C para uso posterior na técnica de reação em cadeia da polimerase convencional (PCR).

Os ensaios de PCR convencional (PCR) foram realizados em um volume de 50 µL usando 5 µL do cDNA e 45 µL de mistura de reação (DNA polimerase Taq, dNTPs, tampão apropriado) contendo os primers H2F (5'-AATATGCTAACCGCTATCTC – 3') e H3R (5'-TCAAGGTTTTGAACGGTTAC – 3') (An et al., 2008).

A Nested-PCR foi realizada em um volume de 50 µL usando 5 µL de molde de DNA e 45 µL de mistura de reação contendo os primers CDVF10 (5'-TATCATGACRGYARTGGTTC-3') e CDVR10 (5'-AATYYTCRAYACTGGWTGTG-3') (Hashimoto et. al., 2001).

Os amplicons gerados na Nested-PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose e depois purificados pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, São Paulo, Brasil), de acordo com instruções do fabricante.

Ao final o cDNA eluído foi transferido para um microtubo de 0,2 mL e armazenado a -20 °C até ser submetido ao sequenciamento de nucleotídeos.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit de reagentes da Applied Biosystems e no equipamento ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied

Biosystems, Foster City, California, EUA), utilizando os mesmos primers internos da Nested-PCR (Fischer et al., 2016).

Sequências de referência do gene H de estirpes do CDV

Para compor a análise filogenética foram selecionadas sequências completas do gene H de estirpes do CDV isoladas no Brasil e de outras regiões no mundo (Argentina e Estados Unidos e Europa) de cães domésticos e também foram utilizadas sequências das cepas vacinais Onderstepoort, Snyder hill e Lederle. Como grupo controle externo foi usada a sequência do gene H do morbilivírus isolado de foca (*Phocine distemper vírus*). Todas as sequências foram obtidas no genbank (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]).

Alinhamento e análise filogenética do gene H

Os dados das sequências foram montados e editados usando o programa BioEdit v.7.2.6. O alinhamento de nucleotídeos obtidos das sequências do gene H do CDV isolado dos cães positivos, juntamente com isolados de campo de diferentes regiões geográficas e cepas vacinas, foram realizados com ClustalW v.1.4.

A análise filogenética baseada no alinhamento de nucleotídeos das sequências parciais do gene H foi realizada pelo programa PAUP v.4.0 utilizando o método de Máxima Parcimônia com modelo de busca Branch-and-Bound, respectivamente. A avaliação estatística foi proposta por 1000 análises não-paramétricas de bootstrap. Os genótipos CDV foram distinguidos com base em um critério de diferença de pelo menos 5% no nível de composição das sequências de nucleotídeo. Dentro de cada genótipo, as cepas no mesmo clado com valores elevados de bootstrap que mostraram pelo menos 98% de identidade de nucleotídeos foram consideradas pertencentes ao mesmo subgenótipo. Com base nesta metodologia a árvore de consenso foi gerada e editada no software FigTree, V.1.4.

RESULTADOS

Detecção viral

Em 42 dos 62 indivíduos testados pela técnica de PCR seguida de Nested-PCR, a presença de sequências do gene H do CDV foi evidenciada em pelo menos

uma das amostras avaliadas. Dentre as amostras colhidas, destaca-se a presença viral em 22 (35,5%, 22/62), 35 (56,4%, 35/62) e 14 (22,6%, 14/62) das amostras de suabe conjuntival, suabe retal e urina, respectivamente obtidas de cães clinicamente suspeitos de cinomose (Tabela 1).

Tabela 1. Frequência de diagnóstico direto do vírus da cinomose pela técnica de Nested-RT-PCR em amostras biológicas colhidas de 62 cães suspeitos com CC

Técnica diagnóstica	Amostra biológica	Cães suspeitos com cinomose (n=62)	
		Resultados positivos	
		f	%
Nested-PCR	Suabe conjuntival	22	35,5
	Suabe retal	35	56,4
	Urina	14	22,6

Sequenciamento e análise filogenética molecular

Foi possível utilizar sequências nucleotídicas de 35 das 42 amostras positivas para o CDV nas reações de Nested-PCR, pois seis das sequências de nucleotídeos do gene H apresentaram qualidade insuficiente para serem alinhadas e processadas nas análises filogenéticas.

A análise filogenética das amostras sequenciadas revelou elevada identidade com amostras de CDV Sul-americana 1 (SA1, JX912978; JX912959) [sequências de nucleotídeos do gene H variaram de no mínimo 96,7% para o máximo de 99% de identidade], com clara segregação entre as linhagens da SA1 e amostras sequenciadas. O clado SA1 foi composto principalmente por sequências do Brasil isoladas no sul do país.

Amostras pertencentes ao clado sul-americano 2 SA2 (KC257464; KC257463) ficaram próximas do clado SA1 e das amostras sequenciadas, entretanto, os cladogramas SA3 e SA4 (KM066098; KM066099; KF835413; KF835418; KF835424) apresentaram diversidade maiores quando comparadas as sequências do gene H das estirpes do presente estudo [identidade das sequências de nucleotídeos do gene H variaram de no mínimo 91,3% para o máximo de 95%].

Com relação as sequências obtidas dos grupos vacinais (EU143737; EF418782) classificados como America 1, este grupo encontra-se geneticamente

mais distante do grupo nomeado SA1, composto das cepas Sul-americanas 1 e as amostras sequenciadas [identidade das seqüências de nucleotídeos do gene H variaram de no mínimo 88,3% para o máximo de 91,5%] (Figura 1).

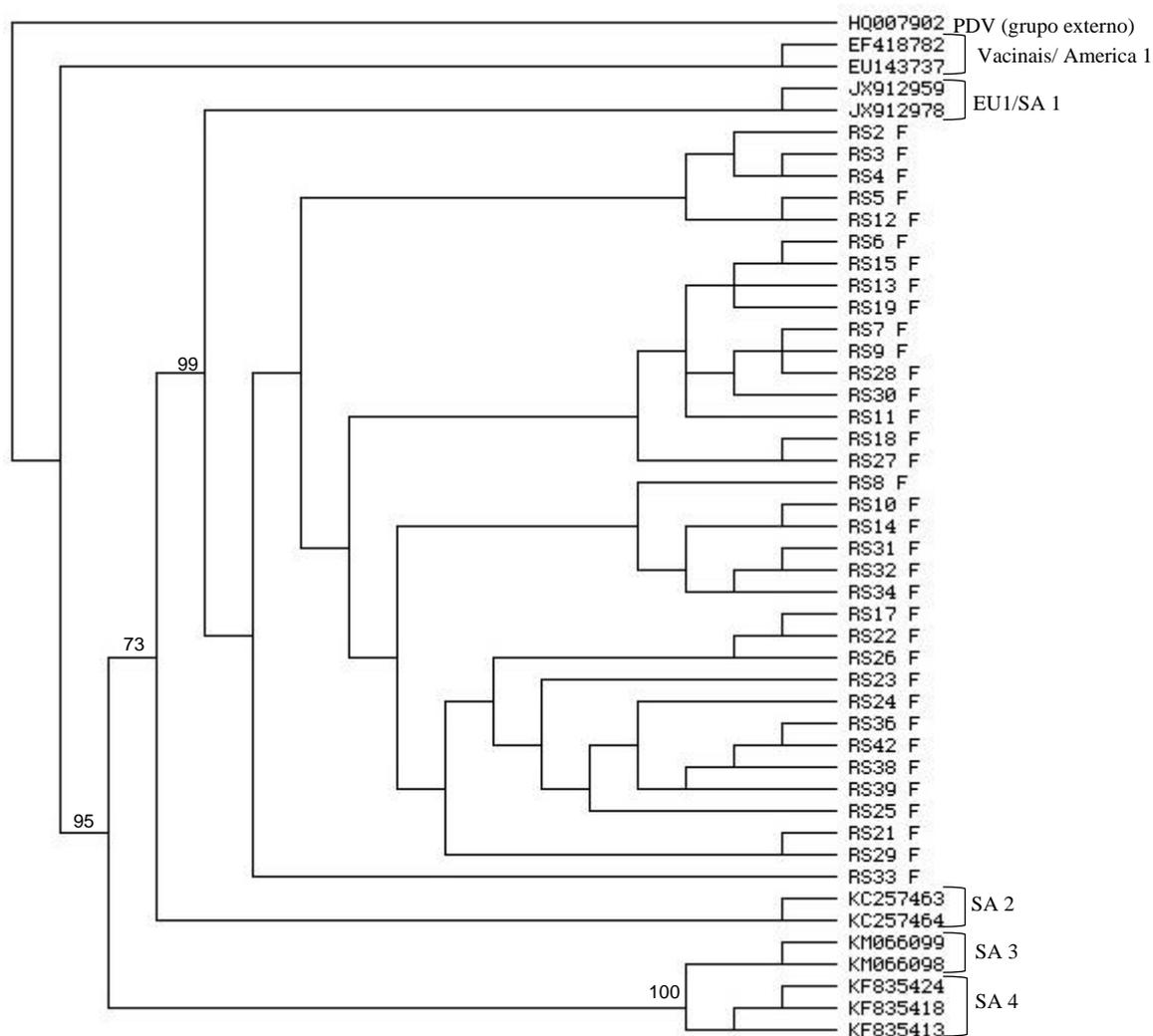


Figura 1. Árvore filogenética baseada nas seqüências nucleotídicas de um segmento do gene que codifica a proteína H do CDV. 1000 replicações de bootstrap suportam a ramificação na árvore de consenso. As 4 principais linhagens de CDV sul-americanas são indicadas (EU1/SA1, SA2, SA3 e SA4). A seqüência derivada de paramixovírus da foca (HQ007902 PDV) foi utilizada como grupo externo.

DISCUSSÃO

A cinomose é uma doença viral considerada a enfermidade infecciosa mais importante entre os canídeos domésticos, devido sua alta morbidade e mortalidade

(Martinez-Gutierrez e Ruiz-Saenz, 2016). No presente estudo, 62 animais apresentando sintomatologia compatível com a CC foram avaliados e o CDV foi detectado pela técnica de RT-Nested-PCR para a amplificação do gene H em 67,7% dos cães enfermos. Estudos anteriores demonstram frequências de detecção do CDV semelhantes (47,1 a 66,5%) em cães sintomáticos no Brasil (Headley et al., 2012).

Entre os 42 cães positivos para CDV, 8 (19%) tinham recebido um esquema completo de vacinação contra o CDV. Os outros 34 cães apresentavam histórico de vacina atrasado ou não tinham registro de vacinação. A ocorrência de surtos de CDV em cães vacinados já foi relatada em estudos anteriores (Simon-Martínez et al., 2008; Norris et al., 2006; Józwik e Frymus, 2002). A qualidade da vacina, a fraca resposta imunitária do hospedeiro e principalmente a diversidade genética do CDV foram apontadas como causas possíveis de falhas vacinais (Lan et al., 2006).

A análise filogenética realizada neste trabalho, indica que as sequências parciais do gene H das estirpes desse estudo encontram-se geneticamente relacionadas às linhagens Europeias 1/Sul-americanas 1 (EU1/SA1) e também em parte estão relacionadas ao clado Sul-americanas 2 (SA2).

Com respeito a esses nossos achados, a história filogeográfica reconstruída do CDV no clado EU1/SA1, que reúne as cepas responsáveis pelos surtos de cinomose no Brasil, tem revelado um crescimento logístico da população viral com um aumento acentuado de 2000 a 2010 (Blancou, 2004; Panzera et al., 2012; Rosa et al. 2012).

O sequenciamento do gene H é o mais frequentemente utilizado para análises filogenéticas de cepas do CDV, pois possui alta variabilidade entre os isolados de CDV, devido a funções biológicas que a proteína H exerce na infectividade desse vírus por interagir com receptores de células alvo do hospedeiro, bem como por essa proteína conter os principais epítomos indutores de anticorpos neutralizantes pelo sistema imune dos cães. Adicionalmente, muitas sequências deste gene estão mais completas do que outras e estão disponíveis em bancos de dados públicos para comparações filogenéticas (Panzera et al., 2015; Martella et al., 2006).

Estudos recentes confirmaram que todas as linhagens brasileiras do CDV isoladas de cães domésticos pertencem à linhagem EU1/SA1. A ausência de outras linhagens no Brasil é íncita, considerando a ampla área do país aproximadamente

47% da América do Sul (Fischer et al., 2016; Negrão et al., 2013; Budaszewski et al., 2014).

Amostras pertencentes ao clado SA3 e SA4 somente foram encontradas no Equador e Colômbia, respectivamente. Embora neste estudo, as amostras sequenciadas estejam distantes destes cladogramas a possibilidade do surgimento destas cepas no Brasil é considerada uma vez que existe um grande fluxo de animais e pessoas entre os países (Espinal et al., 2014; Sarute et al., 2014).

É notável nos nossos resultados, o afastamento das amostras do CDV que foram sequenciadas, em relação ao grupo América 1 contendo as cepas vacinais utilizadas em vacinas vendidas no Brasil.

Nos casos por nós estudados, 8 animais tinham histórico de vacinação completo apresentaram sinais clínicos e detecção viral. É importante ressaltar que as cepas de CDV detectadas nesses casos clínicos eram claramente distintas das cepas de vacina conhecidas. As hipóteses para explicar esses casos são variadas, mas frequentemente relaciona-se com o surgimento de novas variantes do CDV que são suficientemente divergentes para escapar da proteção imunológica desencadeada pelas vacinas usadas contra esse mesmo vírus (Lan et al., 2006; McCarthy et al., 2007; Nikolin et al., 2012).

Nas últimas décadas, a análise do gene H e de outros genes do CDV permitiram identificar diversas classes filogenéticas classificadas de acordo com sua origem geográfica em canídeos domésticos e animais silvestres (Budaszewski et al., 2014; Martella et al. 2006, Pardo et al. 2005).

A presença na América do Sul de linhagens únicas (SA2, SA3 e SA4) e uma linhagem de quatro regiões intercontinentais (EU1/SA1) sugere que este continente abriga a mais alta diversidade genética de cepas de CDV. A extensão desta variabilidade pode ser ainda maior, pois apenas cinco dos doze países sul-americanos realizaram estudos de caracterização do CDV (Panzera et al., 2014).

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.

Józwik, 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., Panzera, 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.