



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

NAYARA EMILY VIANA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
ANTÍGENOS DE MORBILLIVÍRUS CANINO EM FELÍDEOS  
NEOTROPICAIS DO SUL DO BRASIL**

---

Londrina  
2020

NAYARA EMILY VIANA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
ANTÍGENOS DE MORBILLIVÍRUS CANINO EM FELÍDEOS  
NEOTROPICAIS DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley.

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Viana, N. Viana, Nayara Emily.

E. CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE ANTÍGENOS DE MORBILLIVÍRUS CANINO EM FELÍDEOS NEOTROPICAIS DO SUL DO BRASIL / Nayara Emily Viana. - Londrina, 2020.  
35 f. : il.

Orientador: Selwyn Arlington Headley Headley.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Técnicas Imuno-histoquímicas - Tese. 2. Felídeos neotropicais - Tese. 3. Morbillivírus canino - Tese. I. Headley, Selwyn Arlington Headley. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

NAYARA EMILY VIANA

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE  
ANTÍGENOS DE MORBILLIVÍRUS CANINO EM FELÍDEOS  
NEOTROPICAIS DO SUL DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula F. R. L. Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Werner Okano  
Grupo Educacional Universitário - GEU

Londrina, 31 de julho de 2020.

Dedico esse trabalho à Deus, à minha família e ao meu marido.

## **AGRADECIMENTOS**

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente nos momentos de angústia; À minha família, por acreditar em mim em todos os instantes, mesmo que o mundo duvidasse. Mãe, a senhora é um exemplo de mãe e mulher, seu amor incondicional e cuidado me deram a esperança para seguir. Pai, seu carinho e dedicação com cada “comidinha” – Telefonemas me aconselhando, significaram que eu não estava sozinha nessa caminhada; Du, meu pequeno, você é um orgulho para a “tata”;

Ao meu orientador Professor Dr. Selwyn Arlington Headley, por todo carinho, dedicação, paciência concedida a mim durante este trabalho; por todo conhecimento dividido em cada leitura de lâmina – por ser esse ser humano iluminado e cativante;

Ao Professor Msc. Zalmir Silvino Cubas que disponibilizou os materiais utilizados neste e em outros estudos, agregando conhecimento sobre a fauna brasileira.

Ao meu namorado e futuro marido Felipe, por ser meu porto seguro, a centelha de luz que me iluminava quando o mundo parecia sombrio, sempre presente em cada momento, cuidando de mim, dividindo as dores e sofrimentos, compartilhando os trabalhos, finais de semana no laboratório e até mesmo os instantes que o silêncio falava por nós, eis que “Juntos somos mais fortes”;

Aos meus amigos que sempre permaneceram ao meu lado, me apoiando para seguir a jornada;

À Universidade Estadual de Londrina, aos professores e funcionários que colaboraram para a minha formação.

Depois de passar pela escuridão, você descobre que a luz não está no fim do túnel,  
mas sim em você (Chico Xavier).

“[...] It's the little things that make a home [...]"  
(Blue October)

Viana, Nayara Emily. **Caracterização imuno-histoquímica de antígenos de morbillivírus canino em felídeos neotropicais do sul do Brasil**. 2020. 36 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O morbillivirus canino (CDV) é considerado um patógeno emergente em animais silvestres e tem demonstrado alta capacidade de infectar diferentes espécies animais. Entretanto, relatos na literatura brasileira descrevendo a infecção de felídeos neotropicais são escassos. Conseqüentemente, o objetivo do trabalho foi identificar partículas virais de CDV em tecidos de felídeos neotropicais do Sul do Brasil utilizando um protocolo imuno-histoquímico (IHQ) para identificar a presença intralésional de antígenos do CDV, podendo então fazer a associação com os achados histopatológicos. Foram utilizados tecidos provenientes de três espécies de felídeos neotropicais: puma (*Puma concolor*, n=1), maracajá (*Leopardus wideii*, n=1) e gatomourisco (*Herpailurus yagouaroundi*). Todos os felídeos eram mantidos no Santuário Biológico de Bela Vista. Fragmentos de pulmão e vesícula urinária de todos os animais foram coletados e processados para avaliação histopatológica de rotina a fim de identificar possíveis padrões de lesões associados ao CDV, como ocorrido em cães domésticos. Com base no padrão da doença, identificado pela histopatologia, foram realizados ensaios de IHC para identificação de antígenos do CDV. A análise histopatológica revelou pneumonia intersticial nos pulmões do maracajá e gatomourisco, e degeneração balonosa do urotélio da bexiga do puma. Ambas as alterações revelaram imunorreatividade positiva para antígenos de CDV. Em conclusão, antígenos intralésionais de CDV foram identificados em tecidos de felídeos neotropicais, confirmando infecção ativa nesses animais. Esses achados adicionam às poucas descrições de infecções induzidas por CDV em hospedeiros mamíferos que não o cão doméstico do Brasil.

**Palavras-chave:** CDV; *Puma concolor*; *Leopardus wideii*; *Herpailurus yagouaroundi*; imuno-histoquímica; doenças infecciosas emergentes; patologia comparada.

VIANA, Nayara Emily. **Immunohistochemical characterization of canine Morbillivirus antigens in neotropical felids from Southern Brazil**. 2020. 36 f. Dissertation (Master's in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Canine morbillivirus (CDV) is considered an emerging pathogen in wild animals and has demonstrated a high capacity to infect different animal species. However, reports in the Brazilian literature describing the infection of neotropical felids are scarce. Consequently, the aim of the study was to identify CDV viral particles in tissues of neotropical felids from southern Brazil using an immunohistochemical protocol (IHC) to identify the intralesional presence of CDV antigens, and then be able to make the association with histopathological findings. Tissues from three species of Neotropical felids were used: cougar (*Puma concolor*, n = 1), margay (*Leopardus wideii*, n = 1) and jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*). All felids were kept in the Bela Vista Biological Sanctuary. Lung and urinary bladder fragments from all animals were collected and processed for routine histopathological evaluation in order to identify possible patterns of CDV-associated injuries, as occurred in domestic dogs. Based on the disease pattern, identified by histopathology, IHC assays were performed to identify CDV antigens. Histopathological analysis revealed interstitial pneumonia in the margay and jaguarundi lungs and ballooning degeneration of the cougar's urinary bladder urothelium. Both findings revealed positive immunoreactivity for CDV antigens. In conclusion, intralesional antigens of CDV were identified in tissues of neotropical felids, confirming active infection in these animals. These findings add to the few descriptions of CDV-induced infections in mammalian hosts other than Brazil's domestic dog.

**Keywords:** CDV; *Puma concolor*; *Leopardus wideii*; *Herpailurus yagouaroundi*; immunohistochemistry; emerging infectious disease; compared pathology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> -	Estrutura do morbilivirus canino .....	14
<b>Figura 2</b> -	Lesoes histopatologicas em felideos neotropicais.....	28
<b>Figura 3</b> -	Imuno-histoquimica positiva para CDV em felideos neotropicais .....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDV	Morbillivirus canino (vírus da cinomose)
IF	Imunofluorescência
IHQ	Imuno-histoquímica
MV	Vírus do sarampo
RPV	Vírus da peste bovina
PPRV	Vírus da peste dos pequenos ruminantes
PDV	Phocine distemper vírus
CeMV	Morbillivirus de cetáceos
FeMV	Morbillivirus felino
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>13</b>
2.1	ETIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS VIRAIS DO <i>MORBILLIVIRUS</i> .....	13
2.1.1	CDV .....	13
2.2	ESPÉCIES SUSCEPTÍVEIS .....	14
2.2.1	Felídeos .....	16
2.2.2	Relação Filogenética e Transmissão, Patogenia e Sinais Clínicos .....	17
2.2.3	Métodos diagnósticos .....	17
<b>3</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>HIPOTESE</b> .....	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
6.1.	OBJETIVO GERAL .....	26
6.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>7</b>	<b>ARTIGO PUBLICADO</b> .....	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>33</b>
<b>10</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>34</b>

## 1 1 INTRODUÇÃO

2

3 O morbillivirus canino (vírus da cinomose, CDV), é membro do gênero  
4 *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae* (Greene e Vandeveld, 2012), tem distribuição  
5 mundial, e é um dos mais importantes agentes infecciosos em populações caninas,  
6 sendo a maioria dos carnívoros terrestres considerados suscetível a infecções  
7 naturais (Appel, 1969; Greene e Vandeveld, 2012). Deste modo, o agente tem sido  
8 considerado um vírus emergente principalmente em espécies selvagens e silvestres  
9 (Megid *et al.*, 2013; Michelazzo *et al.*, 2019). Ademais, estudos brasileiros  
10 confirmaram a infecção de mamíferos não domésticos como o cachorro do mato,  
11 *Cerdocyon thous* (Megid *et al.*, 2009), furão, *Galictis cuja* (Megid *et al.*, 2013), a  
12 raposa-branca, *Lycalopex vetulus* (Megid *et al.*, 2010) e o tamanduá do sul, *Tamandua*  
13 *tetradactyla* (Lunardi *et al.*, 2018).

14 O CDV é o agente etiológico da cinomose, uma doença altamente contagiosa  
15 capaz de induzir infecção sistêmica com manifestações respiratórias, digestórias,  
16 cutâneas, ósseas e neurológicas (Greene e Vandeveld, 2012). A presença de  
17 partículas virais de CDV são descritas em diversos órgãos (Appel, 1969; 1970).

18 Em muitos países desenvolvidos a cinomose apresenta impactos econômicos  
19 pouco significativos devido à vacinação eficiente (Headley e Graça, 2000).  
20 Alternativamente, em países subdesenvolvidos como o Brasil, a cinomose continua  
21 sendo endêmica e é a principal causa de mortalidade em cães de cidades urbanas  
22 (Headley e Graça, 2000).

23 Esse estudo investigou a possível ocorrência de antígenos intralésionais de  
24 CDV em tecidos de felinos neotropicais do Sul do Brasil, através da associação de  
25 padrões histopatológicos e diagnóstico imuno-histoquímico (IHQ).

26

27

28

29

30

31

32

33

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ETIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS VIRAIS DO *MORBILLIVIRUS*

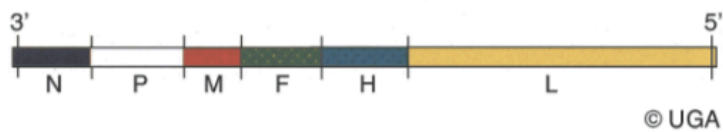
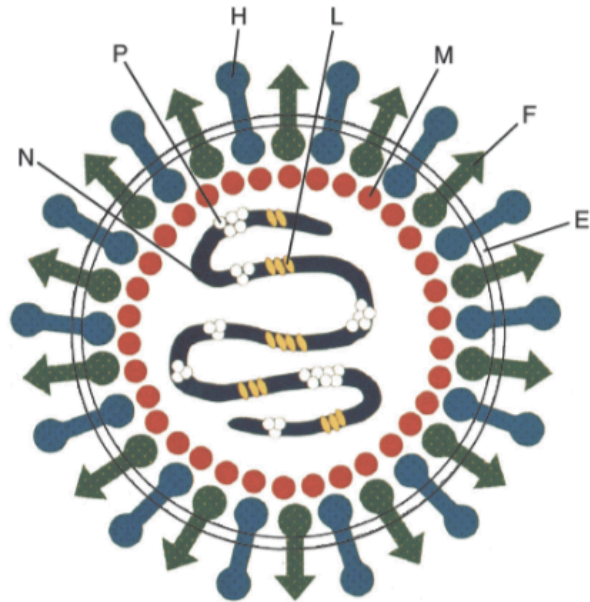
O gênero *Morbillivirus*, família *Paramyxoviridae*, ordem *Mononegavirales* (Greene e Vandeveld, 2012) inclui vírus de importância para saúde humana e animal, entre eles, o vírus do sarampo (MV), que infecta humanos e primata não humanos (Takeda *et al.*, 2020); o morbillivirus canino (CDV), que ocorre em cães domésticos e vários mamíferos; o vírus da peste bovina (RPV), que infecta bovinos domésticos e grandes biungulados selvagens; o vírus da peste dos pequenos ruminantes (PPRV) acometendo ruminantes; phocine distemper vírus (PDV) afetando pinípedes; morbillivírus de cetáceos (CeMV) em mamíferos aquáticos e morbillivirus felino (FeMV) em gatos domésticos (Woo *et al.*, 2012; Martínez-Gutierrez e Ruiz-Saenz, 2016; Uhl *et al.*, 2019).

#### 2.1.1 CDV

O CDV é o agente etiológico da cinomose, uma doença altamente contagiosa que induz infecção sistêmica com manifestações respiratórias, digestivas, cutâneas, musculoesqueléticas e neurológicas (Beineke *et al.*, 2009; Greene e Vandeveld, 2012; Caswell e Williams, 2016). As partículas virais do CDV são pleomórficas, com diâmetro aproximado de 150 nm, possuindo um único filamento de RNA negativo envolto em um nucleocapsídeo de simetria helicoidal, e circundado por envelope de lipoproteína derivada da membrana celular (Greene e Vandeveld, 2012). O RNA genômico codifica seis proteínas estruturais: hemaglutinina (H), proteína de fusão (F), proteína da matriz (M), fosfoproteína (P), grande proteína polimerase (L) e nucleocapsídeo (N) (Pardo *et al.*, 2005; Rendon-Marin *et al.*, 2019).

Em relação à patogênese molecular, a proteína H é necessária para a ligação viral aos receptores nas células hospedeiras e indução de alterações conformacionais na proteína F, resultando na fusão da membrana viral e das células hospedeiras – permitindo a entrada do agente na célula alvo (Rendon-Marin *et al.*, 2019). Assim, a ligação viral a um receptor celular desempenha um papel fundamental na determinação do tropismo e da especificidade do hospedeiro (Von Messling *et al.*, 2001; Rendon-Marin *et al.*, 2019).

1 FIGURA 1 – Estrutura do morbillivirus canino. (E, envelope de lipoproteína; F, proteína de fusão; H,  
 2 hemaglutinina [neuraminidase]; L, proteína grande; M, proteína da matriz; N, nucleocapsídeo; P, polimerase  
 3 proteica.)



19 Fonte: Greene e Vandeveld (2012, p. 73)

20  
21 **2.2 ESPÉCIES SUSCEPTÍVEIS**

22  
23 Embora o CDV tenha sido inicialmente descrito como uma doença infecciosa  
 24 de cães domésticos, já foi relatado em animais da ordem Carnívora, Cetacea,  
 25 Artiodactyla e Prosbocidea (Martínez-Gutierrez e Ruiz-Saenz, 2016) (Tabela 1).

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

## 1 Tabela 1 – Espécies selvagens infectadas por CDV

Família	Espécie infectada	Método de diagnóstico	Região Geográfica	Referência
<i>Procyonidae</i>	Guaxinin ( <i>Procyon lotor</i> )	Sorologia e histopatologia	EUA, América do Norte	(Hoff <i>et al.</i> , 1974)
	Quati ( <i>Nasua nasua</i> )	Sorologia Histopatologia e IHQ	Brasil, América do Sul	(Roscoe, 1993) (Michelazzo <i>et al.</i> 2020)
<i>Canidae</i>	Cães selvagens africanos ( <i>Lycaon pictus</i> )	Sorologia Histopatologia e IHQ	Quênia, África Alemanha, Europa	(Alexander e Appel, 1994) (Durchfeld <i>et al.</i> , 1990)
	Cães guaxinins ( <i>Nyctereutes procyonoides</i> )	Isolamento viral e sequenciamento Histopatologia e IHQ	Tanzânia, África Japão, Ásia	(Van De Bildt <i>et al.</i> , 2002) (Machida <i>et al.</i> , 1993)
	Cachorro vinagre ( <i>Speothos venaticus</i> )	Histopatologia e Microscopia eletrônica	Pretoria, África	(McInnes <i>et al.</i> , 1992)
	Lobo-guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> )	Histopatologia Sorologia Sorologia	Brasil, América do Sul Bolívia, América do Sul	(Rego <i>et al.</i> , 1997) (Furtado <i>et al.</i> , 2016) (Deem e Emmons, 2005)
	Cachorro do mato ( <i>Cerdocyon thous</i> )	Isolamento viral e sequenciamento Sorologia	Brasil, América do Sul	(Megid <i>et al.</i> , 2009) (Furtado <i>et al.</i> , 2016)
	Raposa do campo ( <i>Lycalopex vetulus</i> )	Isolamento viral e sequenciamento		(Megid <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Felidae</i>	Leopardos negros ( <i>Panthera pardus melas</i> ) Onça-pintada ( <i>Panthera onca</i> )	IHQ e isolamento viral	EUA, América do Norte
Tigre ( <i>Panthera tigris</i> ) Leão africano ( <i>Panthera leo krugeri</i> ) Tigre siberiano ( <i>Panthera tigris altaica</i> ) Tigre de bengala ( <i>Panthera tigris tigris</i> ) Leopardo ( <i>Panthera pardus</i> ) Leopardo chinês ( <i>Panthera pardus japonensis</i> ) Leão africano ( <i>Panthera leo krugeri</i> )		Histopatologia e IHQ	Quênia, África Suíça, Europa	(Roelke-Parker <i>et al.</i> , 1996) (Myers <i>et al.</i> , 1997)
Trigre ( <i>Panthera tigris</i> )		Histopatologia e IHQ Isolamento viral e sequenciamento	Japão, Ásia	(Nagao <i>et al.</i> , 2011)
Tigre siberiano ( <i>Panthera tigris altaica</i> )		IHQ e sequenciamento	Rússia, Eurásia	(Seimon <i>et al.</i> , 2013)
Leopardo de amur ( <i>Panthera pardus orientalis</i> ) Onça-pintada ( <i>Panthera onca</i> ) Onça-parda ( <i>Puma concolor</i> )		Isolamento viral e sequenciamento Sorologia Histopatologia e IHQ		(Sulikhan <i>et al.</i> , 2018)
Gato-maracajá ( <i>Leopardus wiedii</i> ) Jaguarundi ( <i>Puma yagouaroundi</i> )		Histopatologia e IHQ Histopatologia e IHQ		(Nava <i>et al.</i> , 2008); (Furtado <i>et al.</i> , 2013) (Furtado <i>et al.</i> , 2013) (Nava <i>et al.</i> , 2008); (Viana <i>et al.</i> , 2020) (Viana <i>et al.</i> , 2020)
Hienas pintadas ( <i>Crocuta crocuta</i> ) Furão de pata negra ( <i>Mustela nigripes</i> )		IHQ e isolamento viral Histopatologia e isolamento viral	Quênia, África EUA, América do Norte	(Haas <i>et al.</i> , 1996) (Williams <i>et al.</i> , 1988; Williams <i>et al.</i> , 1996)
Furão grande ( <i>Galictis vittata</i> ) Furão pequeno ( <i>Galictis cuja</i> )		Histopatologia Isolamento viral e sequenciamento	Brasil, América do Sul	(Rego <i>et al.</i> , 1997) (Megid <i>et al.</i> , 2013)

### 1 2.2.1 Felídeos

2

3 Existem diversos relatos da infecção pelo CDV em felídeos de vários países,  
4 incluindo a Costa Rica (Avendano *et al.*, 2016), Estados Unidos (Appel *et al.*, 1994)  
5 Botsuana (Chaber *et al.*, 2017), Rússia (Gilbert *et al.*, 2014), Argentina (Uhart *et al.*,  
6 2012), Tanzânia (Roelke-Parker *et al.*, 1996) e China (Seimon *et al.*, 2013); logo, o  
7 agente tem sido considerado um vírus emergente para algumas espécies selvagens  
8 e domésticas (Megid *et al.*, 2009).

9 Duas epidemias de CDV em felídeos selvagens são mundialmente conhecidas,  
10 uma na Califórnia, com índice de mortalidade de 23%, que isolou o CDV e mostrou  
11 que eram idênticos ao CDV isolado anteriormente de cães e guaxinins (Appel *et al.*,  
12 1994) e a outra no Serengeti, com mortalidade de 30%, que também atribuiu a  
13 infecção aos cães errantes das aldeias adjacentes ao parque nacional (Roelke-Parker  
14 *et al.*, 1996). Adicionalmente, um estudo retrospectivo demonstrou que o CDV infecta  
15 felinos de grande porte, como leões e tigres há muito mais tempo do que se tinha  
16 conhecimento, provavelmente desde 1972 (Myers *et al.*, 1997). Este estudo investigou  
17 todos os tecidos de grandes felinos formalizados e armazenados na rotina do  
18 Laboratório de Patologia da Universidade de Zurique de 1972 a 1992, totalizando 42  
19 felinos, dos quais 19 foram positivos para CDV por IHQ utilizando anticorpo policlonal  
20 (Myers *et al.*, 1997).

21 No Brasil, um estudo realizado com amostras de felinos neotropicais  
22 provenientes de quatro biomas, demonstrou que esses animais tinham contato com  
23 agentes virais infecciosos, como o *herpesvírus-1 felino*, *calicivírus felino* e *parvovírus*  
24 *felino* (Filoni *et al.*, 2006). Evidências adicionais confirmaram a infecção por CDV em  
25 canídeos não domésticos – como o cachorro do mato, *Cerdocyon thous* (Megid *et al.*,  
26 2009), furão, *Galictis cuja* (Megid *et al.*, 2013) e a raposa-branca, *Lycalopex vetulus*  
27 (Megid *et al.*, 2010). Além disso, em 2018, Lunardi e colaboradores, fizeram a primeira  
28 descrição da infecção por CDV no tamanduá do sul, *Tamandua tetradactyla*, do  
29 Centro-Oeste do Brasil, baseado nos achados histopatológicos, moleculares e  
30 análises IHQ (Lunardi *et al.*, 2018).

31

32

33

34

## 2.2.2 Relação Filogenética e Transmissão, Patogenia e Sinais clínicos

Os cães domésticos (*Canis familiares*) são considerados os principais reservatórios e vetores do CDV (Cleaveland *et al.*, 2000). Tanto em áreas urbanas (Headley *et al.*, 2012) quanto nas áreas rurais, existe alta densidade de cães errantes não vacinados e não castrados que contribuem para a manutenção da circulação do vírus e frequentemente interagem com a fauna silvestre devido ao comportamento de caça (Butler *et al.*, 2004).

A principal via de transmissão do CDV é através de aerossóis de exsudatos respiratórios contendo partículas virais, não obstante outras formas de transmissão são tão significativas quanto, uma vez que o risco de propagação entre animais domésticos e selvagens é diretamente proporcional à interação e proximidade dos mesmos (Whiteman *et al.*, 2007). Após a infecção, nas primeiras 24 horas, o vírus se replica em macrófagos, linfócitos T e B, que distribuem o vírus para os tecidos linfoides (Vandevelde e Zurbruggen, 1995; Carvalho *et al.*, 2012) onde continuam a replicação, induzindo imunossupressão severa pela destruição das células linfoides (Beineke *et al.*, 2009). Os animais com cinomose podem apresentar sintomas sistêmicos variados, que incluem anorexia, apatia, conjuntivite, hiperqueratose dos coxins e plano nasal, bronquite catarral, vômito, diarreia e pústulas (Beineke *et al.*, 2009; Greene e Vandevelde, 2012).

Os sinais clínicos da infecção por CDV em espécies silvestres/selvagens são muito semelhantes às descritas nos cães domésticos, variando de acordo com a virulência da estirpe, idade e estado imunológico do hospedeiro (Beineke *et al.*, 2015). Em felídeos, as principais manifestações associadas à infecção por CDV foram neurológicas, respiratórias e gastrointestinais entre essas, convulsão, mioclonia facial e de membros, desorientação, ataxia e paresia, dispneia, tosse e secreção nasal (Myers *et al.*, 1997). Entretanto, estudos retrospectivos sugerem que a infecção por CDV em felídeos selvagens não é necessariamente fatal, uma vez que investigações sorológicas retrospectivas demonstraram que alguns dos grandes surtos foram “silenciosos”, uma vez que os animais era assintomáticos ou apresentavam sinais clínicos inespecíficos (Beineke *et al.*, 2015).

## 2.2.3 Métodos diagnósticos

1           Dados mundiais, demonstram diversos métodos diagnósticos para a  
2 confirmação da infecção por CDV em felídeos selvagens. Em 1994, Appel e  
3 colaboradores investigaram a possível infecção por CDV em felídeos, em uma  
4 epizootia, San Fernando, Califórnia. No estudo, foi realizada a associação de  
5 diferentes técnicas de diagnóstico – exames hematológicos e bioquímicos, autópsias,  
6 histologia, IHQ, isolamento viral e sorologia. Outros estudos empregaram técnicas  
7 diagnósticas isoladas ou associadas, como por exemplo sequenciamento viral (Nagao  
8 *et al.*, 2012), sorologia (Furtado *et al.*, 2017), histologia e IHQ. As principais lesões  
9 microscópicas observadas em tecidos de felídeos selvagens foram a pneumonia  
10 intersticial acentuada difusa com hiperplasia de pneumócitos tipo II, meningoencefalite  
11 linfocítica (Nagao *et al.*, 2012; Seimon *et al.*, 2013) e depleção linfóide acentuada dos  
12 linfonodos (Munson *et al.*, 2008).

13           Estudos feitos no Brasil sobre a ocorrência de doenças infecciosas em animais  
14 selvagens utilizaram a associação de testes diagnósticos e/ou de identificação, como  
15 achados histopatológicos e testes moleculares (Megid *et al.*, 2009; Megid *et al.*, 2013),  
16 sorologia (Filoni *et al.*, 2006), e testes moleculares associados à IHQ (Lunardi *et al.*,  
17 2018), visto que o diagnóstico histopatológico apenas define o padrão de lesão  
18 compatível à doença (Headley *et al.*, 2018) e testes moleculares confirmam a  
19 presença do antígeno, mas não de uma infecção ativa propriamente dita.  
20 Alternativamente, a identificação IHQ de antígenos intralésionais comprovam a  
21 associação do padrão da doença e o agente associado, assim reafirmando o processo  
22 ativo da doença (Headley *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2019).

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

### 1 **3 Perspectivas**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Relatos demonstram a ocorrência frequente de infecção por CDV em diferentes espécies selvagens, onde o cão doméstico está frequentemente envolvido na disseminação e manutenção do CDV. Dessa forma, estudos adicionais somam-se às poucas descrições de infecções induzidas por CDV em hospedeiros mamíferos que não o cão doméstico do Brasil. Isso agregaria conhecimentos sobre o impacto que a pressão antrópica vem causando sobre as áreas de reserva natural do país ao longo dos anos, sobre os prejuízos que a fauna selvagem sofre com as doenças infecciosas caninas e os possíveis riscos à saúde pública.

#### 4 REFERÊNCIAS

- APPEL, M. J. Pathogenesis of canine distemper. **American Journal of Veterinary Research**, v. 30, n. 7, p. 1167-82, Jul 1969. ISSN 0002-9645 (Print) 0002-9645.
- \_\_\_\_\_. Distemper pathogenesis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 156, n. 12, p. 1681-4, Jun 15 1970. ISSN 0003-1488 (Print) 0003-1488.
- APPEL, M. J.; YATES, R. A.; FOLEY, G. L.; BERNSTEIN, J. J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L. H.; MILLER, L. D.; ARP, L. H.; ANDERSON, M.; BARR, M.; ET AL. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 277-88, Jul 1994. ISSN 1040-6387 (Print) 1040-6387 (Linking).
- 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. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 52, n. 2, p. 373-7, Apr 28 2016. ISSN 0090-3558.
- BEINEKE, A.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P. Cross-species transmission of canine distemper virus—an update. **One Health**, v. 1, p. 49-59, 2015/12/01/ 2015. ISSN 2352-7714. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352771415000087> >.
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 1-2, p. 1-18, Jan 15 2009. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427 (Linking).
- BUTLER, J. R. A.; DU TOIT, J.; BINGHAM, J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators and prey in rural Zimbabwe: Threats of competition and disease to large wild carnivores. **Biological Conservation**, v. 115, p. 369-378, 02/01 2004.
- CARVALHO, O. V.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, C. G. T.; SCHERER, P. O.; SOARES-MARTINS, J. A. P.; ALMEIDA, M. R.; SILVA JÚNIOR, A. Immunopathogenic and Neurological Mechanisms of Canine Distemper Virus. **Advances in Virology**, v. 2012, p. 163860, 2012/11/04 2012. ISSN 1687-8639. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2012/163860> >.
- CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. In: GRANT, B. M. (Ed.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals**. 6th. St. Louis, Missouri: Elsevier, v.2, 2016. cap. 5, p.465-590.
- CHABER, A. L.; COZZI, G.; BROEKHUIS, F.; HARTLEY, R.; J, W. M. Serosurvey for selected viral pathogens among sympatric species of the african large predator guild

1 in Northern Botswana. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 53, n. 1, p. 170-175, Jan 2017.  
2 ISSN 0090-3558.

3  
4 CLEAVELAND, S.; APPEL, M. G.; CHALMERS, W. S.; CHILLINGWORTH, C.;  
5 KAARE, M.; DYE, C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a  
6 source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary**  
7 **Microbiology**, v. 72, n. 3-4, p. 217-227, 2000/03// 2000. ISSN 0378-1135. Disponível  
8 em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/10727832>  
9 [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00207-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00207-2) >.

10  
11 FILONI, C.; CATAO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S.; LUTZ, H.;  
12 HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus,  
13 and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**,  
14 v. 42, n. 2, p. 470-7, Apr 2006. ISSN 0090-3558 (Print)  
15 0090-3558.

16  
17 FURTADO, M. M.; TANIWAKI, S. A.; DE BARROS, I. N.; BRANDAO, P. E.; CATAO-  
18 DIAS, J. L.; CAVALCANTI, S.; CULLEN, L.; FILONI, C.; JACOMO, A. T. A.; JORGE,  
19 R. S. P.; SILVA, N. D. S.; SILVEIRA, L.; FERREIRA NETO, J. S. Molecular detection  
20 of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. **Journal of**  
21 **Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 29, n. 5, p. 660-668, Sep 2017. ISSN 1040-  
22 6387.

23  
24 GILBERT, M.; MIQUELLE, D. G.; GOODRICH, J. M.; REEVE, R.; CLEAVELAND, S.;  
25 MATTHEWS, L.; JOLY, D. O. Estimating the potential impact of canine distemper virus  
26 on the Amur tiger population (*Panthera tigris altaica*) in Russia. **PLoS One**, v. 9, n. 10,  
27 p. e110811, 2014. ISSN 1932-6203.

28  
29 GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. Canine distemper. In: (Ed.). **Infectious diseases**  
30 **of the dog and cat**. 4. St. Louis: Elsevier: Elsevier, 2012. p.25-42.

31  
32 HEADLEY, S. A.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.;  
33 ALFIERI, A. A. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of  
34 canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. **Semina: Ciências**  
35 **Agrárias**, v. 33, n. 5, p. p. 1945-1478, set./out. 2012.

36  
37 HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Canine distemper: epidemiological findings of 250  
38 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 00-  
39 00, 2000. ISSN 1413-9596. Disponível em: <  
40 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-  
41 95962000000200009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000200009&nrm=iso) >.

42  
43 HEADLEY, S. A.; OLIVEIRA, T. E. S.; PEREIRA, A. H. T.; MOREIRA, J. R.;  
44 MICHELAZZO, M. M. Z.; PIRES, B. G.; MARUTANI, V. H. B.; XAVIER, A. A. C.; DI  
45 SANTIS, G. W.; GARCIA, J. L.; ALFIERI, A. A. Canine morbillivirus (canine distemper  
46 virus) with concomitant canine adenovirus, canine parvovirus-2, and *Neospora*  
47 *caninum* in puppies: a retrospective immunohistochemical study. **Scientific Reports**,  
48 v. 8, n. 1, p. 13477-13477, 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: <  
49 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30194440>  
50 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC6128882/> >.

- 1  
2 LUNARDI, M.; DAROLD, G. M.; AMUDE, A. M.; HEADLEY, S. A.; SONNE, L.;  
3 YAMAUCHI, K. C. I.; BOABAID, F. M.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Canine  
4 distemper virus active infection in order Pilosa, family Myrmecophagidae, species  
5 *Tamandua tetradactyla*. **Veterinary Microbiology**, v. 220, p. 7-11, Jul 2018. ISSN  
6 0378-1135.  
7  
8 MARTÍNEZ-GUTIERREZ, M.; RUIZ-SAENZ, J. Diversity of susceptible hosts in canine  
9 distemper virus infection: A systematic review and data synthesis. **BMC Veterinary**  
10 **Research**, v. 12, 12/01 2016.  
11  
12 MEGID, J.; SOUZA, V. A. F.; TEIXEIRA, C. R.; CORTEZ, A.; AMORIN, R. L.;  
13 HEINEMMAN, M. B.; CAGNINI, D. Q.; RICHTZENHAIN, L. J. Canine distemper virus  
14 in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic  
15 analyses. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, p. 527-530, 2009.  
16  
17 MEGID, J.; TEIXEIRA, C. R.; AMORIN, R. L.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; DE  
18 PAULA ANTUNES, J. M.; DA COSTA, L. F.; FORNAZARI, F.; CIPRIANO, J. R.;  
19 CREMASCO, A.; RICHTZENHAIN, L. J. First identification of canine distemper virus  
20 in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): pathologic aspects and virus phylogeny. **Journal of**  
21 **Wildlife Diseases**, v. 46, n. 1, p. 303-305, Jan 2010. ISSN 1943-3700 (Electronic)  
22 0090-3558 (Linking).  
23  
24 MEGID, J.; TEIXEIRA, C. R.; CORTEZ, A.; HEINEMMAN, M. B.; ANTUNES, J. M.;  
25 FOTNAZARI, F.; RASSY, F. B.; RICHTZENHAIN, L. J. Canine distemper virus  
26 infection in a lesser grison (*Galictis cuja*): first report and virus phylogeny. **Pesquisa**  
27 **Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 247-250, 2013.  
28  
29 MICHELAZZO, M. D. M. Z.; DE OLIVEIRA, T. E. S.; VIANA, N. E.; DE MORAES, W.;  
30 CUBAS, Z. S.; HEADLEY, S. A. Immunohistochemical evidence of canine morbillivirus  
31 (canine distemper) infection in coatis (*Nasua nasua*) from Southern Brazil. v. n/a, n.  
32 n/a, 2019. ISSN 1865-1674. Disponível em: <  
33 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.13456> >.  
34  
35 MUNSON, L.; TERIO, K. A.; KOCK, R.; MLENGEYA, T.; ROELKE, M. E.; DUBOVI,  
36 E.; SUMMERS, B.; SINCLAIR, A. R. E.; PACKER, C. Climate extremes promote fatal  
37 co-infections during canine distemper epidemics in African lions. **PLoS One**, v. 3, n. 6,  
38 p. e2545-e2545, 2008. ISSN 1932-6203. Disponível em: <  
39 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18575601>  
40 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2435602/> >.  
41  
42 MYERS, D. L.; ZURBRIGGEN, A.; LUTZ, H.; POSPISCHIL, A. Distemper: not a new  
43 disease in lions and tigers. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 4, n. 2, p. 180-4, Mar 1997.  
44 ISSN 1071-412X (Print)  
45 1071-412x.  
46  
47 NAGAO, Y.; NISHIO, Y.; SHIOMODA, H.; TAMARU, S.; SHIMOJIMA, M.; GOTO, M.;  
48 UNE, Y.; SATO, A.; IKEBE, Y.; MAEDA, K. An outbreak of canine distemper virus in  
49 tigers (*Panthera tigris*): possible transmission from wild animals to zoo animals.

- 1 **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 6, p. 699-705, Jun 2012. ISSN 0916-  
2 7250.
- 3
- 4 NAVA, A. F. D.; CULLEN JR, L.; SANA, D. A.; NARDI, M. S.; RAMOS FILHO, J. D.;  
5 LIMA, T. F.; ABREU, K. C.; FERREIRA, F. First Evidence of Canine Distemper in  
6 Brazilian Free-Ranging Felids. **EcoHealth**, v. 5, n. 4, p. 513-518, 2008/12/01 2008.  
7 ISSN 1612-9210. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0207-8> >.
- 8
- 9 OLIVEIRA, T. E. S. D.; PELAQUIM, I. F.; FLORES, E. F.; MASSI, R. P.; VALDIVIEZO,  
10 M. J. J.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; ALFIERI, A. A.; SAUT, J. P. E.; HEADLEY, S.  
11 A. *Mycoplasma bovis* and viral agents associated with the development of bovine  
12 respiratory disease in adult dairy cows. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.  
13 doi: 10.1111/tbed.13223, 2019.
- 14
- 15 PARDO, I. D.; JOHNSON, G. C.; KLEIBOEKER, S. B. Phylogenetic characterization  
16 of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. **J**  
17 **Clin Microbiol**, v. 43, n. 10, p. 5009-17, Oct 2005. ISSN 0095-1137 (Print)  
18 0095-1137.
- 19
- 20 RENDON-MARIN, S.; DA FONTOURA BUDASZEWSKI, R.; CANAL, C. W.; RUIZ-  
21 SAENZ, J. Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. **Virology**  
22 **Journal**, v. 16, n. 1, p. 30-30, 2019. ISSN 1743-422X. Disponível em: <  
23 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30845967> >.
- 24
- 25 ROELKE-PARKER, M. E.; MUNSON, L.; PACKER, C.; KOCK, R.; CLEVELAND, S.;  
26 CARPENTER, M.; O'BRIEN, S. J.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN-LEHMANN, R.;  
27 LUTZ, H.; MWAMENGELE, G. L. M.; MGASA, M. N.; MACHANGE, G. A.; SUMMERS,  
28 B. A.; APPEL, M. J. G. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera*  
29 *leo*). **Nature**, v. 379, n. 6564, p. 441-445, 1996/02/01 1996. ISSN 1476-4687.  
30 Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/379441a0> >.
- 31
- 32 SEIMON, T. A.; MIQUELLE, D. G.; CHANG, T. Y.; NEWTON, A. L.; KOROTKOVA, I.;  
33 IVANCHUK, G.; LYUBCHENKO, E.; TUPIKOV, A.; SLABE, E.; MCALOOSE, D.  
34 Canine distemper virus: an emerging disease in wild endangered Amur tigers  
35 (*Panthera tigris altaica*). **MBio**, v. 4, n. 4, 2013.
- 36
- 37 TAKEDA, M.; SEKI, F.; YAMAMOTO, Y.; NAO, N.; TOKIWA, H. Animal morbilliviruses  
38 and their cross-species transmission potential. **Current Opinion in Virology**, v. 41, p.  
39 38-45, 2020/04/01/ 2020. ISSN 1879-6257. Disponível em: <  
40 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625720300146> >.
- 41
- 42 UHART, M. M.; RAGO, M. V.; MARULL, C. A.; FERREYRA HDEL, V.; PEREIRA, J.  
43 A. Exposure to selected Pathogens in to selected pathogens in Geoffroy's cats and  
44 domestic carnivores from central Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 4,  
45 p. 899-909, Oct 2012. ISSN 1943-3700 (Electronic)  
46 0090-3558 (Linking).
- 47
- 48 UHL, E. W.; KELDERHOUSE, C.; BUIKSTRA, J.; BLICK, J. P.; BOLON, B.; HOGAN,  
49 R. J. New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. **International**  
50 **Journal of Paleopathology**, v. 24, p. 266-278, 2019/03/01/ 2019. ISSN 1879-9817.

- 1 Disponível em: <  
2 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879981718300378> >.  
3
- 4 VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. The neurobiology of canine distemper virus  
5 infection. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 271-80, May 1995. ISSN 0378-  
6 1135 (Print)  
7 0378-1135.  
8
- 9 VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The  
10 Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity.  
11 **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, 2001. Disponível em: <  
12 <https://jvi.asm.org/content/jvi/75/14/6418.full.pdf> >.  
13
- 14 WHITEMAN, C. W.; MATUSHIMA, E. R.; CAVALCANTI CONFALONIERI, U. E.;  
15 PALHA, M. D. D. C.; DA SILVA, A. D. S. L.; MONTEIRO, V. C. Human and domestic  
16 animal populations as a potential threat to wild carnivore conservation in a fragmented  
17 landscape from the Eastern Brazilian Amazon. **Biological Conservation**, v. 138, n. 1,  
18 p. 290-296, 2007/08/01/ 2007. ISSN 0006-3207. Disponível em: <  
19 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000632070700167X> >.  
20
- 21 WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; WONG, B. H. L.; FAN, R. Y. Y.; WONG, A. Y. P.;  
22 ZHANG, A. J. X.; WU, Y.; CHOI, G. K. Y.; LI, K. S. M.; HUI, J.; WANG, M.; ZHENG,  
23 B.-J.; CHAN, K. H.; YUEN, K.-Y. Feline morbillivirus, a previously undescribed  
24 paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats.  
25 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**  
26 **America**, v. 109, n. 14, p. 5435-5440, 2012/04// 2012. ISSN 0027-8424. Disponível  
27 em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/22431644>  
28 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22431644/?tool=EBI>  
29 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmid/22431644/pdf/?tool=EBI>  
30 <https://doi.org/10.1073/pnas.1119972109>  
31 <https://europepmc.org/articles/PMC3325679>  
32 <https://europepmc.org/articles/PMC3325679?pdf=render> >.  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45

1 **5 HIPÓTESE**

2

3 Felídeos neotropicais infectados pelo morbilivírus canino apresentam lesões  
4 microscópicas semelhantes às observadas em cães domésticos.

5

## 1 **6 OBJETIVOS**

2

### 3 **6.1 OBJETIVO GERAL**

4

5 Avaliar a ocorrência de antígenos intralesionais de CDV em tecidos de felídeos  
6 neotropicais do Sul do Brasil

7

### 8 **6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

9

- 10 • Verificar se os achados histopatológicos são semelhantes aos padrões
- 11 descritos nos cães domésticos;
- 12 • Associar os padrões histopatológicos com a imunopositividade intralesionais
- 13 para o CDV, através da técnica de IHQ.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42





DOI: 10.1111/tbed.13422

SUPPLEMENT ARTICLE

Transboundary and Emerging Diseases

WILEY

## Immunohistochemical identification of antigens of canine distemper virus in neotropical felids from Southern Brazil

Nayara Emily Viana<sup>1</sup>  | Mariana de Mello Zanim Michelazzo<sup>1</sup>  |  
Thalita Evani Silva Oliveira<sup>1</sup>  | Zalmir Silvino Cubas<sup>2</sup> | Wanderlei de Moraes<sup>2</sup> |  
Selwyn Arlington Headley<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Laboratory of Animal Pathology,  
Department of Veterinary Preventive  
Medicine, Universidade Estadual de  
Londrina, Londrina, Brazil

<sup>2</sup>Bela Vista Sanctuary, Itaipu Binacional, Foz  
do Iguaçu, Brazil

### Correspondence

Selwyn Arlington Headley, Laboratory of  
Animal Pathology, Department of Veterinary  
Preventive Medicine, Universidade Estadual  
de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR  
445 Km 380, Campus Universitário, PO Box  
10.011, 86057-970, Paraná, Brazil.  
Email: selwyn.headley@uel.br

### Abstract

The pathologic and immunohistochemical findings associated with infections due to canine distemper virus (CDV) are described in the cougar (*Puma concolor*), margay (*Leopardus wiedii*) and jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) from Southern Brazil. Tissue sections of the neotropical felids ( $n = 3$ ) that died at the Bela Vista Sanctuary, Paraná, Southern Brazil were routinely processed for histopathology to identify possible histopathologic patterns associated with infections due to CDV. Selected formalin-fixed paraffin embedded tissue sections of the lungs and urinary bladder were used in immunohistochemical assays designed to identify the antigens of CDV. The main histopathologic patterns identified were interstitial pneumonia in the margay and jaguarundi, while ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder was observed in the cougar. Positive immunoreactivity to antigens of CDV was identified within intralobular sections of the lungs of the two wild felids with interstitial pneumonia and in the degenerated urothelium of the cougar. These findings indicate that these neotropical cats were infected by a viral infectious disease pathogen common to the domestic dog and add to the few documented descriptions of CDV-induced infections in wildlife from Brazil.

### KEYWORDS

canine distemper virus, diagnostic immunohistochemistry, histopathologic patterns, neotropical felids

## 1 | INTRODUCTION

The cougar, *Puma concolor* (Nielsen, Thompson, Kelly, Thompson, Kelly, & Lopez-Gonzalez, 2015), the margay, *Leopardus wiedii* (de Oliveira et al., 2015) and the jaguarundi, *Herpailurus yagouaroundi* (Caso, de Oliveira, & Carvajal, 2015) are neotropical felids that inhabit several countries of the American continent. In Brazil, these felid are known to occur from the Amazon Basin to the southern part of the country (Caso et al., 2015; Nielsen et al., 2015; de Oliveira et al., 2015). Nevertheless, information relative to the occurrence of infectious diseases in these felids that reside in Brazil are scarce.

Canine distemper virus (CDV), a morbillivirus, within the family Paramyxoviridae, is the cause of canine distemper (CD), which frequently results in elevated mortality rates principally in immunologically naive populations of dogs from urban centres of Brazil (Headley, Amude, Alfieri, Bracarense, & Alfieri, 2012). Additionally, CDV has resulted in infections in felids from several countries, including Costa Rica (Avendano et al., 2016), Botswana (Chaber, Cozzi, Broekhuis, Hartley, & W. McNutt, 2017), Russia (Gilbert et al., 2014; Seimon et al., 2013; Sulikhan et al., 2018), Argentina (Uhart, Rago, Marull, Ferreyra Hdel, & Pereira, 2012), Tanzania (Roelke-Parker et al., 1996) and China (Seimon et al., 2013). The occurrence of CDV in

Part of the MSc dissertation of the first author (NEV).

these felids as well as in other mammalian hosts demonstrates the elevated infectivity of this Morbillivirus (Uhl et al., 2019).

Studies relative to the occurrence of viral infections in neotropical felids from Brazil have demonstrated that these felids had contact with viral infectious disease pathogens such as feline herpesvirus-1, feline calicivirus and feline parvovirus (Filoni et al., 2006). Moreover, several reports have confirmed the involvement of CDV-induced infections in wild canids, including the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Megid et al., 2009), the lesser grison, *Galictis cuja* (Megid et al., 2013) and the hoary fox, *Lycalopex vetulus* (Megid et al., 2010) from Brazil. There is also the confirmation of an active infection due to CDV in the southern tamandua, *Tamandua tetradactyla*, from Midwestern Brazil (Lunardi et al., 2018).

Most of the studies done in Brazil to demonstrate the participation of infectious diseases in wildlife have used a combination of diagnostic pathology with molecular testing (Megid et al., 2009, 2013), serology (Filoni et al., 2006), molecular testing (Furtado et al., 2017) and molecular testing associated with diagnostic immunohistochemistry, IHC (Lunardi et al., 2018). Diagnostic pathology defines the specific pattern associated with disease (Headley, Oliveira, Pereira, et al., 2018) but requires an ancillary tool to identify intralesional pathogens. Molecular testing per se confirms the presence of disease pathogens but does not necessarily confirm an active infection (Oliveira et al., 2019). Alternatively, the IHC identification of intralesional antigens confirms the association between disease patterns and the associated agent (Headley, Oliveira, Pereira, et al., 2018; Oliveira et al., 2019), thereby confirming an active disease process. Therefore, the objective of this study was to investigate the possible occurrence of intralesional antigens of CDV within tissues of neotropical felids from Southern Brazil using a combination of pathologic patterns and diagnostic IHC.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Animal data and study location

This study analysed tissue sections of three species of wild felids (cougar,  $n = 4$ ; margay cat,  $n = 3$ ; jaguarundi,  $n = 2$ ) autopsied between 1992 and 1996. These neotropical felids were maintained at the Bela Vista Biological Sanctuary (BVS) located in the city of Foz do Iguaçu, Paraná, Southern Brazil. This biological sanctuary is situated on the banks of the lake Itaipu, Paraná, Brazil; details relative to the BSV can be consulted elsewhere (Headley, Oliveira, Michelazzo, et al., 2018). Data relative to possible clinical manifestations, therapeutic interventions and the cause of death of the neotropical felids were not known.

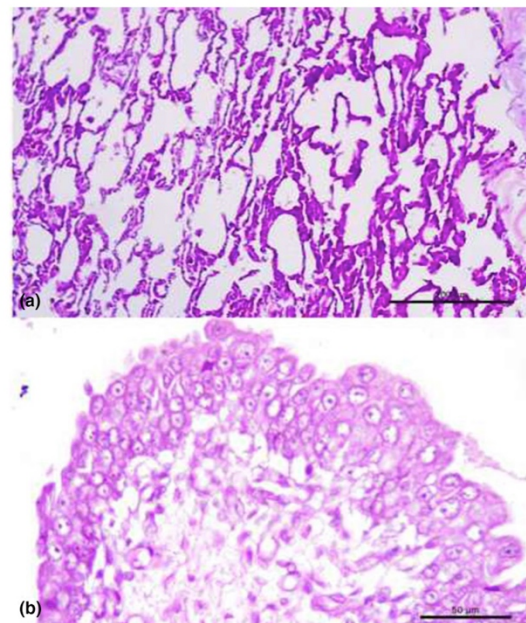
### 2.2 | Histopathology and immunohistochemical assay

Fragments of the lung and urinary bladder of the neotropical felids were collected, fixed by immersion in 10% buffered formalin solution

and processed for routine histopathologic evaluation. Histological sections were analysed to identify possible patterns of lesions associated with CD as occurred in the domestic dog (Appel, 1969; Headley et al., 2012, 2019; Headley & Graça, 2000). Subsequently, based on the disease pattern identified by histopathology, IHC assays as described (Oliveira et al., 2017) were done to identify antigens of CDV from formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue sections of the lungs and urinary bladder by using a commercial antibody (CDV-NP; VMRD). Positive controls consisted of FFPE cerebellar sections from dogs known to contain antigens of CDV (Headley et al., 2013). Two negative controls were used in all IHC assays: the first consisted of substituting the primary antibody with a commercial diluent; the second consisted of FFPE brain sections that were known to be negative for CDV by IHC (Headley, Oliveira, Pereira, et al., 2018; Headley et al., 2019) and were exposed to the primary antibody. Positive and negative controls were included in each IHC assay.

## 3 | RESULTS

Histopathologic evaluation revealed interstitial pneumonia in the lungs of the margay and jaguarundi (Figure 1a), being characterized by marked thickening of the alveolar septa due to hyperplasia of



**FIGURE 1** Histopathologic findings associated with infection by canine distemper virus identified in wild felid. Margay cat; histopathologic characterization of interstitial pneumonia (a). Cougar; urinary bladder demonstrating ballooning degeneration of the transitional epithelium (b). Haematoxylin and eosin stain; Bar, A, 200  $\mu\text{m}$ ; B, 50  $\mu\text{m}$

type II pneumocytes and accumulation of alveolar macrophages. In the urinary bladder of the cougar, there was ballooning degeneration of the urothelium (Figure 1b).

Immunohistochemical assays revealed positive immunoreactivity for antigens of CDV in the bronchial epithelium and mixed glands of the margay and jaguarundi with interstitial pneumonia (Figure 2a), and in the urothelium of the urinary bladder of one cougar with ballooning degeneration (Figure 2b).

#### 4 | DISCUSSION

Canine distemper virus is a pantropic agent that produces typical histopathologic alterations in a wide variety of tissues in several mammalian hosts (Caswell & Williams, 2016; Rendon-Marin, Fontoura Budaszewski, Canal, & Ruiz-Saenz, 2019) and one of the most infectious viruses known to date (Uhl et al., 2019). The histopathologic patterns observed in the lung (interstitial pneumonia) in the margay and jaguarundi evaluated as well as the ballooning degeneration of the transitional epithelium of the urinary bladder of the cougar were previously described in canids (Headley et al., 2013; Headley, Oliveira, Pereira, et al., 2018; Megid et al., 2009), tigers *Panthera tigris* (Nagao et

al., 2012) and in several lions (*Panthera leo*) during the Serengeti epidemics (Roelke-Parker et al., 1996) associated with infections due to CDV. However, similar lesions were not described in the Far Eastern Leopard, *Panthera pardus orientalis* (Sulikhan et al., 2018) and the Amur tiger, *Panthera tigris altaica* (Seimon et al., 2013) infected with CDV.

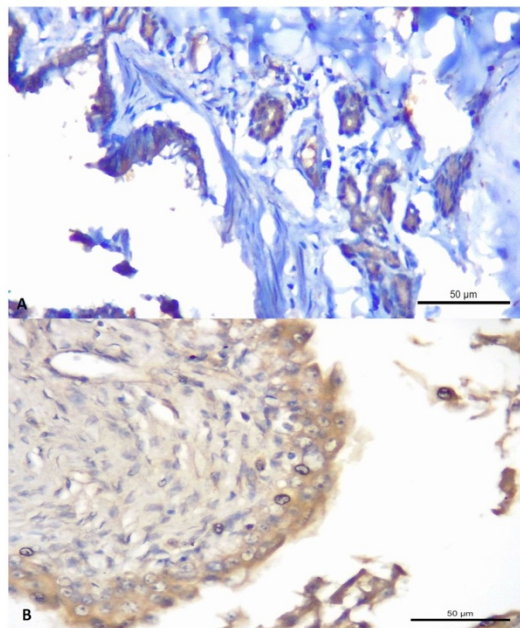
Confirmation of infection due to CDV in the neotropical felids herein described was achieved due to the intralesional detection of antigens within epithelial cells of the lungs with interstitial pneumonia and the degenerated epithelium of the urinary bladder; similar IHC findings were identified in the domestic dog (Headley, Oliveira, Pereira, et al., 2018; Headley, Shirota, Baba, Shirota, Baba, Ikeda, & Sukura, 2009; Headley & Sukura, 2009), the southern tamandua (Lunardi et al., 2018) and in large felids (Appel et al., 1994). The IHC identification utilized in this study has the advantage over other testing methods (e.g., molecular biology and antibody detection) previously used to identify viral particles in felids (Avendano et al., 2016; Nagao et al., 2012; Seimon et al., 2013) infected by CDV, due to the confirmation of an active infection associated with the intralesional detection of antigens in tissues with typical histopathologic patterns observed in CD. Consequently, the findings herein described add to the few cases that have confirmed the occurrence of CDV in non-canid hosts from Brazil.

The frequent occurrence of CDV in non-canid hosts has stimulated the proposal of the renaming of this pathogen to 'carnivore distemper virus' (Terio & Craft, 2013) and demonstrate the possibility of Morbilliviruses, including CDV to cross the species barrier, and successfully adapts into new hosts (Cosby, 2012), probably because Morbilliviruses are considered as the most infectious of all known viruses (Uhl et al., 2019). Thus far, reports of CDV occurring in host other than the domestic dog in Brazil included wolves (Rego, Matushima, Pinto, Matushima, Pinto, & Biasia, 1997), foxes (Hübner et al., 2010; Megid et al., 2009, 2013) and the southern tamandua (Lunardi et al., 2018). How the felids herein described became infected by CDV remains unknown, since there is no documented history of direct contact between street dogs and animals maintained at the BVS. Nevertheless, other species of mammalian hosts from Brazil are likely to be infected by CDV considering the large number of roaming dogs with unknown immunological status in several urban cities of Brazil (Headley et al., 2012) and the possibility of contact with naïve animals. It must be highlighted that the seroprevalence of CDV seems more elevated in urban dogs relative to those maintained in rural areas (Acosta-Jamett et al., 2015), so there also exists the possibility of contact between rural dogs and these felids, considering that Morbilliviruses may be contracted by the ingestion of contaminated meat (Uhl et al., 2019).

In conclusion, intralesional antigens of CDV were identified in tissues of neotropical felids, confirming active infection in these animals. These findings add to the few descriptions of CDV-induced infections in mammalian host other than the domestic dog from Brazil.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Permission to use tissues from neotropical felids maintained at the Bela Vista Biological Sanctuary for scientific purposes was obtained from ITAIPU Binacional (Agreement E/CD 037256/16)



**FIGURE 2** Immunohistochemical demonstration of antigens of canine distemper in Neotropical felids. There is positive immunoreactivity to antigens of canine distemper virus at the bronchial epithelium and mixed glands of the Margay cat with interstitial pneumonia (a), and at transitional epithelium of the urinary bladder of the cougar. Immunoperoxidase counterstained with haematoxylin; Bar, a-b, 50 µm

due to an understanding established between the Department of Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina and ITAIPU Binacional. All methods used during this investigation were approved by and carried out in accordance with the guidelines and regulations of the Universidade Estadual de Londrina relative to the usage of animals submitted for autopsy, biopsy and/or clinical evaluation. N.E. Viana is recipient of a Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) fellowship. T.E.S. Oliveira and S.A. Headley are recipients of the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) fellowships.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declared no potential conflict of interest with respect to the research, authorship and/or publication of this article.

#### ORCID

Nayara Emily Viana  <https://orcid.org/0000-0002-4759-557X>  
 Mariana de Mello Zanim Michelazzo  <https://orcid.org/0000-0002-7324-4351>  
 Thalita Evani Silva Oliveira  <https://orcid.org/0000-0001-6894-9253>  
 Selwyn Arlington Headley  <https://orcid.org/0000-0002-1614-0185>

#### REFERENCES

- Acosta-Jamett, G., Surot, D., Cortes, M., Marambio, V., Valenzuela, C., Vallverdu, A., & Ward, M. P. (2015). Epidemiology of canine distemper and canine parvovirus in domestic dogs in urban and rural areas of the Araucania region in Chile. *Veterinary Microbiology*, 178, 260–264.
- Appel, M. J. (1969). Pathogenesis of canine distemper. *American Journal of Veterinary Research*, 30, 1167–1182.
- Appel, M. J. G., Yates, R. A., Foley, G. L., Bernstein, J. J., Santinelli, S., Spelman, L. H., ... Summers, B. A. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6, 277–288. <https://doi.org/10.1177/104063879400600301>
- Avendano, R., Barrueta, F., Soto-Fournier, S., Chavarria, M., Monge, O., Gutierrez-Espeleta, G. A., Chaves, A. (2016). Canine distemper virus in wild felids of Costa Rica. *Journal of Wildlife Diseases*, 52, 373–377. <https://doi.org/10.7589/2015-02-041>
- Caso, A., de Oliveira, T., & Carvajal, S. V. (2015). *Herpailurus yagouaroundi*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. eT9948A50653167.
- Caswell, J. L., & Williams, K. J. (2016). Respiratory system. In B. M. Grant (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals* (6th edn, pp. 465–590). St. Louis, MO: Elsevier.
- Chaber, A. L., Cozzi, G., Broekhuis, F., Hartley, R., & W. McNutt, J. (2017). Serosurvey for selected viral pathogens among sympatric species of the african large predator guild in Northern Botswana. *Journal of Wildlife Diseases*, 53, 170–175. <https://doi.org/10.7589/2015-11-302>
- Cosby, S. L. (2012). Morbillivirus cross-species infection: Is there a risk for humans? *Future Virology*, 7, 1103–1113. <https://doi.org/10.2217/fvl.12.103>
- de Oliveira, T., Paviolo, A., Schipper, J., Bianchi, R., Payan, E., & Carvajal, S. V. (2015). *Leopardus wiedii*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. eT11511A50654216.
- Filoni, C., Catao-Dias, J. L., Bay, G., Durigon, E. L., Jorge, R. S., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2006). First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *Ehrlichia* exposure in Brazilian free-ranging felids. *Journal of Wildlife Diseases*, 42, 470–477. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-42.2.470>
- Furtado, M. M., Taniwaki, S. A., de Barros, I. N., Brandão, P. E., Catão-Dias, J. L., Cavalcanti, S., ... Ferreira Neto, J. S. (2017). Molecular detection of viral agents in free-ranging and captive neotropical felids in Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29, 660–668. <https://doi.org/10.1177/1040638717720245>
- Gilbert, M., Miquelle, D. G., Goodrich, J. M., Reeve, R., Cleaveland, S., Matthews, L., & Joly, D. O. (2014). Estimating the potential impact of canine distemper virus on the Amur tiger population (*Panthera tigris altaica*) in Russia. *PLoS ONE*, 9, e110811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110811>
- Headley, S. A., Alfieri, A. A., Fritzen, J. T. T., Garcia, J. L., Weissenböck, H., da Silva, A. P., ... Alfieri, A. F. (2013). Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25, 129–135. <https://doi.org/10.1177/1040638712471344>
- Headley, S. A., Amude, A. M., Alfieri, A. F., Bracarense, A. P. F. R. L., & Alfieri, A. A. (2012). Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: A review. *Semina: Ciências Agrárias*, 33, 1945–1978. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n5p1945>
- Headley, S. A., & Graça, D. L. (2000). Canine distemper: Epidemiological findings of 250 cases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 37, 136–140. <https://doi.org/10.1590/S1413-9596200000200009>
- Headley, S. A., Oliveira, T. E. S., Michelazzo, M. M. Z., Fritzen, T. T. J., Cubas, Z. S., Moraes, W., ... Vidotto, O. (2018). Immunohistochemical and molecular evidence of putative *Neorickettsia* infection in coatis (*Nasua nasua*) from southern Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 49, 535–541.
- Headley, S. A., Oliveira, T. E. S., Pereira, A. H. T., Moreira, J. R., Michelazzo, M. M. Z., Pires, B. G., ... Alfieri, A. A. (2018). Canine morbillivirus (canine distemper virus) with concomitant canine adenovirus, canine parvovirus-2, and *Neospora caninum* in puppies: A retrospective immunohistochemical study. *Scientific Reports*, 8, 13477. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31540-0>
- Headley, S. A., Shirota, K., Baba, T., Ikeda, T., & Sukura, A. (2009). Diagnostic exercise: Tyzzer's disease, distemper, and coccidiosis in a pup. *Veterinary Pathology*, 46, 151–154. <https://doi.org/10.1354/vp.46-1-151>
- Headley, S. A., & Sukura, A. (2009). Naturally occurring systemic canine distemper virus infection in a pup. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 2, 95–101.
- Headley, S. A., Viana, N. E., Michelazzo, M. M. Z., Xavier, A. A. C., Costa, C. J. S., de Pinho, F. H. O., & Dos Santos, M. D. (2019). *Neorickettsia helminthoeca* associated lymphoid, enteric, and pulmonary lesions in dogs from Southern Brazil: An immunohistochemical study. *Transboundary and Emerging Diseases*, <https://doi.org/10.1111/tbed.13194>
- Hübner, S. O., Pappen, F. G., Ruas, J. L., Vargas, G. D. Á., Fischer, G., & Vidor, T. (2010). Exposure of pampas fox (*Pseudalopex gymnocercus*) and crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from the Southern region of Brazil to canine distemper virus (CDV), canine parvovirus (CPV) and canine coronavirus (CCoV). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53, 593–597. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000300012>
- Lunardi, M., Darold, G. M., Amude, A. M., Headley, S. A., Sonne, L., Yamauchi, K. C. I., ... Alfieri, A. A. (2018). Canine distemper virus active infection in order Pilosa, family Myrmecophagidae, species *Tamandua tetradactyla*. *Veterinary Microbiology*, 220, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.04.030>
- Megid, J., de Souza, V. A. F., Teixeira, C. R., Cortez, A., Amorin, R. L., Heinemann, M. B., ... Richtzenhain, L. J. (2009). Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: Case report

- and phylogenetic analyses. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 527–530. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.527>
- Megid, J., Teixeira, C. R., Amorin, R. L., Cortez, A., Heinemann, M. B., de Paula Antunes, J. M. A., ... Richtzenhain, L. J. (2010). First identification of canine distemper virus in hoary fox (*Lycalopex vetulus*): Pathologic aspects and virus phylogeny. *Journal of Wildlife Diseases*, 46, 303–305. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.1.303>
- Megid, J., Teixeira, C. R., Cortez, A., Heinemann, M. B., Antunes, J. M. A. P., Fornazari, F., ... Richtzenhain, L. J. (2013). Canine distemper virus infection in a lesser grison (*Galictis cuja*): First report and virus phylogeny. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33, 247–250. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000200018>
- Nagao, Y., Nishio, Y., Shiomoda, H., Tamaru, S., Shimojima, M., Goto, M., ... Maeda, K. (2012). An outbreak of canine distemper virus in tigers (*Panthera tigris*): Possible transmission from wild animals to zoo animals. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74, 699–705. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0509>
- Nielsen, C., Thompson, D., Kelly, M., & Lopez-Gonzalez, C. A. (2015). *Puma concolor*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. e.T18868A97216466.
- Oliveira, T. E. S., Michelazzo, M. M. Z., Fernandes, T., de Oliveira, A. G., Leme, R. A., Alfieri, A. F., ... Headley, S. A. (2017). Histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural evidence of spontaneous Senecavirus A-induced lesions at the choroid plexus of newborn piglets. *Scientific Reports*, 7, 16555. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16407-0>
- Oliveira, T. E. S., Pelaquim, I. F., Flores, E. F., Massi, R. P., Valdiviezo, M. J. J., Pretto-Giordano, L. G., ... Headley, S. A. (2019). Mycoplasma bovis and viral agents associated with the development of bovine respiratory disease in adult dairy cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, <https://doi.org/10.1111/tbed.13223>
- Rego, A. A. M. S., Matushima, E. R., Pinto, C. M., & Biasia, I. (1997). Distemper in Brazilian wild canidae and mustelidae: Case report. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 34, 256–258.
- Rendon-Marin, S., da Fontoura Budaszewski, R., Canal, C. W., & Ruiz-Saenz, J. (2019). Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology Journal*, 16, 30–30. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>
- Roelke-Parker, M. E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., ... Appel, M. J. G. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379, 441–445. <https://doi.org/10.1038/379441a0>
- Seimon, T. A., Miquelle, D. G., Chang, T. Y., Newton, A. L., Korotkova, I., Ivanchuk, G., ... McAloose, D. (2013). Canine distemper virus: An emerging disease in wild endangered Amur tigers (*Panthera tigris altaica*). *MBio*, 4, e00410-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00410-13>
- Sulikhan, N. S., Gilbert, M., Blidchenko, E. Y., Naidenko, S. V., Ivanchuk, G. V., Gorpenchenko, T. Y., ... Miquelle, D. G. (2018). Canine distemper virus in a wild Far Eastern Leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of Wildlife Diseases*, 54, 170–174.
- Terio, K. A., & Craft, M. E. (2013). Canine distemper virus (CDV) in another big cat: Should CDV be renamed carnivore distemper virus? *MBio*, 4, e00702–e00713. <https://doi.org/10.1128/mBio.00702-13>
- Uhart, M. M., Rago, M. V., Marull, C. A., Ferreyra Hdel, V., & Pereira, J. A. (2012). Exposure to selected pathogens in to selected pathogens in Geoffroy's cats and domestic carnivores from central Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, 48, 899–909.
- Uhl, E. W., Kelderhouse, C., Buikstra, J., Blick, J. P., Bolon, B., & Hogan, R. J. (2019). New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. *International Journal of Paleopathology*, 24, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.12.007>

**How to cite this article:** Viana NE, de Mello Zanim Michelazzo M, Oliveira TES, Cubas ZS, de Moraes W, Headley SA. Immunohistochemical identification of antigens of canine distemper virus in neotropical felids from Southern Brazil. *Transbound Emerg Dis*. 2020;00:1–5. <https://doi.org/10.1111/tbed.13422>

## 1 **8 CONCLUSÃO**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

Em conclusão, os padrões histopatológicos observados; pneumonia intersticial e degeneração balonosa do epitélio de transição da vesícula urinária; associados à imunopositividade para antígenos de CDV em tecidos de felídeos neotropicais, confirmando infecção ativa nesses animais.

**1 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

Os resultados desse trabalho demonstram que é possível realizar estudos retrospectivos com animais selvagens, utilizando amostras teciduais armazenadas em formol durante longos períodos.

## 1 **10. PERSPECTIVAS**

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

Vale ressaltar que o morbillivirus canino infecta diversas espécies selvagens de diferentes ordens do reino animal em todos os continentes, onde o cão doméstico está frequentemente envolvido na disseminação e manutenção do CDV. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para agregar conhecimentos sobre o impacto que a pressão antrópica vem causando sobre as áreas de reserva natural do país ao longo dos anos, sobre os prejuízos que a fauna selvagem sofre com as doenças infecciosas caninas e os possíveis riscos à saúde pública.

## ANEXO I

1

2

## 3 Declaração de permissão de uso – ITAIPU Binacional

Usina Hidrelétrica de Itaipu - Brasil  
Avenida Tancredo Neves, 6731  
85866-900 Foz do Iguaçu, PR  
Telefone: + 55 (45) 3520-5505  
Fax: + 55 (45) 3520-5346

**ITAIPU**  
BINACIONAL

E/CD/037267/16  
Usina Hidrelétrica de Itaipu,  
19 de setembro de 2016

Asunción - Paraguay  
Calle de la Residenta, 1075  
CC-6919-ASU Asunción, Paraguay  
Teléfono: +595 (21) 248-1000  
Fax: +595 (21) 248-1669

www.itaipu.gov.br

Senhor  
SELWYIN ARLINGTON HEADLEY  
Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380  
Londrina, PR - Brasil

Atendimento à solicitação de parceria no projeto intitulado, "Determinação das enfermidades associadas à morte de animais silvestres, carnívoros silvestres, no Refúgio Biológico Bela Vista, Paraná".

Em atenção ao protocolo 032654/206-32, de 18/08/2016, que solicita a parceria no projeto intitulado "Determinação das enfermidades associadas à morte de animais silvestres, carnívoros silvestres, no Refúgio Biológico Bela Vista, Paraná", é com satisfação que informamos que sua solicitação foi avaliada por nossa equipe técnica e gerencial e poderá ser atendida.

Esclarecemos, porém, que para a concretização desta parceria, a equipe de pesquisa da UEL/DMVP/LP deve atender às seguintes condições:

- I. Apresentar previamente à ITAIPU seguro de vida dos pesquisadores no período em que estiverem desenvolvendo atividades nas dependências da ITAIPU Binacional.
- II. Arcar com os custos decorrentes do deslocamento, estadia, alimentação e outras despesas pessoais dos pesquisadores.
- III. Redigir relatório para a ITAIPU ao final do projeto, para que se conheça o resultado do trabalho.
- IV. Incluir na dissertação de Mestrado e/ou Doutorado a seguinte citação: "O resultado deste trabalho não reflete a opinião da ITAIPU Binacional", isso por questões jurídicas internas.
- V. Apresentar à ITAIPU uma versão preliminar do documento científico antes de sua divulgação (p.ex., antes da defesa do Mestrado e/ou Doutorado), com antecedência de pelo menos duas semanas, isso para que nossa equipe técnica possa contribuir na redação do texto e para alterar alguma informação que possa estar imprecisa sobre o trabalho que foi desenvolvido.
- VI. Citar a ITAIPU Binacional nas publicações e apresentações relativas a este projeto.
- VII. Constar como coautores em publicações científicas os empregados da ITAIPU que prestaram contribuição relevante para o desenvolvimento da pesquisa.
- VIII. Possibilitar aos coautores da ITAIPU que possam contribuir na redação de artigos científicos decorrentes desse projeto.
- IX. Ceder à ITAIPU um jogo de lâminas com cortes histológicos de cada animal estudado, para compor nossa laminoteca.
- X. A ITAIPU cederá amostras biológicas do seu acervo para os estudos e o material de consumo para histopatologia, conforme orçamento estimado, constante no Projeto

Pág. 1 de 2

4

1

2

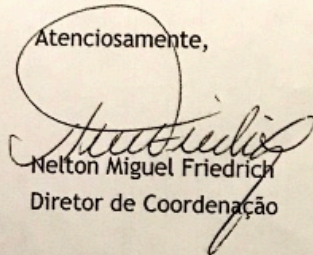


apresentado, página 7.

Dessa forma, estaremos estabelecendo uma parceria duradoura, que certamente resultará em produção científica de qualidade e na boa imagem das instituições.

Se de acordo, pedimos que confirme essa parceria e entre em contato com o médico veterinário Zalmir Silvino Cubas, indicado como supervisor desse projeto, pelo telefone (45) 3520-5616 ou pelo e-mail [zalmir@itaipu.gov.br](mailto:zalmir@itaipu.gov.br)

Atenciosamente,



Nelton Miguel Friedrich  
Diretor de Coordenação

3

## ANEXO II

1  
2  
3

## Protocolo da Técnica de Imunohistoquímica para CDV

REAGENTE/SOLUÇÃO	EQUIPAMENTO	T°C	TEMPO
<b>1. Desparafinização</b>			
	Estufa	60°C	10 h
Xilol I	Berço da IHQ		20 min
Xilol II			20 min
<b>2. Reidratação</b>			
Álcool 100% I			10 min
Álcool 100% II			10 min
Álcool 90%			5 min
Álcool 80%			5 min
Ligar a panela de pressão			
Álcool 70%			5 min
Lavar em H <sub>2</sub> O corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho, transporte		
<b>3. Recuperação Antigênica</b>			
Citrato pH 6,0, cuba azul	Panela de pressão	86-90°C	4 min
Perda da pressão da panela			~20 min
Retirar da panela com auxílio de luva de cozinha			
Estabilização da °T do material em °T ambiente			20 min
Lavar em H <sub>2</sub> O corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho, transporte, cuba de vidro		
<b>4. Bloqueio da Peroxidase Endógena</b>			
Água destilada (90ml) + H <sub>2</sub> O oxigenada 30v (80 ml)		°T amb	30 min
Trabalhar em cuba (solução total 150ml) e berço de vidro. Proteger da luz (utilizar pano do micrótomo)			
Descartar solução			
Lavar em H <sub>2</sub> O corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho, transporte		
<b>5. Incubação com Anticorpo Primário</b>			
Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
Ac Primário diluído em diluente (1:1000)	Câmara úmida	4°C	20-24h

1

**Após incubação**

Lavar em PBS			
PBS pH7,2			5 min
PBS pH7,2			5 min

**6. Incubação com Anticorpo Secundário (superpicture kit polímero- Ivitrogen)**

Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
Ac Secundário diluído	Câmara úmida	°T amb	30 min
PBS pH7,2			5 min
PBS pH7,2			5 min

**7. Solução Cromógena**

Secar ao redor dos cortes com papel toalha			
DAB (Ivitrogen – 1 gota de cada frasco em 1ml de água destilada eppendorf)	Capela ligada	°T amb	3 min
Parar a reação em H <sub>2</sub> O corrente	Cuba de vidro + berço do HE	°T amb	-
Descartar em local próprio			
Lavar em H <sub>2</sub> O corrente	Fraca		10 min
Água destilada	Mergulho, transporte		

**8. Coloração e desidratação**

Hematoxilina de Harris	Tempo relativo	30 seg
Descartar a 1 <sup>a</sup> H <sub>2</sub> O, em descarte de corante. TROCAR O BERÇO PARA O DA IHQ. Azulecer 10min em água corrente		
Álcool 70%		5 min
Álcool 80%		5 min
Álcool 90%		5 min
Álcool 100% I		10 min
Álcool 100% II		10 min
Deixar secar as lâminas na capela para não hidratar o xilol		
Xilol I		20 min
Xilol II		20 min
Montar com lamínula (tamanho adequado + resina)		

## Soluções

### *Tampão Fosfato Salino (PBS) pH7,2*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,96g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,72g
NaCl	16,34g
$\text{H}_2\text{O}$ q.s.p.	2000mL
Ajustar o pH para 7,20 - 7,24	

### *Citrato pH 6,0*

Ácido cítrico	2,1g
Água destilada	1000mL

### *Solução de Revelação - DAB*

$\text{H}_2\text{O}$ destilada	1 mL
Solução 1	1 gota
Solução 2	1 gota
Solução 3	1 gota