

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA  
DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS NOS ESTADOS DE MATO GROSSO E  
RONDÔNIA**

MAYARA LIMA KAVASAKI

CUIABÁ – MT  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA  
DO VÍRUS DA CINMOSE CANINA EM CÃES NATURALMENTE  
INFECTADOS NOS ESTADOS DE MATO GROSSO E  
RONDÔNIA**

Autor: Mayara Lima Kawasaki

Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade Animal, da Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ – MT

### **Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

L732c Lima Kawasaki, Mayara.  
Caracterização do gene da proteína hemaglutinina do Vírus da cinomose canina em cães naturalmente infectados nos Estados de Mato Grosso e Rondônia. : Characterization of the canine distemper hemagglutinin protein gene in dogs naturally infected in the states of Mato Grosso and Rondônia.] / Mayara Lima Kawasaki. -- 2020  
28 f. ; 30 cm.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.  
Co-orientador: Luciano Nakazato.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Canine Morbillivirus. 2. Hemagglutinin Gene. 3. RT-PCR. 4. Phylogenetic analysis. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS NOS ESTADOS DE MATO GROSSO E RONDÔNIA.**

**AUTORA: MESTRANDA MAYARA LIMA KAVASAKI**

Dissertação defendida e aprovada em **28 de maio de 2020**.

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

1. Doutor Daniel Moura de Aguiar (Presidente Banca / Orientador)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
2. Doutora Michele Lunardi (Examinador Externo)  
Instituição: UNIVERSIDADE DE CUIABÁ-UNIC
3. Doutor Kledir Anderson Hofstaetter Spohr (Examinador Interno)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
4. Doutora Valéria Dutra (Examinador Suplente)  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

**Cuiabá, 28 de maio de 2020.**



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL MOURA DE AGUIAR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 18/06/2020, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 22/06/2020, às 14:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Lunardi, Usuário Externo**, em 25/06/2020, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.ufmt.br/sei/controlador\\_externo.php?](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?)

[acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2604900** e o código CRC **68154D15**.

---

Referência: Processo nº 23108.041890/2020-69

SEI nº 2604900

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de dedicar esta monografia a Ele, visto que sem o dom da imaginação e criatividade, que nos foi dado por Ele, eu não teria inspiração para produzir este texto.

Agradeço também, à Universidade Federal de Mato Grosso, seu corpo docente, direção e administração, que me agraciaram com a oportunidade de uma pós graduação tão completa.

Ao meu orientador, Daniel Moura de Aguiar, pelo suporte fornecido a mim, pelas correções e incentivos.

Agradeço a minha família por mais que distantes, longes sempre de uma forma indireta me apoiaram e me ajudaram para ter forças para nunca desistir e sempre tentar ser alguém melhor.

A todos meus colegas que me ajudaram tanto de forma direta como indireta para a realização deste trabalho, são eles: Sayane, Maerle, Isis, Amanda, Marcela Natacha. Aos professores responsáveis pela disciplina de seminários por todo aprendizado e ao técnico Edmilson.

Agradeço principalmente aos que falaram que eu não chegaria aonde cheguei.

Agradeço ao amor que tenho pela profissão que escolhi.

Muito Obrigada a todos!

## EPÍGRAFE

Suponha que exista outro reino que, de alguma forma, se sobrepõe ao seu, de modo que, no que parece ser o mesmo espaço, pode haver uma Rainha da Inglaterra mas também uma Rainha das Fadas. Suponha que existam portas que levam a esse reino com o qual você ou eu poderíamos dar de cara. Ou: suponha que existam mundos totalmente diferentes, cercados por estrelas totalmente diferentes, habitados por seres com os quais pudéssemos nos comunicar e conversar - e suponha que também existam portas para esses reinos. Mais ainda: se você por acaso for cristão, suponha que, embora esse mundo seja, em certos aspectos, estranho ao nosso, ele também foi criado pelo mesmo Deus que ama e cuida de nós? Apenas suponha.  
(LEWIS, 2015, p. 341)

## RESUMO

### **Caracterização da proteína hemaglutinina do Vírus da cinomose canina em cães naturalmente infectados nos Estados de Mato Grosso e Rondônia.**

O Morbillivirus canino (CDV) é o agente etiológico da cinomose canina (CC), uma importante doença de cães e carnívoros silvestres caracterizada por alta morbidade e mortalidade. A proteína hemaglutinina (H) presente no envelope possui importante função de adsorção viral e por isso apresenta elevada variabilidade genética em relação aos outros genes do CDV. Por essa razão tem sido utilizada para caracterizar as estirpes do CDV, permitindo a identificação de linhagens específicas. Diante do exposto o objetivo do presente estudo foi caracterizar a proteína hemaglutinina (H) em estirpes de CDV detectados em 15 cães naturalmente infectados no estado de Mato Grosso e Rondônia. As amostras foram coletadas de tecido nervoso central de cães que vieram a óbito. Foram inicialmente submetidas a RT-PCR para detecção do gene do nucleocapsídeo (N). As positivas foram em seguida testadas para amplificar o gene H. Em dez amostras houve amplificação completa do gene H. Análise filogenética revelou que as amostras se posicionaram em dois grupos: um geneticamente relacionado com isolados do Uruguai e, outro com linhagens oriundos de cepas brasileiras (especificamente dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul), todas as sequências foram classificadas dentro do genótipo América do Sul I/ Europa.

**Palavras-chave:** Morbillivirus canino, Gene da Hemaglutinina, RT-PCR, Análise filogenética.

## ABSTRACT

### **Characterization of the haemagglutinin protein of canine distemper virus in naturally infected dogs in the States of Mato Grosso and Rondônia**

Canine Morbillivirus (CDV) is the etiological agent of canine distemper (CC), an important disease of dogs and wild carnivores characterized by high morbidity and mortality. The hemagglutinin (H) protein present in the envelope has an important function of viral adsorption and therefore has high genetic variability in relation to the other CDV genes. For this reason, it has been used to characterize CDV strains, allowing the identification of specific strains. Given the above, the objective of the present study was to characterize the hemagglutinin (H) protein in CDV strains detected in 15 naturally infected dogs in the states of Mato Grosso and Rondônia. The samples were collected from central nervous tissue of dogs that died. They were initially submitted to RT-PCR to detect the nucleocapsid (N) gene. The positive ones were then tested to amplify the H gene. In ten samples, there was complete amplification of the H gene. Phylogenetic analysis revealed that the samples were positioned in two groups: one genetically related to isolates from Uruguay and the other with strains from Brazilian strains (specifically from the states of Paraná and Rio Grande do Sul), all sequences were classified within the South America I / Europe genotype.

**Keywords:** Canine Morbillivirus, Hemagglutinin Gene, RT-PCR, Phylogenetic analysis.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
1 INTRODUÇÃO .....	7
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	10
Taxonomia e morfologia.....	10
Sinais Clínicos .....	11
Hospedeiros.....	12
3. OBJETIVOS .....	13
3.1 OBJETIVO GERAL .....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
Amostras.....	14
Extração de RNA .....	14
Oligonucleotídeos iniciadores .....	14
Reação de Re-transcriptase seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR) .....	15
Sequenciamento de nucleotídeos e análise filogenética.....	16
5. RESULTADOS .....	17
6. DISCUSSÃO .....	20
7. CONCLUSÃO.....	23
8. REFERÊNCIAS.....	24

## 1 INTRODUÇÃO

Cinomose Canina é uma doença infecto-contagiosa causada pelo Morbillivirus canino (*Canine morbillivirus* - CDV). A doença possui grande importância não só no Brasil como no mundo, devido principalmente a sua vasta ocorrência, forma de transmissão e mortalidade (APPEL; SUMMERS, 1999).

Provavelmente o vírus do sarampo e o da cinomose canina se estabeleceram após o desenvolvimento da agricultura, uma ponte necessária entre humanos e animais para manter os vírus à medida que infecções endêmicas surgiam. Em 1598, Bartolomé de Las Casas (Narração de Las Casas), retrata através de uma pintura cães sendo regularmente alimentados com carne de humanos mortos infectados pelo sarampo no Novo Mundo, em toda a América Central e do Sul. Inclui-se neste período grandes pandemias de sarampo, e os cães de guerra foram amplamente utilizados para subjugar a resistência aborígine (UHL et al., 2019).

O cientista Don Antonio de Ulloa, relatou pela primeira vez o CDV ao participar como membro da Missão Geodésica Francesa em 1735, realizada para dimensionar o Equador, na sua descrição havia várias características clínicas clássicas, incluindo a semelhança da doença com a varíola em humanos (BLANCOU, 2004; UHL et al., 2019).

Além de grandes populações urbanas de cães, a falta de castração e a gestação canina relativamente curta, com tempo de aproximadamente 63 dias foram provavelmente fatores importantes na manutenção da infecção durante as travessias transatlânticas pelas quais o CDV chegou à Europa em 1760 (BLANCOU, 2004; FLEMING, 1882).

Secreções e tecidos infectados por vírus são vias comuns pelos quais os *Morbillivirus* saltam para uma nova espécie, forma pela qual cães domesticados infectaram animais selvagens de vida livre ou em cativeiro (DUIGNAN, et al., 2014; SAKAI, et al., 2013).

A capacidade do CDV de infectar outras espécies demonstra o potencial evolutivo desses vírus altamente infecciosos, sendo atualmente um dos membros mais ameaçadores do gênero *Morbillivirus* (UHL, et al., 2019).

A amostra viral, idade, estado imunológico do animal infectado e a localização das lesões estão associados com o curso da infecção (MARTELLA,

et al., 2008). A infecção ocorre principalmente pela inalação de aerossóis com partículas virais. Cães com infecção aguda sistêmica eliminam o vírus através das fezes, saliva, urina e exsudatos conjuntivais e nasais. O vírus se replica primariamente em macrófagos nos tecidos do trato respiratório superior, logo, se espalha para amígdalas e gânglios linfáticos regionais. No período entre o oitavo e décimo dia pós infecção há disseminação por via hematogena ou pelo líquido cefalorraquidiano (APPEL, et al., 1972).

O diagnóstico de rotina da cinomose canina é realizado com base no histórico do animal, sinais clínicos e nos exames complementares, como métodos diretos de isolamento e detecção do vírus e seus produtos e indiretos que detectam e quantificam anticorpos virais específicos (POZZA, et al., 2007).

Por se tratar de um vírus epitélio e neurotrópico de alta morbidade e mortalidade, é imprescindível que o diagnóstico seja firmado rápido, nesse sentido os testes imunocromatográficos fornecem resultados rápidos sem a necessidade de equipamentos para a interpretação e são utilizados diariamente na rotina médica veterinária (*point of care test*) (POSTIGO, 2017). A desvantagem destes testes está relacionada a fase de infecção viral posto que a sensibilidade do teste é maior durante a fase epitelial da patogenia (MANGIA e PAES, 2016). Por isso a técnica da reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR) do genoma viral vem sendo utilizada com sucesso na detecção do CDV em cães com sinais clínicos sistêmicos e neurológicos a partir de amostras de urina (GEBARA, et al., 2004).

O CDV é um RNA vírus, de fita simples de cadeia negativa, que contém 15.690 nucleotídeos associado a capsídeo helicoidal com envelope de diâmetro variável entre 150 a 250 nanômetro (HEADLEY, et al., 2012). O genoma viral contém seis unidades de transcrição dispostas linearmente, separadas por regiões não traduzidas (*Untranslated region* - UTRs), que contêm sinais essenciais de transcrição e tradução. As unidades de transcrição codificam oito proteínas: Nucleoproteína (N), Fosfoproteína (P), Proteína de membrana (M), Proteína polimerase (*Large Protein* - L), Fusão (F) e Hemaglutinina (H). Fases de leitura aberta (*Open read frame* - ORFs) sobrepostas originam as proteínas adicionais V e C (RENDON MARIN, et al., 2019).

Segundo BUDASZEWSKI et al. (2014), a glicoproteína H determina a citopatologia e tropismo do vírus, podendo variar em até 10% entre isolados de

CDV. A partir desta variação as amostras virais foram classificadas filogeneticamente em nove linhagens denominadas América I, América II, Ásia I, Ásia II, Europa vida selvagem, Ártica, África do sul, América do Sul I/Europa e América do Sul II (BUDASZEWSKI et al., 2014, MANGIA E PAES, 2016). Neste estudo, BUDASZEWSKI et al. (2014) revelaram que as principais linhagens circulantes no Brasil são América do Sul I/Europa, que incluem isolados do sul do Brasil, Uruguai, Argentina e países europeus. Cepas semelhantes a estirpe Rockborn foram também identificadas.

Relatos de falhas vacinais na profilaxia sugerem diferenças antigênicas entre CDV selvagens e estirpes utilizadas nas vacinas comerciais, que ocorrem principalmente na glicoproteína hemaglutinina (HAAS, et al., 1999).

Estudos realizados no Brasil têm demonstrado a presença de estirpes virais que divergem das cepas utilizadas nas vacinas comerciais. Surtos causados pelo CDV podem levar espécies raras a extinção tanto em zoológicos e refúgios de vida silvestre, quanto animais domésticos (BUDASZEWSKI, et al., 2017).

Diante do exposto, o presente objetiva caracterizar o gene codificante da proteína hemaglutinina a partir de amostras de cães naturalmente infectados dos estados de Mato Grosso e Rondônia. Por meio de técnicas de *Nested* RT-PCR, sequenciamento de nucleotídeos espera-se obter informações etiológicas de linhagens circulantes do CDV nesses locais, que possam nortear focos urbanos e silvestres da doença, bem como determinar o grau de variação antigênica dentro dessas populações.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### Taxonomia e morfologia

O Morbillivirus canino (*Canine distemper virus* - CDV) é membro da ordem *Mononegavirales*, pertencentes à família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* (APPEL; SUMMERS, 1999), incluem atualmente o vírus do sarampo (MeV), vírus da cinomose canina (CDV), morbilivírus dos cetáceos (CeMV), vírus da cinomose dos focídeos (PDV), vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV) e vírus da peste bovina (RPV), o qual foi declarado oficialmente erradicado pela Organização Mundial de Saúde Animal e o recentemente descoberto morbilivírus dos felinos (FeMV), (VALENCIA, et al., 2019).

O genoma do CDV compreende 15.690 nucleotídeos (15,6 kb), o vírus é pleomórfico (formas esférica e filamentosa), com um tamanho entre 150-300 nm de diâmetro e contém um genoma que compreende ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e não segmentada de sentido negativo. O genoma inclui genes organizados em unidades transcricionais separadas e não sobrepostas que codificam seis proteínas: proteína nucleocapsídeo (N), fosfoproteína (P), polimerase viral (*Large protein* - L), matriz (M) e as glicoproteínas hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F), (APPEL; SUMMERS, 1999).

As unidades transcricionais são separadas por regiões não traduzidas (UTRs) que são relativamente uniformes (107-155 nucleotídeos), exceto a UTR entre os genes M e F, que possui aproximadamente 405 nucleotídeos. Essa UTR modula a virulência através do controle de tradução da proteína F (ANDERSON, et al., 2008).

O gene P possui 1524 nucleotídeos, é altamente conservado e codifica a *phosphoprotein* viral e duas proteínas não estruturais adicionais V e C. A proteína V suprime a resposta imune inata, inibindo a indução de interferons do tipo I e II e a atividade de o complexo NF-kappa B na célula hospedeira (SCHUHMANN, et al., 2011; CHINNAKANNAN et al., 2013). O gene L é altamente conservado e contém 6555 nucleotídeos, e o gene N contém 1572 nucleotídeos. As proteínas P, L e N juntas formam o complexo de transcrição e replicação, conhecido como ribonucleoproteína (WOLFE, et al., 2007).

Quando os cães se recuperam da infecção, eles desenvolvem anticorpos neutralizantes contra a proteína H, que confere imunidade a doença (SCHUITZ, et al., 2010). Foi demonstrado que, para esse gene, as estirpes circulantes e as cepas vacinais são altamente divergentes (7-10% para nucleotídeos e 8-11% para aminoácidos) com uma identidade nucleotídica entre 93-90% e identidade de aminoácidos entre 92 e 89%. É por causa dessa alta variabilidade que esse gene é usado para a classificação filogenética do CDV em diferentes linhagens ou genótipos (VALENCIA, et al., 2019).

O gene F é composto por 1989 nucleotídeos e codifica a proteína de fusão (F). Após a ligação da proteína H ao receptor celular do hospedeiro, a proteína F medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática do hospedeiro (RUSSELL, et al., 2001; BRINGLOF, et al., 2017).

## **Sinais Clínicos**

Em cães o CDV causa uma doença com sinais clínicos multissistêmicos, variando desde sinais entéricos, respiratórios, neurológicos, oftalmológicos e dermatológico, com alto coeficiente de morbidade e mortalidade (TIPOLD, 1995).

As manifestações clínicas neurológicas causadas incluem encefalites agudas e crônicas, tanto em cães jovens como em idosos (BEINEKE et al., 2009).

A infecção pelo CDV pode ainda resultar em doença subclínica (assintomática) ou acompanhada de manifestações clínicas, a principal via de infecção ocorre através contato do animal com fômites ou via aerossóis (ELIA, et al., 2015).

Para o desenvolvimento da doença clínica, a infecção pelo CDV passa por duas fases: primeiro, há uma infecção aguda do sistema linfático e segundo, ocorre uma replicação viral há células epiteliais seguidas de disseminação viral que permite a transmissão a outros indivíduos suscetíveis. O CDV também pode invadir o sistema nervoso central provavelmente mediado por um terceiro receptor putativo chamado Gliar localizado nas células da glia (ALVES, et al., 2015; MESSLING, et al., 2003).

## Hospedeiros

O CDV infecta várias espécies da ordem Carnivora, incluindo cães domésticos (*Canis lúpus familiaris*, família *Canidae*) e várias outras espécies selvagens das famílias, *Felidae*, *Procyonidae*, *Mustelidae*, *Hyaenidae*, *Ursidae* e *Viverridae*. Alguns estudos também relataram infecção por CDV em outras famílias de mamíferos, como, como *Cricetidae* (roedor), e *Cercopithecidae* (macacos do Velho Mundo) (GUTIERREZ, et al., 2016).

O cão doméstico é o mais numeroso carnívoro no mundo, com uma população estimada em mais de 500 milhões de animais e devido a essa grande população servem como elo para a troca de patógenos entre animais e seres humanos (SALB, et al., 2008).

segundo dados do IBGE de 2013, o número de animais de estimação nos lares brasileiros já chega a 74,3 milhões, destes 52,2 milhões são cães e 22,1 milhões de gatos (IBGE, 2013).

Recentemente a infecção foi descrita na família *Myrmecophagidae*, espécie (*Myrmecophaga tridactyla*) e (*Tamandua tetradactyla*), localizada no centro-oeste do Brasil (GRANJEIRO, et al., 2020; LUNARD et al., 2018).

Diferentes estudos relataram a ligação entre a infecção pelo CDV e o declínio da população de várias espécies selvagens. GUTIERREZ, et al. (2016), destacaram o possível papel do CDV como causa de extinção de certas espécies selvagens ameaçadas (TERIO et al., 2013). Foram relatados surtos de CDV em espécies quase extintas, como o panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) em um centro de resgate e conservação de animais selvagens na China, com uma morbidade que atingiu 27% da população local e mortalidade de 23% (FENG, et al., 2016).

Na Etiópia, 68% de uma população de lobo etíope (*Canis simensis*) foi dissimada pelo vírus (GORDON, et al., 2015). O CDV também foi relatado em locais de criação de macacos (*Macaca fuscata* e *Macaca mulata*) (QUI, et al., 2011).

No Parque Nacional do Serengeti, na Tanzânia, o CDV foi detectado em canídeos e espécies não-canídeos com resultados variados da doença, dependendo da cepa genética envolvida. Em 1993-1994 duas espécies não caninas, (*Panthera leo*) e hiena-malhada (*Crocuta crocuta*), foram infectadas

através de uma população de cães locais infectados por CDV na África (NIKOLIN, et al., 2017).

Os dados epidemiológicos da Europa mostram taxas variáveis de soroprevalência de CDV em espécies selvagens, particularmente em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) variando de 4% a 30% em países como a Espanha, Portugal, Itália e Alemanha (MARTELLA, et al., 2010). Na América Central e do Sul, a presença de CDV em 2% dos felídeos selvagens foi relatado na Costa Rica (AVENDANO, et al., 2016), enquanto no Brasil a soroprevalência foi relatada em várias espécies de carnívoros selvagens variando entre 10,6 a 23% (MEGID, et al., 2009; FURTADO et al., 2016).

As epidemias letais de CDV em várias espécies ressaltam a capacidade do vírus causar mortalidade em carnívoros, impactando negativamente as populações selvagens (WOODROFFE, et al., 2004). Esses dados permitem propor que o CDV, ao infectar espécies ameaçadas facilitam sua extinção.

O papel da imunidade adaptativa e da resposta imune do hospedeiro ao CDV tem sido amplamente discutido e estudado no cão doméstico (BEINEKE, et al., 2009).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Amplificar e caracterizar o gene da proteína hemaglutinina do vírus do Morbillivirus canino em cães naturalmente infectados procedentes dos estados de Mato Grosso e Rondônia.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

a- Amplificar parcialmente o gene N e obter sua sequência de nucleotídeos para caracterização molecular.

b- Amplificar o gene H e obter sua sequência de nucleotídeos para caracterização molecular.

c- Verificar a variabilidade genética por meio do estudo das sequências de nucleotídeos completa do gene H das cepas identificadas nos estados de MT e RO

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

##### **Amostras**

Foram avaliadas amostras de tecido nervoso central (cerebelo e medula oblonga) de 14 cães naturalmente infectados pelo CDV, coletadas *post mortem*, entre agosto de 2018 e abril de 2019 em Hospital Veterinário e clínicas veterinárias no estado de Mato Grosso (MT) e Rondônia (RO). Os cães foram oriundos das cidades de Poconé (amostras MT1, MT2, MT3, MT4), Cuiabá (MT5, MT6), Sinop (MT7, MT8, MT9, MT10, MT11, MT12) e Jí-Paraná (RO1 e RO2).

##### **Extração de RNA**

Para extração do RNA viral, as amostras de cérebro foram maceradas em PBS, pH7,2 (tampão fosfato-salino) estéril, acrescido com 1% de solução de antibiótico e antimicótico (A5955, Sigma-Aldrich). Em seguida foram centrifugadas a 800Xg por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para a extração por meio do kit comercial *ReliaPrep RNA Cell Miniprep System*, (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo foi utilizado estirpe vacinal atenuado e água ultrapura como controle negativo.

##### **Oligonucleotídeos iniciadores**

Os oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificar fragmentos dos genes N e H foram sintetizados como descrito por An et al. (2008), Budaszewski et al. (2014), Frisk et al. (1999), Harder et al. (1996) e Hashimoto et al. (2001). A Tabela 1 apresenta os oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Para a amplificação do gene H, foram utilizadas duas etapas de amplificação (*nested*). Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos RH3-F e RH4-R em reação *Onestep*, enquanto na segunda foram utilizados os oligonucleotídeos H1F / H1R, H2F / H2RB, H3FB / H3R e CDVF10B / CDVR10,

em reação convencional de PCR (Tabela 1). Os fragmentos sobrepostos contêm 789, 523, 253 e 870 pares de base (pb) respectivamente, conforme demonstrado na Tabela 1.

### **Reação de Re-transcriptase seguida da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR)**

Após a extração de RNA, a transcrição reversa e as PCR foram realizadas por meio de Kit *OneStep AccessQuick™ RT-PCR System* (Promega®), com desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos para desnaturação a 94°C, hibridização (*annealing*) de 30 segundos a 50°C, extensão 2 minutos a 72°C e extensão final 7 minutos a 72°C. Nesta reação foram incluídos os oligonucleotídeos CDV-1F/CDV-2R para amplificar o gene N e RH3-F/RH4-R para o gene H, conforme recomendação fabricante do Kit. O volume final da reação foi de 50 µL. A *nested* PCR foi realizada pra finalizar a amplificação do gene H utilizando 3µL do primeiro produto. Nesta reação foi utilizado o Kit *GoTaq Mix™* (Promega®) conforme condições do fabricante. O protocolo incluiu a desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 30 segundos para desnaturação a 94°C, hibridização (*annealing*) a 50°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes N e H pertencentes ao CDV, de amostras provenientes dos estados de MT e RO

Primer	Sequência do oligonucleotídeo iniciador (5' – 3')	Gene	Pares de bases	Referência
CDV-1F	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	N	287	Frisk et al. (1999)
CDV-2R	CAAGATAACCATGTACGGTGC	N		Frisk et al. (1999)
RH3-F	AGGGCTCAGGTACTIONCCAGC	H	789	Harder et al. (1996)
RH4-R	AATGCTAGAGATGGTTTAATT	H		Harder et al. (1996)
H1F	ATGCTCTCCTACCAAGACAA	H		An et al. (2008)
H1R	CATGTCATTCAGCCACCGTT	H		An et al. (2008)
H2F	AATATGCTAACCGCTATCTC	H	523	An et al. (2008)
H2RB	TTTGGTTGCACATAGGGTAG	H		Budaszewski et al. (2014)
H3FB	CATATGATATATCCCGGGGC	H	253	Budaszewski et al. (2014)
H3R	TCARGGWTTTKAACGRYYAC	H		An et al. (2008)
CDVF10B	TAYCATGAYAGYARTGGTTC	H	870	Hashimoto et al. (2001)
CDVR10	ARTYYTCRACACTGRTKGTG	H		Hashimoto et al. (2001)

#### Sequenciamento de nucleotídeos e análise filogenética

Os produtos da amplificação dos genes N e H foram purificados com *ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega ®) e suas sequências determinadas em reação de sequenciamento utilizando Kit *Big Dye* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, USA) em sequenciador automático de DNA modelo *Applied Biosystems 3500 – Genetic Analyzer* (Hitachi), segundo o manual de instruções. As sequências do gene N obtidas foram analisadas pelo software *Geneious prime2019* e posteriormente comparado com outras sequências correspondentes a diferentes isolados do CDV disponíveis no GenBank. Os produtos do gene H foram analisados para obtenção e montagem da sequência genômica utilizando o software *Geneious prime2019*. As sequências obtidas no presente estudo foram comparadas entre si e com outras 71 sequências de outros países disponíveis no GenBank. As sequências obtidas dos genes N e H foram posteriormente alinhadas por ClustalW em software MEGA6, seguido da construção de árvore filogenética baseado em modelo de distância de Tamura-Nei, método de *Neighbor-Joining* com bootstrap no valor de 1000 repetições. O

vírus do sarampo foi utilizado como ancestral comum para confecção da árvore filogenética (*outgroup*).

## 5. RESULTADOS

Todas as amostras analisadas foram positivas para o gene N, e destas, dez amostras apresentaram-se positivas para o gene H (MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6, MT7, MT8, MT10 e RO2).

Os produtos da amplificação do gene N variaram de 208 a 281 nucleotídeos, foram sequenciados e apresentaram-se idênticos entre si (100%). Quando comparados com as sequências disponíveis no GenBank, as sequências do presente estudo apresentaram 98,2 a 100% de similaridade.

As 10 sequências agrupadas em um único clado, composto pelas amostras MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6, MT8, MT10, MT11 e RO2. A amostra MT7 apresentou um menor fragmento e por isso não foi incluído na análise filogenética. Todas as amostras apresentaram 99% de identidade com isolados provenientes de São Paulo. Todas as amostras de CDV apresentaram identidade de nucleotídeos variando entre 94,2% a 97,3% com as amostras vacinais Onderstepoort e Snyder 4Hill (Figura 1).

As sequências referentes ao nucleocapsídeo, foram depositadas no GenBank como CDV/MT1: MT119982, CDV/MT2: MT119983, CDV/MT3: MT119984, CDV/MT4: MT119985, CDV/MT5: MT119986, CDV/MT6: MT119987, CDV/MT8: MT119988, CDV/MT10: MT119989, CDV/MT11: MT119990 CDV/RO1: MT119991, CDV/RO2: MT119992.

As Sequências referentes a hemaglutina, foram depositadas no GenBank como CDV/MT1: MT119972, CDV/MT2: MT119973, CDV/MT3: MT119974, CDV/MT4: MT119975, CDV/MT5: MT119976, CDV/MT6: MT119977, CDV/MT7: MT119978, CDV/MT8: MT119979, CDV/MT10: MT119980, CDV/RO2: MT119981.

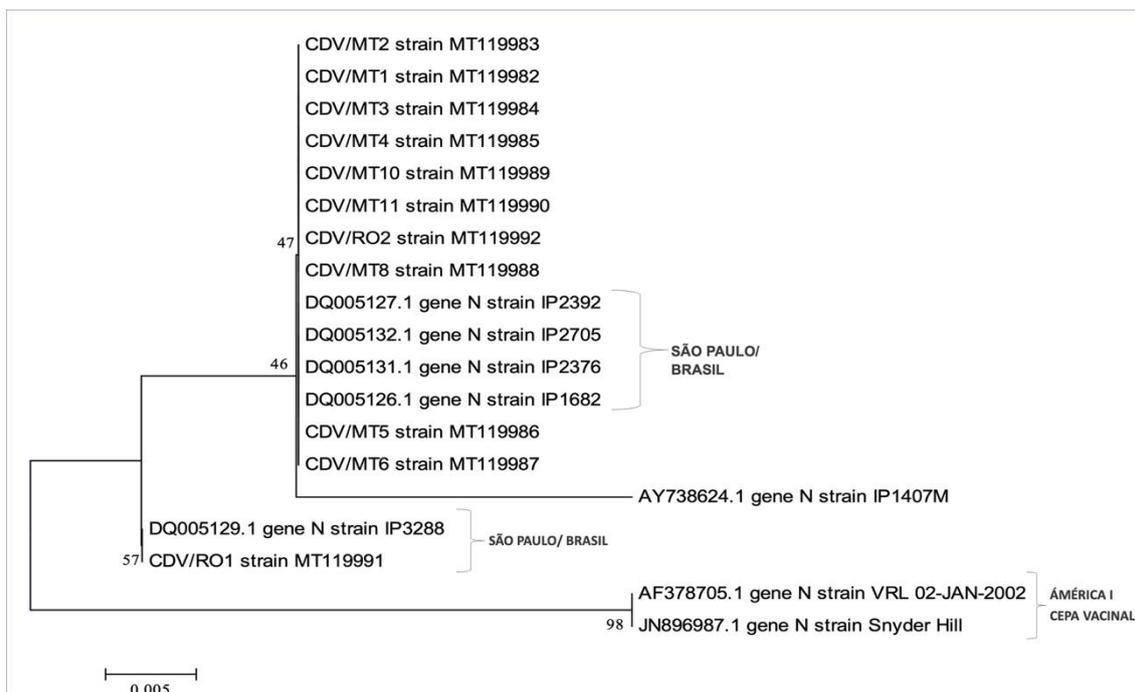


Figura 1. Relação filogenética entre cepas de CDV, selecionadas com base nas sequências do gene do nucleocapsídeo (N), inferida usando o método Maximum likelihood – Tamura 3. As cepas de CDV estão indicadas como CDV/MT1, CDV/MT2, CDV/MT3, CDV/MT4, CDV/MT5, CDV/MT6, CDV/MT8, CDV/MT10, CDV/MT11, CDV/RO2 e seus devidos códigos do GenBank. Os valores de bootstrap indicados nos nós foram calculados em 1000 réplicas de alinhamento. A barra de escala sob a árvore representa 0,005 substituições de nucleotídeos por local.

Os produtos da amplificação do gene H variaram de 1792 a 1803 nucleotídeos, foram sequenciados e apresentaram similaridade variando de 99 a 100%. Quando comparados com as sequências disponíveis no GenBank as sequências do presente estudo apresentaram 99 a 100% de similaridade. Análise filogenética, demonstrou que as sequências foram agrupadas em dois grupos (Figura 2). No primeiro, uma das quinze sequências analisadas (MT8), apresentou-se agrupado com isolados do Uruguai. Esta sequência foi classificada dentro do genótipo América do Sul I/ Europa, apresentando grau de identidade variando entre 97,11 % a 97,44%. As amostras MT1, MT2, MT3, MT4, MT5, MT6, MT7, MT10 e RO2 foram alocadas em outro grupo próximo de linhagens oriundas de isolados brasileiros dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, bem como da Europa, estas sequências apresentaram 94,3 a 94,8% de

similaridade com cepas vacinais clássicas (Convac, CDV3, Snyder Hill, e Onderstepoort).

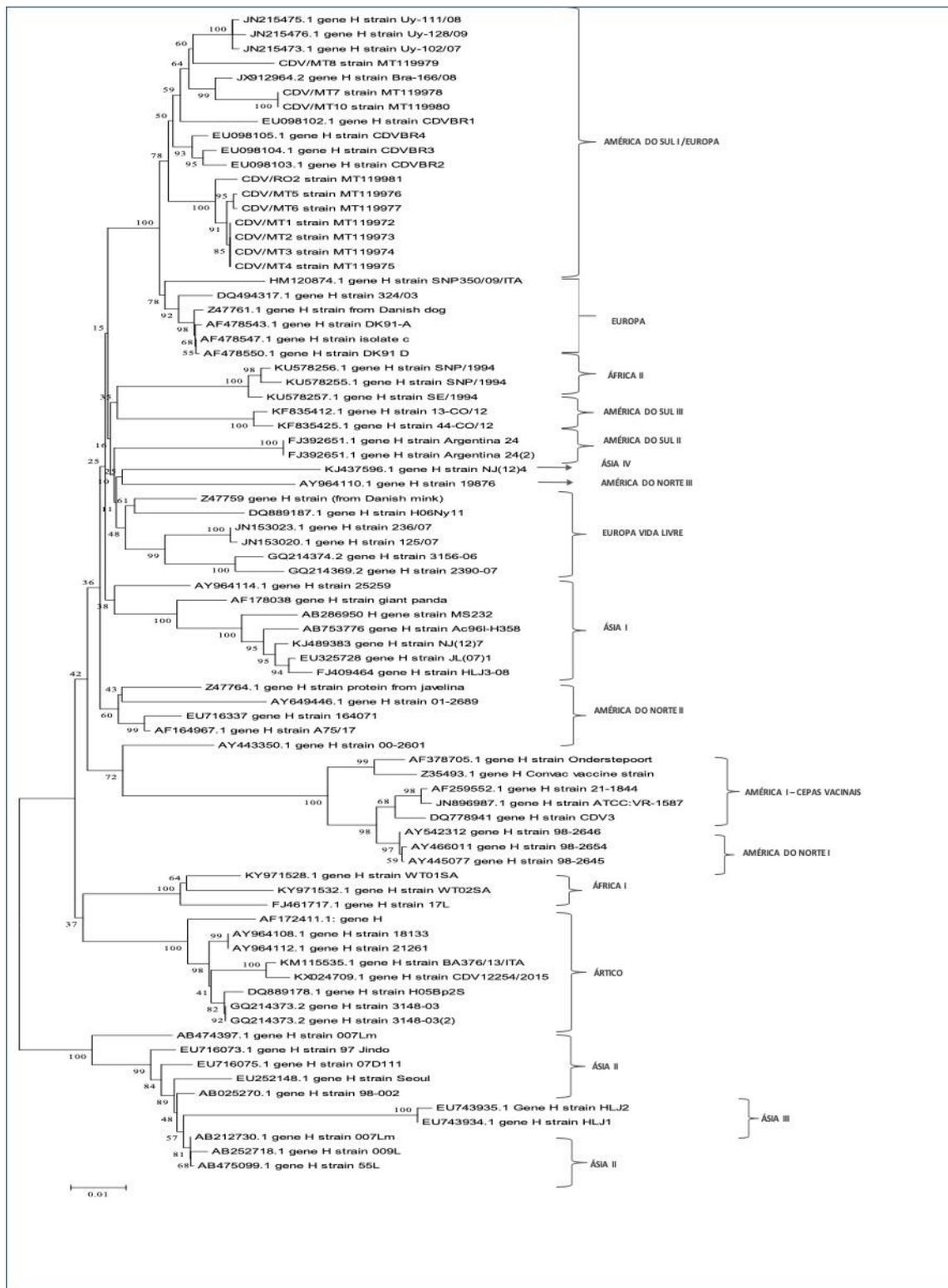


Figura 2. Relação filogenética entre cepas de CDV, selecionadas com base nas sequências do gene da hemaglutinina completa (H). A análise filogenética foi inferida usando o método Neighbor Joining - Tamura 3. As dez cepas de CDV que foram analisadas no presente estudo estão indicadas como CDV/MT1, CDV/MT2, CDV/MT3, CDV/MT4, CDV/MT5, CDV/MT6, CDV/MT7, CDV/MT8, CDV/MT10 e CDV/RO2. Os valores de bootstrap indicados nos nós foram calculados em 1000 réplicas de alinhamento. A barra de escala sob a árvore representa 0,01 substituições de aminoácidos por local.

## 6. DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou amostras do CDV oriundos dos estados de Mato Grosso e Rondônia, por meio de amostras de tecido nervoso de cães que morreram na fase neurológica da infecção. Para confirmar infecção pelo CDV utilizou-se à amplificação parcial do gene do nucleocapsídeo (N) por ser conservado, ou seja para determinar quais as amostras de animais suspeitos de infecção por CDV seriam investigadas. Posteriormente, as amostras positivas foram reavaliadas pela amplificação do gene da hemaglutinina (H), a qual apresenta variabilidade suficiente para distinguir linhagens do CDV.

As amostras apresentaram identidade de nucleotídeos do gene N variando de 94,2% a 97,3% com as amostras vacinais Onderstepoort e Snyder Hill. Análises filogenéticas em amostras de outro inquérito baseadas no gene N, também demonstraram similaridade média de nucleotídeos ao redor de 95% com as amostras vacinais Onderstepoort e Lederle (Castilho *et al.*, 2007). *A priori*, as amostras do gene do nucleocapsídeo avaliadas no presente estudo são conservadas, o que é esperado visto a conservação desta proteína (BUDASZEWSKI *et al.*, 2014).

A amostra RO1 não apresentou amplificação do gene H. Este resultado pode ter ocorrido por eventual degradação da amostra, pois a reação visa amplificar vários fragmentos que variam de 253 a 870 pares de bases que devem ser alinhados para formar a sequência de 1824 pb do gene H. Por outro lado, não se descarta a possibilidade da presença de estirpes nativas ou mutantes quais não apresentariam complementariedade com os oligonucleotídeos utilizados.

Análises filogenéticas e evolutivas moleculares do morbillivirus canino têm revelado que o surgimento da infecção em novas espécies hospedeiras podem estar associado a mutações que afetam o receptor (CD150 / SLAM ou Nectina-4), local de ligação ao aminoácido 549 da proteína H. Estudos sugerem que os resíduos de aminoácidos 530 e 549 da proteína H estão associados à especificidade do hospedeiro e substituições nessas duas posições-chave estão relacionadas a transmissão cruzadas entre espécies (Zhao *et al.*, 2014).

A maioria das amostras analisadas para o gene H neste estudo apresentaram um padrão já demonstrado anteriormente por Budaszewski *et al.* (2014). As linhagens circulantes no Brasil subdividem-se em oito subgenótipos. As sequências originadas no presente estudo agruparam um desses subgenótipos em clado que inclui isolados dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, além de genótipos circulantes em países europeus. Mediante esta análise filogenética os isolados pertencentes a este clado classificam-se nas linhagens América do Sul I e Europa.

Análises filogenéticas da hemaglutinina, realizadas por Cortez *et al.* (2017), revelaram que as estirpes de CDV brasileiras estão geneticamente relacionadas as estirpes circulantes no Uruguai, Argentina e Europa. Por isso, o grau de divergência genética entre as linhagens selvagens de CDV brasileiras e as estirpes vacinais são maiores e neste caso, sugere-se a possibilidade de ocorrer surtos da doença devido a falhas vacinais nas regiões estudadas.

A circulação de animais entre continentes, surge como uma das hipóteses para a alta similaridade entre isolados da América do Sul e países europeus. Os Estados Unidos e a Europa Ocidental, por exemplo, realizam melhor profilaxia pois utilizam cepas vacinais mais próximas dos isolados de campo que ocorrem nessas regiões. Por outro lado, essas mesmas estirpes vacinais são utilizadas em regiões onde os isolados circulantes são mais distantes filogeneticamente, como na Europa Central e Oriental, onde diferentes cepas variantes foram relatadas. O mesmo cenário ocorre na América do Sul, o que pode explicar a presença de dois subgenótipos distintos encontrados entre as amostras de Mato Grosso (Demeter *et al.*, 2007).

Quatro das seis amostras do presente estudo eram provenientes do município de Poconé localizada à cerca de 100 km de Cuiabá- MT e um dos principais acessos para o Pantanal Matogrossense, reforçando o fato de que

populações de cães domésticos podem agir como reservatórios do morbillivirus canino para carnívoros selvagens. Jorge (2010), demonstrou que carnívoros selvagens, pertencentes a Reserva Particular do Patrimônio Natural do SESC Pantanal (RPPN – SESC Pantanal) situada na mesma região foram expostos ao morbillivirus canino em algum momento de suas vidas. Cães domésticos criados ao redor da estação apresentaram títulos elevados para o CDV e tais dados reforçam a ideia que os cães estariam mantendo o vírus circulante e transmitindo aos carnívoros selvagens.

Após caracterização da hemaglutinina em isolados de cães infectados, Woma *et al.* (2010), demonstraram que quatro cepas vacinais, comumente comercializadas na África do Sul, eram geneticamente distintas das cepas em circulação. As amostras MT2 e MT4, apresentaram aproximadamente 92,6% de similaridade com as principais cepas vacinais circulantes no continente americano, dentre elas: Convac (GenBank: Z35493.1), CDV3 (GenBank: DQ778941.1), Snyder Hill (GenBank: AF259552; JN896987) e Onderstepoort (GenBank: AF378705.1). Considerando os mais de 65 anos entre o isolamento da linhagem Onderstepoort e os isolados deste estudo, sugere-se que essas amostras pertencem a linhagens mais antigas do CDV. A grande maioria das vacinas utilizadas atualmente foram desenvolvidas na década de 1950, com base na linhagem América I e estirpe vacinal Onderstepoort (Budaszewski *et al.*, 2017).

Nosso estudo relata pela primeira vez o sequenciamento do gene H, de amostra de CDV no estado de Rondônia. BUDASZEWSKI *et al.* (2014), realizou um estudo para caracterização e genotipagem do CDV no Brasil, através de amostras de swab retal de cães, em sete estados brasileiros: Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Rondônia e Mato Grosso, porém não conseguiram sequências do gene H de nenhuma das amostras testadas do estado de RO.

## **7. CONCLUSÃO**

Os dados presentes indicam a presença de dois grupos de CDV circulante em Mato Grosso e Rondônia, com alto grau de similaridade com cepas do Paraná e Rio Grande do Sul, Uruguai, Itália, Espanha, Europa, porém menor proximidade com cepas vacinais clássicas. Todas as amostras do presente estudo, ficaram agrupadas na linhagem América do Sul I/Europa. Os resultados suportam trabalhos anteriores de que RT-PCR do gene H em combinação com sequenciamento genético é uma ferramenta sensível para caracterizar com precisão o CDV no cenário atual.

## 8. REFERÊNCIAS

ALVES, L.; KHOSRAVI, M.; AVILA, M.; ADER-EBERT, N.; BRINGOLF, F.; ZURBRIGGEN, A.; VANDELVELDE, M.; PLATTET, P. SLAM- and nectin-4-independent noncytolytic spread of canine distemper virus in astrocytes. **J. Virol.** v.89, p.5724–5733, 2015.

ANDERSON, D.E.; VON MESSLING, V. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. **J. Virol.** v.82, p.10510–10518, 2008.

AVENDANO, R.; BARRUETA, F.; SOTO-FOURNIER, S.; CHAVARRIA, M.; MONGE, O.; GUTIERREZ-ESPELETA, G.A.; CHAVES, A. Canine Distemper Virus in Wild Felids of Costa Rica. **J. Wildl. Dis.** v.52, p.373–377, 2016.

APPEL, M. J. G.; GILLESPIE, J. H. Canine distemper virus. **Virology Monographs**, v.11, p. 1-96, 1972.

APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Canine Distemper: Current Status. **Advances**, 1999.

BUDASZEWSKI, R. F.; HUDACEK, A.; SAWATSKY, B.; KRÄMER, B.; YIN, X.; SCHNELL, M. J.; MESSLING, V.V. Inactivated Recombinant Rabies Viruses Displaying Canine Distemper Virus Glycoproteins Induce Protective Immunity against Both Pathogens. **Journal of Virology-American Society For Microbiology.** v. 91, E.8-02077-16, 2017.

BUDASZEWSKI, R.F. Estudos sobre vacinologia e evolução do vírus da cinomose canina. 2017. 119 f. Tese (Doutorado Ciências Veterinárias) **Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

BUDASZEWSKI, R. DA F.; PINTO, L. D.; WEBER, M. N.; TELES, E. C.; ALVES, C. D. B.; 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**, v.180, p.76–83, 2014.

BLANCOU, J., 2004. Dog distemper: imported into Europe from South America? **Hist. Med. Vet.** 29, 35–41.

BRINGOLF, F.; HERREN, M.; WYSS, M.; VIDONDO, B.; LANGEDIJK, J.P.; ZURBRIGGEN, A.; PLATTET, P. Dimerization efficiency of canine distemper virus matrix protein regulates membrane-budding activity. **J. Virol**, v. 91, 2017.

BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGÄRTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.127, n.1–2, p.1–18, 2009.

CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; FONSECA, A. A. J.; COSTA, L. F.; SOUZA, V. A. F.; MEGID, J. Genetic characterization of the haemagglutinin gene in canine distemper virus strains from naturally infected dogs in Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.54, p.445-449, 2017.

CHINNAKANNAN, S.K.; NANDA, S.K.; BARON, M.D. Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. **PLoS ONE**, v.8, p.57063, 2013.

DEMETER, Z., LAKATOS, B., PALADE, E.A., KOZMA, T., FORGACH, P., RUSVAI, M. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. **Vet.Microbiol.** v.122, p. 258-269, 2007.

DUIGNAN, P.J., VAN BRESSEM, M.F., BAKER, J.D., BARBIERI, M., COLEGROVE, K.M., DE GUISE, S., DE SWART, R.L., DI GUARDO, G., DOBSON, A., DUPREX, W.P., EARLY, G., FAUQUIER, D., GOLDSTEIN, T., GOODMAN, S.J., GRENFELL, B., GROCH, K.R., GULLAND, F., HALL, A., JENSEN, B.A., LAMY, K., MATASSA, K., MAZZARIOL, S., MORRIS, S.E., NIELSEN, O., ROTSTEIN, D., ROWLES, T.K., SALIKI, J.T., SIEBERT, U., WALTZEK, T., WELLEHAN, J.F. Phocine distemper virus: current knowledge and future directions. **Viruses**, v.6, p.5093–5134, 2014

ELIA, G.; CAMERO, M.; LOSURDO, M.; LUCENTE, M. S.; LAROCCA, V.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. **J. Virol. Methods**. v. 213, p.127–130, 2015.

FENG, N.; YU, Y.; WANG, T.; WILKER, P.; WANG, J.; LI, Y.; SUN, Z.; GAO, Y.; XIA, X. Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. **Sci. Rep.** v.6, p.27518, 2016.

FLEMING, G. A Chronological History of Animal Plagues; Their History, Nature and Prevention. Chapman and Hall, London. 1882.

FRISK, A.L., KÖNIG, M., MORITZ, A., BAUMGÄRTNER, W. 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.** v.37, p.3634-3643, 1999.

Furtado, M.M.; Hayashi, E.M.; Allendorf, S.D.; Coelho, C.J.; de Almeida Jacomo, A.T.; Megid, J.; Ramos Filho, J.D.; Silveira, L.; Torres, N.M.; Ferreira Neto, J.S. Exposure of free-ranging wild carnivores and domestic dogs to canine distemper virus and parvovirus in the cerrado of central Brazil. **Ecohealth**, v.13, p.549–557.

GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRÃO, F. J.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.168–174, 2004.

GORDON, C.H.; BANYARD, A.C.; HUSSEIN, A.; LAURENSEN, M.K.; MALCOLM, J.R.; MARINO, J.; REGASSA, F.; STEWART, A.M.; FOOKS, A.R.; SILLERO-ZUBIRI, C. Canine distemper in endangered Ethiopian wolves. **Emerg. Infect. Dis.** v.21, p.824–832, 2015.

GUTIERREZ, M.; SAENZ, R. J.; Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: A systematic review and data synthesis. **BMC Vet.** v.12, n.78, 2016.

GRANJEIRO, M. D. B.; KAVASAKI, M.L.; MORGADO, T. O.; PAVELEGINI, L. A. D.; BARROS, M.A.; FONTANA, C.; BIANCHINI, M. A.; SOUZA, A. O.; LIMA, A. R. G. O. S.; LUNARDI, M.; COLODEL, E. M.; AGUIAR, D. M.; MENDONÇA, A. J. First report of a canine morbillivirus infection in a giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) in Brazil. **Veterinary Medicine and Science**. <https://doi.org/10.1002/vms3.246>, 2020.

HAAS, L.; LIERMANN, H.; HARDER, T. C. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. **Veterinary Microbiology**, v.69, n. 1–2, p.15–18, 1999.

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. **Ciencias Agrarias**, v.33, n.5, p.1945–1978, 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view>. Acesso em: 02 de agosto de 2020.

JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; MAY JÚNIOR, J. A.; MAROTO, G. R. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e Saúde Pública. **Oecologia Australis**, V.14, p. 686-710, 2010.

LUNARDI, M.; DAROLD, G. M.; AMUDE, A. M.; HESADLEY, S. A.; SONNE, L.; YAMAUCHI, K. C. I.; BOABAID, F. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Canine distemper virus active infection in order Pilosa, family *Myrmecophagidae*, species *Tamandua tetradactyla*. **Veterinary Microbiology**. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.030>.

MANGIA, S. H.; PAES, A. C. Cinomose. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas Em Animais de Produção e De Companhia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 560-579.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.38, n.4, p. 787–797, 2008.

MARTELLA, V.; BIANCHI, A.; BERTOLETTI, I.; PEDROTTI, L.; GUGIATTI, A.; CATELLA, A.; CORDIOLI, P.; LUCENTE, M.S.; ELIA, G.; BUONAVOGLIA, C. Canine distemper epizootic among red foxes, Italy, 2009. **Emerg. Infect. Dis**, v.16, p.2007, 2010.

MEGID, J.; DE SOUZA, V.A.; TEIXEIRA, C.R.; CORTEZ, A.; AMORIN, R.L.; HEINEMMAN, M.B.; CAGNINI, D.Q.; RICHTZENHAIN, L.J. Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: Case report and phylogenetic analyses. **J. Wildl. Dis.** v.45, p.527–530, 2009.

NIKOLIN, V.M.; OLARTE-CASTILLO, X.A.; OSTERRIEDER, N.; HOFER, H.; DUBOVI, E.; MAZZONI, C.J.; BRUNNER, E.; GOLLER, K.V.; FYUMAGWA, R.D.; MOEHLMAN, P.D. Canine distemper virus in the serengeti ecosystem: Molecular adaptation to different carnivore species. *Mol. Ecol*, v.26, p.2111–2130, 2017

POSTIGO, J.P. **Desenvolvimento de testes rápidos imunocromatográficos para detecção de Cinomose Canina**. 2017. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

POZZA, M.; SIMONETTI, A. B.; ESTEVES, P. A.; RIJSEWIJK, F. A. M.; ROEHE, P. M. Detecção do vírus da cinomose canina por RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos para os genes da fosfoproteína, hemaglutinina e neuraminidase. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, n.5, p.1154–1162, 2007.

QIU, W.; ZHENG, Y.; ZHANG, S.; FAN, Q.; LIU, H.; ZHANG, F.; WANG, W.; LIAO, G.; HU, R. Canine distemper outbreak in rhesus monkeys, China. *Emerg. Infect. Dis.* v.17, p.1541–1543, 2011.

RENDON, M. S.; BUDASZEWSKI, R. F; CANAL, C.W.; SAENZ, J.R. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology*, v.16, p.30, 2019.

RUSSELL, C.J.; JARDETZKY, T.S.; LAMB, R.A. Membrane fusion machines of paramyxoviruses: Capture of intermediates of fusion. *EMBO J*, v.20, p.4024–4034, 2001.

SAKAI, K., YOSHIKAWA, T., SEKI, F., FUKUSHI, S., TAHARA, M., NAGATA, N., AMI, Y., MIZUTANI, T., KURANE, I., YAMAGUCHI, R., HASEGAWA, H., SAIJO, M., KOMASE, K., MORIKAWA, S., TAKEDA, M. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J. Virol.* v.87, p.7170–7175, 2013.

SALB, L, A., BARKEMA, H, W., ELKIN, T, B., THOMPSON, A, C, R., WHITESIDE, P, D., BLACK, R, S., DUBEY, P, J., KUTZ, J, S. Dogs as sources and sentinels of parasites in humans and wildlife, northern Canada. *Emerging Infectious Diseases*. v 14, p. 1, 2008.

SCHUHMANN, K.M.; PFALLER, C.K.; CONZELMANN, K.K. The measles virus V protein binds to p65 (Rela) to suppress NF-kappaB activity. *J. Virol*, v.85, p.3162–3171, 2011.

SCHULTZ, R.D.; THIEL, B.; MUKHTAR, E.; SHARP, P.; LARSON, L.J. Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J. Comp. Pathol*, v.142, p.102–108, 2010.

TERIO, K.A.; CRAFT, M.E. Canine distemper virus (CDV) in another big cat: Should cdv be renamed carnivore distemper virus? *MBio*, v.4, p.00702–00713, 2013.

TIPOLD, A. Diagnosis of inflammatory and infectious diseases of the central nervous system in dogs: a retrospective study. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, v.9, n.5, p. 304–314, 1995.

UHL, E.W.; BUIKSTRAC, C. K. C.; BLICKD, J.P.; BOLOND, B.; HOGANE, R.J. New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. **International Journal of Paleopathology**, v.24, p.266-278, 2019.

VALENCIA, D. J.; SARUTE, N.; CASTILLO, O. X. A.; SÁENZ, R. J. Evolution and Interspecies Transmission of Canine Distemper Virus—An Outlook of the Diverse Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. **Viruses**, v.11, p.582, 2019.

WOLFE, N.D.; DUNAVAN, C.P.; DIAMOND, J. Origins of major human infectious diseases. **Nature**, v.447, p.279–283, 2007.

WOMA, T. Y.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A. M.; QUAN, M.; OOSTHUIZEN, M. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: Lineage. Africa. **Veterinary Microbiology**. v.143, p. 126-132, 2010

WOODRO, E, R.; CLEAVELAND, S.; COURTENAY, O.; LAURENSEN, M.K.; ARTOIS, A. Infectious disease. In *The Biology and Conservation of Wild Canids*; Macdonald, D.W., Sillero-Zubiri, C., Eds.; **Oxford University Press: Oxford, UK**, p. 123–142, 2004.

ZHAO, J.; ZHANG, H.; BAI, X.; MARTELLA, V.; HU, B.; SUN, Y.; ZHU, C.; 361 ZHANG, L., LIU, H.; XU, S.; SHAO, X.;WU, W.; YAN, X. Emergence of canine distemper virus strains with two amino acid substitutions in the haemagglutinin protein, detected from vaccinated carnivores in North-Eastern China in 2012–2013. **The Veterinary Journal**, v. 200, p. 191-194, 2014.