

## Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo<sup>1</sup>

Gislaine Nonino Rosa<sup>2</sup>, Helena Gallicchio Domingues<sup>2</sup>, Márcia Mercês Ap. Bianchi dos Santos<sup>2</sup>, Paulo Anselmo Nunes Felipe<sup>2</sup>, Fernando Rosado Spilki<sup>3\*</sup> e Clarice Weis Arns<sup>2</sup>

**ABSTRACT.-** Rosa G.N., Domingues H.G., Santos M.M.A.B., Felipe P.A.N., Spilki F.R. & Arns C.W. 2012. [Molecular detection and phylogenetic analysis of the gene H from canine distemper virus isolates circulating at the municipality of Campinas, São Paulo.] 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):72-77. Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia RS-239 2755, Novo Hamburgo, RS 93352-000, Brazil. E-mail: fernandors@feevale.br

Canine distemper virus (CDV), a *Morbillivirus* of the family *Paramyxoviridae*, is the etiological agent of neurological and systemic disease in dogs. The laboratory diagnosis of infection requires viral isolation or detection of genetic material of the virus in secretions or tissues of dogs with clinical suspicion of the disease. The genetic diversity among isolates of CDV can be assessed by sequencing and phylogenetic analysis of the gene that encodes the viral hemagglutinin (H gene), and there is currently a special interest in comparing the strains currently circulating in the field with the genogroup America-1, which comprises strains present in vaccines available in the market. In this study, the molecular detection of CDV gene H was performed from biological samples harvested *ante*- and *post*-mortem from 15 dogs with clinical signs suggestive of canine distemper in the metropolitan region of Campinas, São Paulo. Ten of the 15 dogs examined had at least one positive organ under molecular detection and the obtained amplicons were sequenced and further analyzed by molecular phylogenetic analysis. Similarly to what has already been reported on previous studies regarding the diversity of the gene H in other countries, the phylogenetic reconstruction obtained for the samples of cases of distemper from Campinas region showed they were grouped with the North American, European and Japanese newly described samples, a genetic group distinguished from classical samples of CDV, named America-1, which encompasses the vaccine strains Snyder Hill, Onderstepoort and Lederle.

INDEX TERMS: Canine distemper virus, hemagglutinin gene, molecular phylogenetic analysis.

**RESUMO.-** O vírus da cinomose canina (CDV), um *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*, é o agente etiológico de doença neurológica e sistêmica em cães. O diagnóstico laboratorial da infecção requer o isolamento viral ou detec-

ção do material genético do vírus em secreções ou tecidos de cães com suspeita clínica da doença. A diversidade genética entre os isolados de CDV pode ser aferida pelo sequenciamento e filogenia molecular do gene que codifica a hemaglutinina viral (gene H), havendo atualmente um especial interesse em comparar as amostras circulantes a campo com o genogrupo América-1, que abrange as cepas presentes nas vacinas disponíveis no mercado. No presente estudo, foi realizada a detecção molecular do gene H de CDV a partir de amostras biológicas colhidas *ante*- e *post*-mortem de 15 cães com sinais clínicos sugestivos de cinomose na região metropolitana de Campinas, São Paulo. Dez

<sup>1</sup> Recebido em 1 de agosto de 2011.

Aceito para publicação em 4 de outubro de 2011.

<sup>2</sup> Laboratório de Virologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Cx. Postal 6109, Campinas, SP 13083-970, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Feevale, Rodovia RS-239 2755, Novo Hamburgo, RS 93352-000, Brasil. \*Autor para correspondência: fernandors@feevale.br

dos 15 cães analisados tiveram ao menos um órgão positivo na detecção molecular e os amplicons obtidos foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética molecular. De forma semelhante ao que já foi reportado para estudo analisando a diversidade do gene H em outros países, a reconstrução filogenética obtida para as amostras de casos de cinomose da região de Campinas demonstrou as mesmas foram agrupadas junto a amostras norte-americanas, europeias e japonesas recentes, em um grupo genético distinto do grupo de amostras clássicas de CDV, nomeado America-1, o qual engloba as estirpes vacinais Snyder Hill, Onderstepoort e Lederle.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Vírus da cinomose, gene da hemaglutinina, análise filogenética molecular.

## INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (CDV, *canine distemper virus*), um membro do gênero *Morbillivirus*, subfamília *Paramyxovirinae*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales*, é o principal causador de encefalites em cães de diferentes faixas etárias, podendo ainda estar associado com manifestações clínicas sistêmicas (Martella et al. 2008). As manifestações clínicas neurológicas causadas pelo CDV incluem a encefalite em cães jovens, encefalomielite multifocal em adultos, encefalites crônicas (Amude et al. 2007, Beineke et al. 2009) e em raros eventos foram relatados casos de encefalite pós-vacinal (Evermann 2008, Martella et al. 2008). Em alguns animais podem ocorrer apenas sinais de comprometimento nervoso, enquanto em muitos outros casos sinais sistêmicos advêm no curso da enfermidade, incluindo pneumonia e diarreias, associadas a pústulas na pele e hiperqueratinização dos coxins plantares (Silva et al. 2007, Silva et al. 2009). Tais afecções sistêmicas podem ocorrer de forma concomitante ou não aos quadros de encefalite (Pandher et al. 2006, Yeşilbag K. et al. 2007, Posuwan et al. 2010). As manifestações clínicas e o curso da doença dependem da amostra viral, idade e *status* imunitário do animal afetado e localização das lesões (Martella et al. 2008). O CDV e outros agentes filogeneticamente relacionados também podem infectar outras espécies de carnívoros, com potencial impacto sobre a fauna silvestre (Deem et al. 2000, Megid et al. 2009, De Almeida Curi et al. 2010, Megid et al. 2010).

O genoma do CDV, composto de uma molécula de RNA de fita simples e polaridade negativa, codifica cinco proteínas, das quais as mais estudadas são a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N), cujos genes são comumente utilizados para estudos filogenéticos (Mochizuki et al. 1999, Pardo et al. 2005, Castilho et al. 2007, Kapil et al. 2008, Martella et al. 2008, Chan et al. 2009, Demeter et al. 2010). A hemaglutinina é responsável pela ligação dos vírions à célula hospedeira e tem um papel importante na indução de imunidade específica pelo hospedeiro (Sawatsky & Von Messling 2010). O gene que codifica a proteína H é altamente variável e pode ser utilizado para análises genéticas do CDV (Mochizuki et al. 1999, Pardo et al. 2005).

A cinomose é uma infecção altamente contagiosa e os métodos de prevenção baseiam-se no uso de vacinas atenuadas, aplicadas com reforços mensais nos primeiros meses de

vida em animais jovens, seguido de reforços anuais em cães adultos (Horzinek 2006, Schultz 2006). Ainda que seja reconhecido um único sorotipo do vírus, surtos ocorridos nos últimos anos nos Estados Unidos e estudos de filogenia molecular realizados também em outros países têm apontado para um distanciamento genético entre as amostras de CDV utilizadas como estirpes vacinais e os vírus circulantes na população canina (Pardo et al. 2005). Estudo realizado no Brasil utilizando a análise filogenética do gene N do CDV apontou diferenças entre 11 amostras circulantes de 10 cidades do estado de São Paulo (anos 2000 a 2004) e as estirpes comumente utilizadas na produção de vacinas contra o CDV e comercializadas no país (Castilho et al. 2007).

No presente estudo, é relatada a detecção molecular a partir de diferentes amostras biológicas e o sequenciamento nucleotídico seguido de análise filogenética do gene H de amostras de CDV identificadas na região metropolitana de Campinas, São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Casos clínicos

Os casos clínicos analisados no presente estudo ocorreram entre os anos de 2004 e 2006, na região de Campinas, SP. Foram coletadas amostras clínicas *ante-* (líquido céfalo-raquidiano e urina) e *post-mortem* (pulmão, baço, linfonodos, bexiga, cérebro, fígado, rins e timo) de 15 cães com idades que iam de 60 a 120 dias, com a exceção de um animal adulto (4 anos de idade). Todos os animais eram domiciliados no município de Campinas, SP, e arredores, à exceção de dois filhotes adquiridos recentemente em uma feira itinerante de animais oriunda do estado de Santa Catarina. Os achados clínicos e amostras de secreção ou tecidos coletados estão sumarizados no Quadro 1, oito animais apresentavam sinais sistêmicos e neurológicos, um apenas sinais sistêmicos e outro apenas sinais neurológicos.

### Cultivos celulares e amostras virais padrão

Para a produção de estoques virais que servissem como positivos na reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) padronizada no presente trabalho, foram utilizadas células da linhagem contínua MDCK (Madin-Darby canine kidney), cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> (TPP, Trasadingen, Suíça), na concentração de 1,3x10<sup>5</sup> células/mL em E-MEM (Cultilab, Campinas, SP) com 10% de soro fetal bovino (SFB, Sigma Chemical Company), por 24h à 37°C. Foi utilizada como amostra padrão do CDV a estirpe vacinal Lederle (ATCC VR128), a qual foi gentilmente cedida pelo Laboratório BIVET S.A. (Vargem Grande Paulista, SP).

### Isolamento viral

Alíquotas do sobrenadante de cada amostra de tecido macerado foram filtradas com membrana de 0,45µm, 1mL desta solução foi utilizada para inoculação em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo monocamadas de MDCK com 24 h de cultivo. As garrafas foram incubadas a 37°C por 1h para adsorção viral e ao fim deste período completou-se com 7mL de E-MEM suplementado com enrofloxacin 10%. Utilizou-se o mesmo protocolo para o controle negativo (células sem inóculo) e para o controle positivo (células infectadas com a amostra padrão). As culturas foram observadas diariamente até o sétimo dia após a inoculação para visualização do efeito citopático (ECP), as garrafas então foram congeladas a -80°C, descongeladas, o conteúdo centrifugado (3000 x g/15 min) e 1mL do sobrenadante inoculado em novo cultivo celular. Foram efetuadas 10 passagens cegas para cada amostra.

**Quadro 1. Dados clínicos e vacinais dos indivíduos selecionados para o presente estudo**

Caso	Idade e sinais clínicos	Status vacinal
LVA-C 04	14 meses	Desconhecido
LVA-C 05	Idade indeterminada, convulsões; mioclonias; paresia MPs	Desconhecido
LVA-C 06	Idade indeterminada, convulsões; mioclonias; paresia MPs	Desconhecido
LVA-C 09	Idade indeterminada, sinais clínicos não relatados	Desconhecido
LVA-C 10	24 meses; corrimento naso-ocular; leucopenia	Atraso 16 meses
LVA-C 13	36 meses; corrimento nasal e ocular; tosse esporádica; mioclonias; paralisia MPs; vocalização	Sem vacinas
LVA-C 17	Sinais neurológicos	Desconhecido
LVA-C 18	2 meses; convulsões; ataxia MPs; mioclonias, ectoparasitose; subnutrição	Não vacinado
LVA-C 19	4 meses; sinais gastrointestinais; convulsões; mioclonias MAS; pústulas abdominais	2 doses vacinas polivalente (60-90dias)
LVA-C 20	3 meses; convulsões; mioclonias; secreção naso-ocular; pústulas abdominais; gastroenterite	Desconhecido
LVA-C 21	4 anos; nistagmo horizontal; ausência de propriocepção 4 membros; mioclonia temporal e palpebral; hiperreflexia; hiperacusia	Desconhecido
LVA-C 22	4 meses, sinais gastrointestinais; respiratórios; hiperalgesia; vocalização; mioclonias MAS; subnutrição	2 doses vacinas polivalente
LVA-C 23	3 meses; paralisia MPs; hiperalgesia; procedência SP	Desconhecido
LVA-C 24	3 meses; sinais gastrointestinais ; respiratórios; neurológicos	Desconhecido
LVA-C 25	3 meses; sinais gastrointestinais; respiratórios; neurológicos	Desconhecido
LVA-C 26	10 anos; sinais gastrointestinais e neurológicos	Reforço anual 2 meses antes da morte

MPs = membros posteriores; Mas = membros anteriores.

#### Extração do RNA viral

O RNA foi extraído a partir de 200µL do sobrenadante obtido do processamento dos tecidos ou, para amostras padrão em cultivo celular, foi utilizado como material para extração 200µL de um raspado da monocamada celular infectada com 20% de ECP ou com até 5 dias de cultivo. A extração do RNA viral foi realizada por meio *kit* High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Diagnostika, Basileia, Suíça).

#### Detecção molecular do gene H de CDV

Para a síntese do cDNA, utilizou-se o kit comercial SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, CA, USA), seguindo metodologia recomendada pelo fabricante, utilizando iniciadores randômicos.

#### Reação de RT-PCR

A reação de PCR foi padronizada para concentração ótima dos diferentes reagentes utilizando controles positivos e negativos. Sequências do gene H depositadas no GenBank foram usadas para desenhar os oligonucleotídeos iniciadores utilizando o programa Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>), denominados CDV-H1 (5'- GTT GCC ACA AAA RCT AAACGA-3', posição 453 do gene H) e CDV-H2 (5'- CCT CCY AAG GGT TCC CAT GA -3', posição 1196 do gene H), resultando em um amplicon esperado de 882 pb. Para cada reação com volume final de 50µL contendo 2µL de cDNA, foram acrescentados os seguintes reagentes nas concentrações finais: 1x tampão de PCR, 10 mM de dNTPs (0,2

mM de cada), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 pmol de cada iniciador CDV-H1 e CDV-H2, 2,5 U da enzima Taq- polimerase (Invitrogen, CA, USA) e água q.s.p. A mistura foi aquecida por 5 min. a 94°C para desnaturação seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 min, 53°C durante 45 segundos e alongamento a 72°C por 2 min e uma extensão final de 72°C por 10 min em um termociclador PCR System 9700 (Gene Amp, Applied Biosystems®). O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,7% contendo 0,5mg de brometo de etídeo/mL de gel e usando 0,5x de tampão TBE (Tris base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0), em voltagem constante (90V) por 40 min. O produto foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e as imagens registradas com o equipamento Image Master VDS (Amersham Pharmacia®).

Durante a fase de padronização da RT-PCR, foi utilizada ainda uma amostra de outro paramixovírus de cães, o vírus da Parainfluenza canina tipo-2 (CPiV2), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Paulo Michel Roehe (Universidade Federal do Rio Grande do Sul), para controle da especificidade analítica da técnica. Ao longo de todo o trabalho, foi utilizado como controle negativo da RT-PCR uma amostra de tecido neurológico de um canino (identificado como LVA-26) que veio a óbito por causas não relacionadas à infecção por CDV.

#### Sequenciamento nucleotídico

Os amplicons gerados na RT-PCR foram purificados pelo *kit* GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckingham, Reino Unido), de acordo com instruções do fabricante. Utilizou-se para o sequenciamento o BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems, Foster city, USA), cuja reação consistiu de da adição de 2µL de Big Dye; 2µL do tampão Save Money 5x; 1 pmol de cada iniciador senso e antisenso em reações separadas; 1 ou 2µL de cada amostra, dependendo da intensidade da banda gerada com os produtos purificados, água ultra-pura q.s.p. para um volume final de 10µL. A solução foi aquecida a 92°C por 1 min e 30 ciclos de 96°C por 30 s; 50°C por 15 s e 60°C por 4 min, seguido de resfriamento até 4°C até retirada do termociclador. As amostras foram precipitadas utilizando 30 µL água ultra pura livre de DNases e 60µL de isopropanol P.A., mantidas em temperatura ambiente por 15 min, centrifugadas a 20000xg a 17°C por 25 min. O sobrenadante foi descartado e 150µL de isopropanol 75% foram adicionados. Novamente as amostras foram centrifugadas a 20000xg a 17°C por 10 min e secas. A sequência de nucleotídeos foi determinada através de um sequenciador automático de DNA (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster city, USA).

#### Análise filogenética

O alinhamento das sequências foi realizado com o aplicativo ClustalW, versão 1.83 (Thompson et al. 1997). Imperfeições nos alinhamentos e artefatos presentes nas sequências foram editados minimamente usando a versão 7.01 do aplicativo BioEdit (Hall 1999). Previamente à reconstrução filogenética, foi analisado o modelo de substituição de nucleotídeos através do Modeltest (Posada & Crandall 1998). A reconstrução filogenética foi realizada pelo método de *neighbor-joining*, Kimura-2 parâmetros através do programa de computador MEGA 4 (Tamura et al. 2007). As sequências obtidas foram comparadas com sequências nucleotídicas do gene H de outros isolados de CDV obtidas no GenBank. Foram testadas amostras de diferentes continentes, incluindo Europa, América do Norte e Ásia (Japão). A sequência do gene H (AF479274) de morbilivírus isolado de focas (*Phocine distemper virus*) foi utilizada como grupo externo. Foram considerados como significativos valores de *bootstrap* superiores a 70.

**RESULTADOS**

**Isolamento viral e RT-PCR**

Nenhuma das amostras biológicas analisadas foi positiva no isolamento viral. Em 10 dos 15 indivíduos testados pela técnica de RT-PCR, a presença de sequências do gene H do CDV foi evidenciada em pelo menos um dos órgãos avaliados. Dentre as amostras de secreções, na única alíquota de urina coletada, detectou-se a presença do RNA viral, e as quatro amostras de LCR geraram resultados negativos. Dentre as quatorze amostras de SNC coletadas, 9 foram positivas pela técnica de RT-PCR para detecção do gene H. Amostras de outros tecidos foram coletadas, quando disponíveis, e submetidas ao teste de RT-PCR no intuito de investigar a presença de RNA viral em outros sistemas, além do SNC. Em relação a essas amostras encontrou-se: 5 amostras de baço e pulmão positivas em 8 testadas; 2 amostras positivas de bexiga em 7 testadas; 1 amostra de linfonodo positiva em 3 testadas; 2 amostras de rim positivas em 2 testadas; 1 amostra de fígado positiva em 1 testada; 1 amostra de timo positiva em 1 testada (Quadro 2).

**Sequenciamento e análise filogenética molecular**

Foi possível utilizar sequências nucleotídicas de apenas 5 das 10 amostras positivas nas reações de RT-PCR, pela reduzida qualidade das sequências obtidas para os demais amplicons. A análise das amostras sequenciadas (LVA20, LVA22, LVA 23, LVA24, LVA25) revelou elevada identidade com amostras de CDV européias (97,8 a 98,1%, DQ494317; DQ494319 e DQ494318). Na reconstrução filogenética obtida as amostras foram agrupadas próximas ao grupo destas amostras europeias, de amostras norte-americanas mais recentes (AY964114) e de amostras japonesas (AB025271; AB191319; AB191322 e AB191321); este

**Quadro 2. Relação das amostras de tecidos e secreções dos indivíduos testados pela RT-PCR para detecção do gene H e resultados para cada caso e amostras biológicas**

Caso	Tecidos ou secreções analisados	Resultado
LVA-C 5	SNC	-
LVA-C 6	SNC	-
LVA-C 9	SNC	+
LVA-C 10	SNC	-
LVA-C 13	SNC	-
LVA-C 17	SNC; Ba; Pul	+ (SNC)
LVA-C 18	SNC	+
LVA-C 19	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (SNC; Ba)
LVA-C 20	SNC; Ba; Pul; Bx	+ (SNC; Pul)
LVA-C 21	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (SNC)
LVA-C 22	SNC; Ba; Pul; Bx	+ (SNC; Ba; Pul)
LVA-C 23	SNC; Ba; Pul; Bx; Ln; LCR	+ (Ba; Pul; Ln)
LVA-C 24	SNC; Ba; Pul; Bx; LCR; T; Rim; U	+ (todas; - LCR)
LVA-C 25	SNC; Ba; Pul; Bx; Fig; Rim	+ (todas)
LVA-C 26	SNC	-

(+) Positivo; (-) negativo; SNC = sistema nervosa central; Ba = baço; Pul = pulmão; Bx = bexiga; Ln = linfonodos; LCR = líquido céfalo raquidiano.

grupo encontra-se geneticamente mais distante do grupo nomeado America-1, composto das estirpes vacinais Snyder Hill (AF259552), Onderstepoort (D00758) e Lederle (Fig.1).

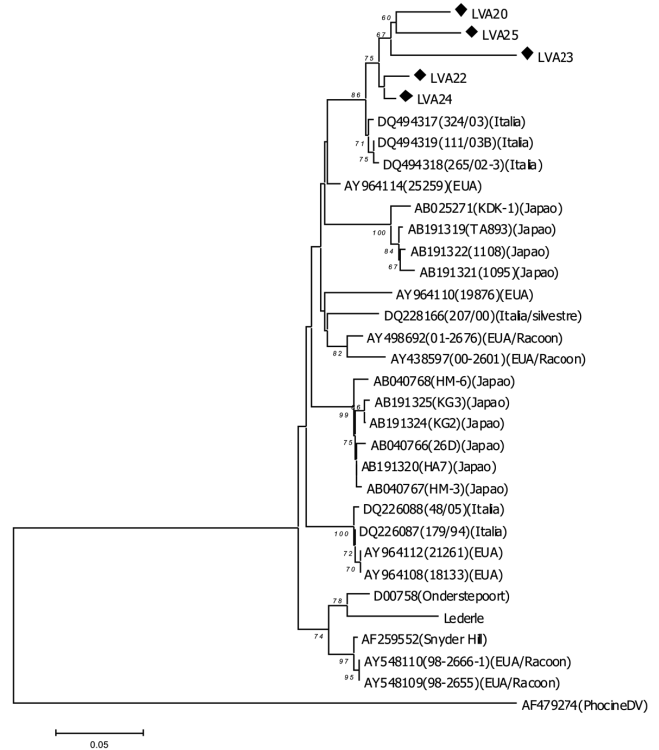


Fig.1. Árvore filogenética enraizada utilizando a sequência de nucleotídeos de um segmento do gene que codifica a proteína H do CDV. As amostras analisadas estão marcadas com um losango. Apenas valores de bootstrap acima de 70 são mostrados. A sequência derivada de morbilivírus de focas (PhocineDV; AF479274) foi utilizada como grupo externo.

**DISCUSSÃO**

Não foi possível isolar o CDV a partir das amostras coletadas, mas 10 amostras resultaram positivas na RT-PCR. Tais achados se assemelham àqueles observados por diferentes autores no que tange aos índices de confirmação do diagnóstico no laboratório e distribuição do CDV nos diferentes órgãos, seja por técnicas de PCR convencionais ou em tempo-real (Del Puerto et al. 2010, Elia et al. 2006, Headley et al. 2009)

Os quinze animais utilizados neste estudo foram eutanasiados em decorrência da evolução dos sintomas neurológicos. Todavia, em cinco dos animais, não houve resultado positivo para presença do genoma de CDV em nenhum dos tecidos ou secreções analisados. Além de limitações que podem mesmo estar relacionadas à RT-PCR quanto à sensibilidade analítica, presença de inibidores nas amostras testadas, entre outras e sinais neurológicos diversos podem ainda ocorrer em cães nos casos de intoxicação por várias substâncias químicas (organofosforados), nas alterações anatômicas ou traumáticas do SNC (displasia occipital, síndrome vestibular), secundário a alterações sistêmicas como hepato- e nefropatias ou infecções por outros agentes infecciosos (Thomas 1998). Esta diversidade de

possíveis causas para sinais clínicos de comprometimento nervoso em cães e um terço de animais negativos na detecção laboratorial no presente estudo apontam que, salvo falhas inerentes à técnica de diagnóstico molecular empregada, uma parte considerável dos casos frequentemente diagnosticados na clínica como cinomose podem na verdade ser manifestações de outras enfermidades com sinais clínicos semelhantes.

Amostra de urina foi colhida de um único indivíduo, LVA-C 24 e material genômico do CDV foi detectado neste material. Assim como em todas as outras amostras de tecidos testadas deste animal, com exceção do LCR que apresentou resultado negativo na RT-PCR. Diferentes estudos apontam que a urina pode ser uma amostra biológica importante para uso no diagnóstico ante-mortem (Amude et al. 2006). Em outro estudo, um fragmento do gene N do CDV pode ser amplificado a partir de amostras de urina em vinte e dois caninos testados e sugeriram ser a urina mais sensível que o soro e leucócitos e tão sensível quanto o LCR, quando comparados os resultados (Saito et al. 2006). Entretanto, estes mesmos autores obtiveram resultados inexpressivos ao testar LCR, soro e sangue total periférico. Fragmentos do genoma de CDV não foram detectados em amostras de LCR em nenhum indivíduo testado durante todo o período pós-infecção avaliado em um estudo conduzido para detecção do vírus em diversos tecidos (Kim et al. 2006) assim como outros investigadores também encontraram resultados negativos no RT-PCR de LCR de animais com cinomose diagnosticada por meio de imuno-histoquímica (Frisk et al. 1999). Com a técnica de detecção molecular padronizada neste trabalho as quatro amostras de LCR de animais positivos para o CDV geraram resultados negativos. Um baixo número de cópias de RNA viral no LCR pode estar relacionada a dificuldades na detecção do genoma do CDV no LCR (Amude et al. 2006). A tentativa de isolamento viral a partir de amostras de diferentes órgãos não teve sucesso, mesmo para as amostras de indivíduos positivos para o CDV pela RT-PCR. Quando os cultivos celulares expostos às amostras biológicas foram testados pela RT-PCR apenas o RNA extraído da primeira passagem do sobrenadante de tecido nervoso do canino LVA-17 gerou um resultado positivo, mas este mesmo material foi negativo para o fragmento genômico alvo nas 9 passagens subsequentes. A linhagem celular adotada para este trabalho, MDCK, foi também utilizada por outros pesquisadores para o isolamento de CDV a partir de amostras de tecidos infectados (Lednicky et al. 2004). Lednicky et al. (2004) testaram as linhagens MDCK, MV 1 LU e Vero para o isolamento de amostras de CDV a partir de tecidos de guaxinins. A detecção viral por RT-PCR ocorreu mais precocemente em células MDCK, entretanto o ECP foi mais evidente no material inoculado em células Vero.

Nos últimos anos, a análise de fragmentos genômicos do gene H e de outros genes de CDV têm permitido identificar diferentes classes filogenéticas classificadas de acordo com sua origem geográfica (Ásia-1, Ásia-2, Europa, USA, Ártico) e/ou ao ano de identificação da amostra (América-1: 1930-1950; velhos CDVs) (Mochizuki et al. 1999, Martella et al. 2002, Pardo et al. 2005). A análise filogenética realizada neste trabalho, baseada em um segmento de 570pb do

gene H sugere que as amostras avaliadas neste estudo encontram-se geneticamente relacionadas às linhagens europeias e norte-americanas recentemente descritas, também chamadas na literatura de novos CDVs, tais como a amostra 25259 (isolada em 2004) (Pardo et al. 2005). Neste mesmo taxon estão agrupadas as amostras italianas identificadas entre os anos 2000 a 2004. Esse grupo encontra-se próximo à linhagem Ásia 1, onde estão agrupadas a amostra japonesa KDK-1 (1998) e amostras norte-americanas (Pardo et al. 2005, Sultan et al. 2009, Woma et al. 2010). É notável nos resultados de filogenia obtidos no presente trabalho e na literatura recente, o distanciamento das amostras detectadas no campo em relação ao grupo América-1, onde se encontram as amostras comumente utilizadas em vacinas.

Mochizuki et al. (1999) sugerem que a importação de animais possa explicar a entrada de uma estirpe de CDV identificada em casos clínicos no Japão em 1999. Martella et al. (2006) também acreditam que o aumento do deslocamento global de animais possa ter propiciado o aparecimento de amostras incomuns de CDV na Itália. Pardo et al. (2005) especulam que a transmissão interespecífica do CDV possa esclarecer a epidemia de cinomose em guaxinins no ano de 2001 estar associada a um vírus da linhagem Ártica no ressurgimento do CDV na América do Norte e sua posterior disseminação a outros países no grupo nomeados de novos CDVs.

Com relação ao *status* vacinal apenas para os indivíduos LVA-C 22 e LVA-C 19 referiam duas doses de vacinas aplicadas aos sessenta e noventa dias de idade. O produto utilizado adota a estirpe Onderstepoort. Sobre os outros indivíduos nenhuma informação sobre vacinação prévia foi obtida. Associados aos dados de filogenia obtidos, o quadro geral dos achados sugere que o aumento da ocorrência da doença possa estar relacionado com as diferenças genotípicas entre as estirpes circulantes e as existentes nas vacinas atualmente utilizadas como método profilático contra a cinomose canina. Todavia, faltam estudos de epidemiologia molecular mais amplos ou mesmo experimentos de imunização e proteção cruzada que possam atestar tais inferências.

**Agradecimentos.**- FRS é Bolsista de Produtividade do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- Amude A.M., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2006. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet. Res. Commun.* 30:679-687.
- Amude A.M., Carvalho G.D.A., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2007. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Braz. J. Microbiol.* 38:354-356.
- Beineke A., Puff C., Seehusen F. & Baumgärtner W. 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127:1-18.
- Castilho J.G., Brandão P.E., Carnieli Jr P., Oliveira R.N., Macedo C.I., Peixoto Z.M.P., Carrieri M.L. & Kotait I. 2007. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 59:654-659.
- Chan K.W., Hsieh H.H., Wang H.C., Lee Y.J., Sung M.H., Wong M.L. & Hsu W.L. 2009. Identification, expression and antigenic analysis of recombinant hemagglutinin proteins of canine distemper virus. *J. Virol. Methods* 155:18-24.

- De Almeida Curi N.H., Araújo A.S., Campos F.S., Lobato Z.I.P., Gennari S.M., Marvulo M.F.V., Silva J.C.R. & Talamoni S.A. 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation* 19:3513-3524.
- Deem S.L., Spelman L.H., Yates R.A. & Montali R.J. 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo Wildl. Med.* 31:441-451.
- Del Puerto H.L., Vasconcelos A.C., Moro L., Alves F., Braz G.F., Martins A.S. 2010. Deteção do vírus da cinomose canina em cães assintomáticos e não vacinados. *Pesq. Vet. Bras.* 30:139-144.
- Demeter Z., Palade E.A., Hornyák Á. & Rusvai M. 2010. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 142:420-426.
- Elia G., Decaro N., Martella V., Cirone F., Lucente M.S., Lorusso E., Di Trani L. & Buonavoglia C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 136:171-176.
- Evermann J.F. 2008. Accidental introduction of viruses into companion animals by commercial vaccines. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 38:919-929.
- Frisk A.L., König M., Moritz A. & Baumgärtner W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37:3634-3643.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 41:95-98.
- Headley S.A., Amude A.M., Alfieri A.F., Bracarense A.P.F.R.L., Alfieri A.A. & Summers B.A. 2009. Molecular detection of Canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:588-597.
- Horzinek M.C. 2006. Vaccine use and disease prevalence in dogs and cats. *Vet. Microbiol.* 117:2-8.
- Kapil S., Allison R.W., Johnston Iii L., Murray B.L., Holland S., Meinkoth J. & Johnson B. 2008. Canine distemper virus strains circulating among north American dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:707-712.
- Kim D., Jeoung S.Y., Ahn S.J., Lee J.H., Pak S.I. & Kwon H.M. 2006. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 68:877-879.
- Lednicky J.A., Meehan T.P., Kinsel M.J., Dubach J., Hungerford L.L., Sarich N.A., Witecki K.E., Braid M.D., Pedrak C. & Houde C.M. 2004. Effective primary isolation of wild-type Canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *J. Virol. Methods* 118:147-157.
- Martella V., Elia G. & Buonavoglia C. 2008. Canine distemper virus. *Vet. Clin. North Am., Small Anim. Pract.* 38:787-797.
- Martella V., Pratelli A., Cirone F., Zizzo N., Decaro N., Tinelli A., Foti M. & Buonavoglia C. 2002. Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Molecular and Cellular Probes* 16:77-83.
- Megid J., De Souza V.A.F., Teixeira C.R., Cortez A., Amorin R.L., Heinemann M.B., Cagnini D.Q. & Richtzenhain L.J. 2009. Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic analyses. *J. Wildl. Dis.* 45:527-530.
- Megid J., Teixeira C.R., Amorin R.L., Cortez A., Heinemann M.B., De Paula Antunes J.M.A., Da Costa L.F., Fornazari F., Cipriano J.R.B., Cremasco A. & Richtzenhain L.J. 2010. First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. *J. Wildl. Dis.* 46:303-305.
- Mochizuki M., Hashimoto M., Hagiwara S., Yoshida Y. & Ishiguro S. 1999. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the haemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 37:2936-2942.
- Pandher K., Podell B., Gould D.H., Johnson B.J. & Thompson S. 2006. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18:201-204.
- Pardo I.D.R., Johnson G.C. & Kleiboeker S.B. 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43:5009-5017.
- Posada D. & Crandall K. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Posuwan N., Payungporn S., Thontiravong A., Kitikoon P., Amonsin A. & Poovorawan Y. 2010. Prevalence of respiratory viruses isolated from dogs in Thailand during 2008-2009. *Asian Biomedicine* 4:563-569.
- Saito T.B., Alfieri A.A., Wosiacki S.R., Negrão F.J., Morais H.S.A. & Alfieri A.F. 2006. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80:116-119.
- Sawatsky B. & Von Messling V. 2010. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J. Virology* 84:2753-2761.
- Schultz R.D. 2006. Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Vet. Microbiol.* 117:75-79.
- Silva M.C., Figuera R.A., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2007. Clinicopathological features in 620 neurological cases of canine distemper. *Pesq. Vet. Bras.* 27:215-220.
- Silva M.C., Figuera R.A., Mazzanti A., Brum J.S., Pierezan F. & Barros C.S.L. 2009. Neuropathology of canine distemper: 70 cases (2005-2008). *Pesq. Vet. Bras.* 29:643-652.
- Sultan S., Charoenvisal N., Lan N.T., Yamaguchi R., Maeda K. & Kai K. 2009. The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper viruses. *Virology Journal* 6:157.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. & Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Thomas W.B. 1998. Inflammatory diseases of the central nervous system in dogs. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 13:167-178.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.
- Woma T.Y., Van Vuuren M., Bosman A.M., Quan M. & Oosthuizen M. 2010. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: Lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143:126-132.
- Yeşilbag K., Yılmaz Z., Özkul A. & Pratelli A. 2007. Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *Vet. Rec.* 161:169-170.