



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUANA DE ALMEIDA FREITAS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DE FUSÃO DE
CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS DA CINOMOSE
CANINA EM CÃES**

Londrina
2017

LUANA DE ALMEIDA FREITAS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DE FUSÃO DE
CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS DA CINOMOSE
CANINA EM CÃES**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Londrina
2017

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

Freitas, Luana de Almeida.

Análise filogenética do gene de fusão de cepas brasileiras do vírus da cinomose canina em cães / Luana de Almeida Freitas. - Londrina, 2017.
83 f. : il.

Orientador: Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Vírus da cinomose canina - Tese. 2. Análise filogenética - Tese. 3. Gene F - Tese. 4. Epidemiologia molecular - Tese. I. Alfieri, Alice Fernandes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

LUANA DE ALMEIDA FREITAS

**ANÁLISE FILOGENÉTICA DO GENE DE FUSÃO
DE CEPAS BRASILEIRAS DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA EM
CÃES**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 28 de abril de 2017.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal (LabVir) e no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal, Unidade de Biologia Molecular (LAMSA/BioMol), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT
2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC
3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI
4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT.

Dedico à Deus e à minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por todas as bênçãos recebidas, por iluminar os meus passos e pela força para vencer os desafios.

Aos professores Dr. Amauri e Dra. Alice Alfieri, que me orientaram desde 2011 nas diferentes etapas da minha formação incluindo iniciação científica, residência e mestrado. Agradeço toda a confiança, os ensinamentos científicos e pessoais, que sem dúvida enriqueceram muito minha formação profissional.

Aos professores da banca de qualificação, Dra. Elis Lorenzetti e Dr. Selwyn Arlington Headley e da banca de defesa Dra. Elisabete Takiuchi e Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas, agradeço todas as sugestões e contribuições para melhoria desse trabalho.

A Dra. Raquel Leme, por todo profissionalismo, dedicação e conhecimentos fornecidos para o desenvolvimento e enriquecimento desse trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Animal, que sem dúvida contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho. Agradecimento especial ao estagiário Leonardo Mantovani e às residentes Jaqueline Diniz e Fernanda Louise por todo o auxílio na rotina dos cães enquanto eu trabalhava.

Aos técnicos Marcos, Renilda e Cristiane, pessoas iluminadas que conheci na residência. Obrigada por toda amizade, conselhos, risadas e ótimos momentos juntos.

Aos amigos Jacqueline, Natália, Priscila, Fernanda, Rafael, Zé, Juliana, Viviane, Luciana e Rodrigo por todos os momentos especiais vividos com cada um.

A Venco Saúde Animal, pela oportunidade de poder trabalhar e realizar o mestrado ao mesmo tempo. Agradecimento especial ao Dr. Jorge, Cibelle, Bruno, Edsel e Beatrice por todo convívio e aprendizado de Regulatório.

Em especial a minha mãe Luísa e meu pai Ari, sou grata por toda educação, compreensão e apoio para que eu chegasse até esta etapa da minha vida e também ao meu irmão Bruno, exemplo de dedicação, obrigada por todos os momentos vividos juntos e incentivo aos meus estudos.

Ao meu namorado Thiago, por toda força, compreensão, carinho e amizade nesses quase dois anos juntos.

Muito Obrigada!

“Coragem! E sede fortes. Nada vos atemorize, e não os temais, porque é o Senhor vosso Deus que marcha à vossa frente: ele não vos deixará nem vos abandonará”.

Deuteronômio 31:6

FREITAS, Luana de Almeida. **Análise filogenética do gene de fusão de cepas brasileiras do vírus da cinomose canina em cães**. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A cinomose canina é uma doença viral sistêmica altamente contagiosa, de distribuição mundial e que afeta uma grande variedade de carnívoros terrestres. Este estudo teve como objetivo analisar o gene F completo de cepas de campo brasileiras do vírus da cinomose canina (CDV) e compará-las com outros isolados de CDV. As amostras biológicas caninas ($n=15$) utilizadas neste estudo foram coletadas entre 2003-2004 ($n=6$) e 2013-2016 ($n=9$) e submetidas a ensaio de RT-PCR para amplificação do gene F completo do CDV. A análise das sequências com 2.426 bp de 14 cepas brasileiras de CDV foram classificadas na linhagem EU1 / SA1, com um agrupamento temporal entre amostras antigas (2003-2004) e contemporâneas (2013-2016), independentemente do *status* vacinal dos animais amostrados. Uma cepa brasileira de CDV agrupou-se na linhagem *Rockborn-like*, apresentando alta similaridade (98,5%) com a cepa vacinal Rockborn. Para todas as cepas brasileiras, a região Fsp apresentou a maior variação nas sequências de aminoácidos (67,4% - 96,2%). As cepas brasileiras apresentaram-se mais divergentes em relação às cepas vacinais classificadas como NA1 (24,5% - 36,3%) quando comparadas com a também cepa vacinal Rockborn (11,2% - 14,9%). Dezesete resíduos de cisteína foram encontrados no gene F completo e quatro sítios de glicosilação não conservados foram identificados na região Fsp das cepas brasileiras de CDV. Os resultados sugerem a circulação da linhagem EU1 / SA1 por 25 anos no Brasil e a atual cocirculação de cepas antigas e contemporâneas de CDV. A região Fsp demonstrou ser adequada para estudos evolutivos. Este é o primeiro estudo que realizou a análise do gene F completo de cepas de campo brasileiras de CDV contribuindo com informações relacionadas com a epidemiologia molecular do vírus.

Palavras-chave: Análise Filogenética. CDV. Epidemiologia Molecular. Gene F. Proteína de Fusão.

FREITAS, Luana de Almeida. **Phylogenetic analysis of the the full-length fusion gene of Brazilian field strains of the canine distemper virus in dogs**. 2017. 83p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Canine distemper is a highly contagious systemic viral disease of worldwide distribution and that affects a wide variety of terrestrial carnivores. This study aimed to analyze the whole canine distemper virus (CDV) F gene of Brazilian field strains isolated in dogs and compared it with other CDV isolates. Canine biological samples ($n = 15$) that were collected among 2003-2004 ($n=6$) and 2013-2016 ($n=9$) were subjected to RT-PCR assays for the amplification of full-length CDV F gene. The sequence analysis of 2,426 bp length of 14 Brazilian CDV field strains were classified as EU1/SA1 lineage, with a temporal clustering into past (2003-2004) and contemporaneous (2013-2016) strains, regardless of the vaccination status of animals sampled. One Brazilian strain clustered into the Rockborn-like lineage, showing high similarity (98.5%) with the Rockborn vaccine isolate. For all the Brazilian strains, the Fsp region showed high aa variation (67.4% – 96.2%). The Brazilian strains were more Fsp-divergent of the NA1 (24.5% – 36.3%) than to the Rockborn (11.2% – 14.9%) vaccine strains. Seventeen cysteine residues in the full-length F gene and four non-conserved glycosylation sites were found in the Fsp region of Brazilian CDV strains. The results suggest a 25-year circulation of EU1/SA1 lineage in Brazil and reveal a currently co-circulation of past and contemporaneous CDV strains. The Fsp-coding region of CDV genome was shown to be suitable for evolutionary studies. This is the first study dedicated to the whole CDV F gene analysis from Brazilian field strains, complementing the knowledge on molecular epidemiology of the virus.

Keywords: CDV. F gene. Fusion protein. Molecular epidemiology. Phylogenetic analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Genoma RNA linear fita simples polaridade negativa do vírus da cinomose canina 18
- Figura 2** – Representação esquemática da estrutura de um *Morbillivirus*..... 19
- Figura 3** – Representação esquemática da clivagem da proteína de fusão 21
- Artigo: The full-length fusion gene analysis of canine distemper virus field strains from dogs in Brazil.**
- Figure 1** – Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of the full-length F gene (panel A) and on the F gene signal peptide region (Fsp) (panel B) of Brazilian CDV field strains..... 48
- Figure 2** – Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of F gene signal peptide region (Fsp) with 135 aa of Brazilian, 25259, and vaccine canine distemper virus strains, including the Rockborn vaccine isolate..... 49
- Figure 3** – Alignment of deduced amino acid sequences of CDV strains of the F gene signal peptide (Fsp) region. 51

LISTA DE TABELAS

Artigo: **The full-length fusion gene analysis of canine distemper virus field strains from dogs in Brazil.**

Table 1 –	Sampling data according to the year of collection and animal age, sex, and health status	43
Table 2 –	Oligonucleotide primers used in the One-Step RT-PCR assay for the amplification of the canine distemper virus full-length F gene....	44
Table 3 –	GenBank accession numbers and origin of the full-length CDV F gene sequences used in phylogenetic analysis.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácido
CD	<i>Canine distemper</i> (cinomose canina)
CDV	<i>Canine distemper virus</i> (vírus da cinomose canina)
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i> (Desoxirribonucleotídeos Fosfatados)
FP	<i>Fusion peptide</i> (peptídeo de fusão)
Fsp	<i>Fusion protein signal peptide</i> (peptídeo sinal da proteína de fusão)
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
Kb	Kilobase
ME	Microscopia eletrônica
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeo
pb	Pares de base
RdRP	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> (transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase)
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i> (molécula de sinalização da ativação de linfócito)
SNC	Sistema Nervoso Central
TM	<i>Trans-membrane</i> (trans-membrana)
µL	Microlitro
NA1	América do Norte 1
NA2	América do Norte 2
AS1	Ásia 1
AS2	Ásia 2
AS3	Ásia 3
AS4	Ásia 4
EU1/SA1	Europa 1 / América do Sul 1

SA2	América do Sul 2
SA3	América do Sul 3
SA4	América do Sul 4

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	HISTÓRICO	17
2.2	CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS.....	17
2.2.1	Proteína Hemaglutinina (H).....	19
2.2.2	Proteína de Fusão (F).....	20
2.2.3	Proteína de Matriz (M)	21
2.2.4	Nucleoproteína (N)	21
2.2.5	Grande (Large) Polimerase (L).....	22
2.2.6	Fosfoproteína (P)	22
2.2.7	Proteínas V e C	23
2.3	REPLICAÇÃO	23
2.4	EPIDEMIOLOGIA	24
2.5	PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	25
2.6	DIAGNÓSTICO	27
2.7	CLASSIFICAÇÃO EM LINHAGENS	28
2.8	CONTROLE E PROFILAXIA	29
	REFERÊNCIAS	31
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	38
4.1	The full-length fusion gene analysis of canine distemper virus field strains from dogs in Brazil	38
	Abstract	38
	Introduction	39
	Materials and Methods	41
	Results	44
	Discussion	51

References	58
5 CONCLUSÕES	65
APÊNDICES	66
APÊNDICE A - Online Resource 1. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F gene signal peptide region (Fsp).....	66
APÊNDICE B - Online Resource 2. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences of deduced amino acid sequences of F gene signal peptide region (Fsp) with 135 aa of Brazilian, 25259, and vaccine CDV strains, including the Rockborn vaccine isolate.....	67
APÊNDICE C - Online Resource 3. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F2 region of F gene.....	68
APÊNDICE D - Online Resource 4. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F1 region of F gene.....	69
APÊNDICE E - Online Resource 5. Alignment of deduced amino acid sequences of CDV strains of the F gene F2 region.	70
APÊNDICE F - Online Resource 6. Alignment of deduced amino acid sequences of CDV strains of the F gene F1 region	71
ANEXOS	72
ANEXO A – LISTA DE REAGENTES	72
ANEXO B – SOLUÇÕES E TAMPÕES	75
ANEXO C – PROTOCOLOS DE TÉCNICAS	77
ANEXO D – LISTA DE SOFTWARES	84

1 INTRODUÇÃO

A cinomose é uma doença infecciosa viral de distribuição mundial que acomete cães domésticos e várias espécies de carnívoros selvagens (PANZERA et al., 2014). Em cães, é uma enfermidade multissistêmica, febril, aguda, altamente contagiosa causada pelo vírus da cinomose canina (*canine distemper virus* - CDV) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). A sua maior ocorrência e importância econômica estão relacionadas à infecção em cães jovens não vacinados, com altas taxas de morbidade e mortalidade (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Em países desenvolvidos, as infecções são consideradas frequentes e bem controladas devido aos eficientes protocolos de vacinação (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Contudo, nos últimos dez anos, têm sido relatados surtos da doença em cães com esquema de vacinação completo e evidenciou-se a expansão do número de hospedeiros de diferentes espécies (PARDO; JOHNSON; KLEIBOEKER, 2005; LAN et al., 2006; CALDERON et al., 2007; MARTELLA et al., 2007).

Em alguns países da América do Sul a cinomose ainda é considerada endêmica e importante causa de mortalidade em cães que vivem em regiões urbanas (PANZERA et al., 2014). No Brasil, a infecção natural pelo CDV em cães é elevada devido à grande população de cães não vacinados ou com esquema incompleto de vacinação (BUDASZEWSKI et al., 2014). Os impactos econômicos relativos aos custos de tratamento associado à manifestação clínica da infecção foram estimados entre US\$147,6 e 160,3 milhões por ano no Brasil (HEADLEY et al., 2012)

A cinomose é uma enfermidade multissistêmica, podendo apresentar manifestações clínicas agudas, crônicas ou subclínicas. Os sinais clínicos da doença são muitas vezes inespecíficos, sendo facilmente confundidos com outros agentes infecciosos, o que dificulta o diagnóstico clínico (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Técnicas de detecção de antígeno ou de RNA viral são utilizadas como diagnóstico da doença, sendo a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) amplamente utilizada na rotina, possibilitando a identificação do genoma do CDV mesmo em amostras com pequenas quantidades de partículas virais (AMUDE; ALFIERI; ALFIERI, 2006; NEGRÃO et al., 2013; BUDASZEWSKI et al., 2014).

Com a utilização de técnicas moleculares e análises filogenéticas, as cepas virais de cinomose canina são classificadas em linhagens, que podem ser agrupadas de acordo com a origem geográfica, independentemente da espécie do hospedeiro infectado

(BUDASZEWSKI et al., 2014; KE et al., 2015).

A caracterização das cepas de CDV circulantes em uma população em determinado período de tempo é fundamental para o estabelecimento das bases epidemiológicas da infecção; para a compreensão das formas de apresentação clínica e, principalmente, para relacionar os aspectos imunológicos envolvidos no processo infeccioso e a avaliação de programas imunoprofiláticos.

O presente estudo foi delineado com o objetivo principal de caracterizar cepas de CDV circulantes no Brasil com base na análise filogenética do gene de fusão, a fim de investigar a diversidade genética do vírus no país em comparação com as cepas presentes nas vacinas comerciais e as cepas selvagens circulantes no mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

CDV é um membro do gênero *Morbillivirus* e antigenicamente relacionado com o vírus do sarampo, com o vírus da peste dos pequenos ruminantes e com o vírus da peste bovina (ARNS et al., 2012). A cinomose foi descrita pela primeira vez em 1746 no Peru como uma enfermidade altamente infecciosa em cães e relatada em alguns países da Europa em meados de 1760. Em 1763, cerca de 900 cães morreram em um único dia em Madri (BLANCOU et al., 2004).

Panzer e colaboradores (2015) realizaram um estudo espaço-temporal e sugeriram que as primeiras cepas de CDV originaram-se dos Estados Unidos em 1880; essas cepas teriam se diversificado através do tempo em duas linhagens: a linhagem atual, denominada de América-1, que se disseminou posteriormente pela Ásia, e outra linhagem que se disseminou para diferentes regiões geográficas e deu origem as outras nove linhagens caracterizadas até hoje no mundo (PANZERA et al., 2015).

A etiologia viral foi proposta pelo veterinário francês Henri Carré, em 1905, e a doença foi denominada de doença de Carré (BLANCOU, 2004). Devido a algumas semelhanças clínicas com doenças humanas que, na ocasião, comprometiam a população com surtos de sarampo e a pandemia de gripe em 1918, os primeiros estudos mais relevantes sobre o CDV foram desenvolvidos no Instituto Nacional para Pesquisa Médica de Mill Hill (NIMR; Londres, Reino Unido). Contribuições de tutores de cães permitiram que o patologista Patrick Laidlaw e o médico veterinário George Dunkin confirmassem o trabalho de Carré e, em 1929, desenvolvessem a primeira vacina, utilizando tecidos de um cão infectado, que foram macerados, filtrados e tratados quimicamente, gerando uma vacina inativada (GLEDHILL, 1953).

2.2 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

CDV pertence à ordem *Mononegavirales*, família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* e gênero *Morbillivirus*. As partículas víricas são envelopadas, esféricas ou pleomórficas, com aproximadamente 150 a 300 nm de diâmetro. O genoma do vírus é constituído por uma molécula de RNA fita simples linear não segmentada, de polaridade negativa de aproximadamente 15,9 kb (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Por possuir

polaridade negativa, o genoma desnudo não é infeccioso quando introduzido em células permissivas (ARNS et al., 2012).

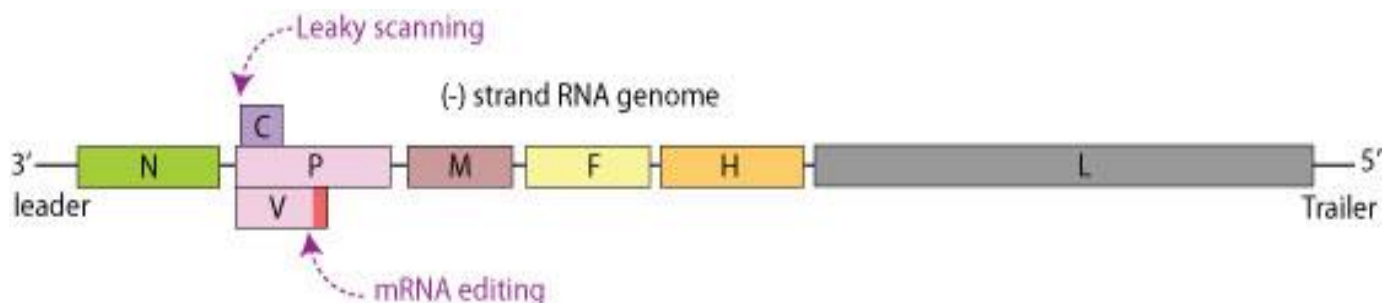
O genoma de CDV possui seis genes que codificam oito proteínas (Figuras 1 e 2), sendo duas não estruturais, denominadas C e V, e seis proteínas estruturais: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), proteína de fusão (F), hemaglutinina (H) e grande polimerase (L) (LAMB; PARKS, 2013).

O nucleocapsídeo possui simetria helicoidal, apresenta entre 13 e 18 nm de diâmetro e é formado pelo genoma RNA, conjugado com aproximadamente 2.500 cópias da proteína N, ao qual estão associadas 300 cópias da proteína P e 50 moléculas da proteína L. No envelope lipídico estão localizadas as duas glicoproteínas de superfície (F e H) que possuem função importante na patogenia das infecções. Além dessas glicoproteínas, os vírions contêm múltiplas cópias da proteína M que preenchem o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope viral (ARNS et al., 2012).

Nos vírions intactos, a única estrutura visível por microscopia eletrônica (ME) é o envelope, com 7 a 15 nm de espessura, recoberto por projeções de 8 a 20 nm de extensão, constituídas pelas glicoproteínas de superfície (MITCHELL et al., 1987).

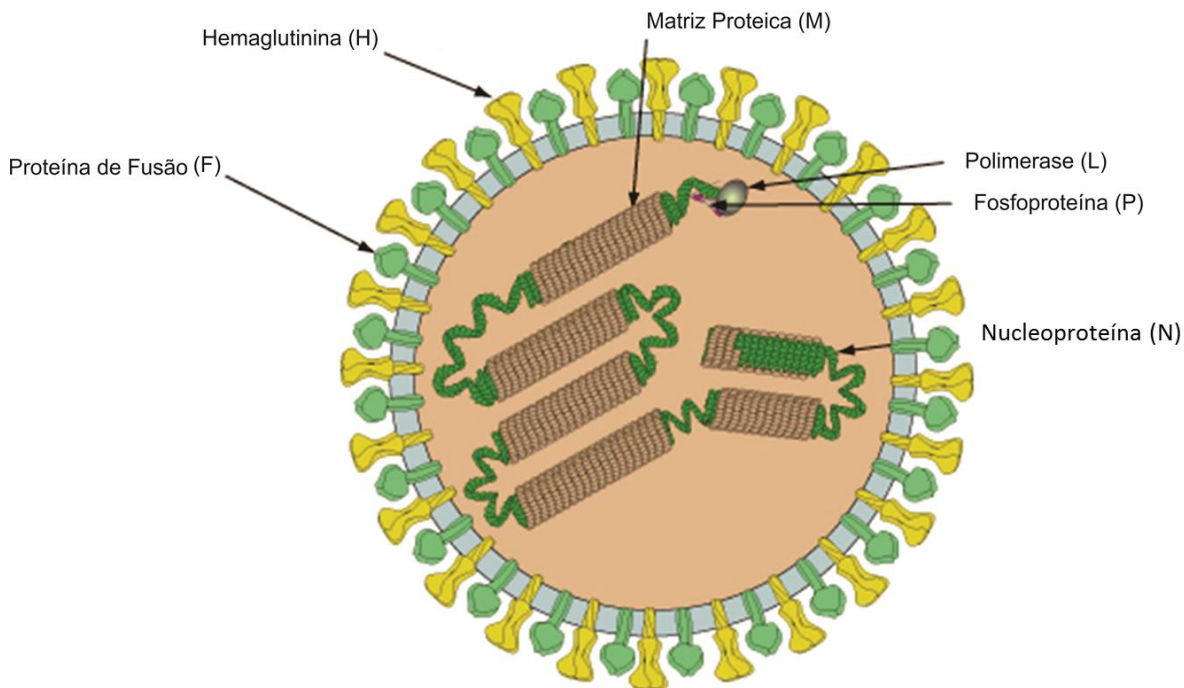
O CDV é sensível aos solventes lipídicos como o clorofórmio e o éter. Formalina, fenol, agentes oxidantes e hipoclorito de sódio também inativam o vírus. O vírion é sensível a pH ácido e ao aquecimento a 56°C por 30 minutos. Apesar de sua labilidade, o CDV pode permanecer viável à temperatura de $\leq -50^{\circ}\text{C}$ ou menos por muitos meses, porém episódios de congelamento e descongelamento podem inativar a infectividade viral (ARNS et al., 2012).

Figura 1 – Genoma RNA linear fita simples polaridade negativa do vírus da cinomose canina.



Fonte: ViralZone, 2014 (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/86.html).

Figura 2 – Representação esquemática da estrutura de um *Morbillivirus*.



Fonte: ViralZone, 2014 (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/86.html).

2.2.1 Proteína Hemaglutinina (H)

A proteína H é responsável pela ligação dos vírions à célula hospedeira e pelo tropismo celular, possuindo importância na indução da resposta imune específica do hospedeiro. Também apresenta atividade de hemaglutinação, utilizada na identificação de isolados e também para diagnóstico (ARNS et al., 2012)

A função primária da proteína H é a ligação aos receptores celulares do hospedeiro. A molécula de sinalização da ativação de linfócito (*Signaling lymphocyte activation molecule* - SLAM) ou CD150 é uma glicoproteína expressa na membrana celular das células do sistema imune e é o principal receptor celular dos morbillivirus. A SLAM é expressa em linfócitos T e B ativados, células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas (VON MESSLING et al., 2005), o que explica o forte tropismo do CDV por estes tipos celulares. A destruição seletiva das células apresentadoras de SLAM pelo CDV é apontada como o principal mecanismo de imunodepressão (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). *In vivo*, CDV também é capaz de infectar células epiteliais e neurais. Um segundo receptor celular, denominado nectina-4, também desempenha um papel importante na disseminação do vírus. A

nectina-4 é uma proteína de adesão que contém domínios semelhantes a imunoglobulinas e está envolvida na neurovirulência do CDV (PRATAKPIRIYA et al., 2012)

O gene da glicoproteína H possui a maior variação genética/antigênica nas espécies incluídas no gênero *Morbillivirus* (VON MESSLING et al., 2001). Com relação ao CDV, a divergência de aminoácidos (aa) da proteína H chega a 10% entre as cepas circulantes, sendo sua análise filogenética amplamente estudada e empregada para classificação das cepas de CDV em genótipos, os quais se agrupam em relação à distribuição geográfica, independentemente da espécie do hospedeiro infectado (ESPINAL; DIAZ; RUIZ-SAENZ, 2014; KE et al., 2015; RILEY; WILKES, 2015).

2.2.2 Proteína de Fusão (F)

A proteína F interage com a H para mediar a fixação e fusão do envelope viral com a membrana celular, permitindo a penetração do nucleocapsídeo na célula hospedeira (LAMB; PARKS, 2013).

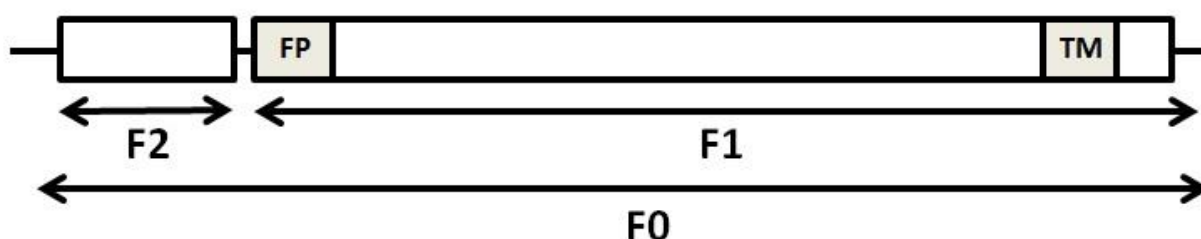
O gene F codifica uma proteína de 662 aa, compreendendo a região do peptídeo de sinal (Fsp - *fusion protein signal peptide*) (aa 1–135), a região F2 (aa 136–224) e a região F1 (aa 225–662), que são produzidas via proteólise pós-traducional (ROMANUTTI et al., 2016). A proteína F inicialmente é sintetizada como um precursor inativo, denominado F0, que necessita ser clivado para torna-se ativo e exercer sua função fusogênica, fator determinante para a patogenicidade viral. F0 é clivado pela ação da protease celular furina nas regiões F1 e F2, que permanecem em estreita proximidade em virtude da ligação por pontes dissulfeto. A subunidade F1 contém duas regiões hidrofóbicas importantes para a promoção da fusão de membrana, o domínio do peptídeo de fusão (FP), localizado na porção N-terminal e o domínio trans-membrana (TM) na porção C-terminal (Figura 3) (VON MESSLING; CATTANEO, 2002).

A clivagem ocorre no interior das vesículas do complexo de Golgi, nos estágios finais do ciclo replicativo, durante o transporte das proteínas virais para a membrana plasmática. Cepas que clivam F0 com mais eficiência tendem a ser mais virulentas, em contraste com cepas menos eficientes na clivagem (ARNS et al., 2012).

O gene F, atua como determinante antigênico, estando sujeito à pressão de seleção (SARUTE et al., 2014). Esse gene, em particular a região Fsp, tem sido foco de novos estudos devido à sua alta variabilidade genética, sendo apontada como uma boa ferramenta de

triagem e de caracterização de cepas de campo de CDV (LEE et al., 2010; SARUTE et al., 2013; SARUTE et al., 2014; ROMANUTTI et al., 2016).

Figura 3 – Representação esquemática da clivagem da proteína de fusão. Na porção inferior, o precursor inativo F0 é representado. Para exercer sua função fusogênica, F0 é clivado pela ação da protease celular furina nas regiões F1 e F2, representadas na porção superior do painel. A subunidade F1 contém duas regiões hidrofóbicas denominadas de peptídeo de fusão (FP) e domínio trans-membrana (TM) nas porções N-terminal e C-terminal, respectivamente. F1 e F2 permanecem ligadas por pontes dissulfeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.2.3 Proteína de Matriz (M)

A proteína M é a mais abundante dos vírions, ocupando o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope, servindo como ponto de ancoragem para as glicoproteínas de superfície H e F (LAMB; PARKS, 2013).

Essa é a proteína mais conservada entre os membros da família *Paramyxoviridae* e auxilia na interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana da célula hospedeira durante a morfogênese, maturação e brotamento do vírion (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.2.4 Nucleoproteína (N)

A nucleoproteína tem aproximadamente 80% da sua sequência conservada, está associada ao genoma viral e juntamente com as proteínas P e L formam o nucleocapsídeo que é responsável pela proteção do genoma viral (ARNS et al., 2012).

Essa proteína permanece associada com o genoma mesmo durante a transcrição e replicação e também participa da morfogênese das novas partículas virais pela interação com a proteína M (LAMB; PARKS, 2013).

2.2.5 Grande (*Large*) Polimerase (L)

A proteína L é encontrada em quantidades muito baixas nas células infectadas, associadas ao nucleocapsídeo e aos vírions (aproximadamente 50 cópias por vírion) e representa a subunidade catalítica da RNA polimerase dependente de RNA (RdRP) (ARNS et al., 2012).

A proteína L só exerce sua atividade a partir da formação de um complexo com a proteína P, fator essencial para a atividade da polimerização a partir de moldes de RNA conjugados pela proteína N (ARNS et al., 2012). A sequência de nucleotídeos (nt) da proteína L é bastante conservada entre os membros de uma mesma subfamília, no entanto, observa-se pouca identidade entre sequência de subfamílias diferentes. Apesar disso, existem cinco regiões genômicas curtas próximas ao centro da proteína L que mostram alta identidade, incluindo RNA polimerases de outras famílias virais, que são essenciais à atividade da RpRP (LAMB; PARKS, 2013).

2.2.6 Fosfoproteína (P)

A proteína P é altamente fosforilada e atua na formação do complexo polimerase para a síntese de RNA (ARNS et al., 2012). Um mecanismo conhecido como edição de RNA, permite que várias proteínas diferentes sejam produzidas a partir do gene P, e no caso dos *Morbilivirus*, são produzidas as proteínas V e C (LAMB; PARKS, 2013).

Toda a atividade catalítica da transcriptase viral é atribuída à proteína L, porém, ela somente é capaz de se ligar ao complexo ribonucleoproteína (RNA:N) na presença da proteína P, que por sua vez regula a transcrição, replicação e a eficiência com que a nucleoproteína se insere e monta os nucleocapsídeos. Juntamente com a nucleoproteína, a proteína P forma agregados citoplasmáticos conhecidos como corpúsculos de inclusão nas células infectadas (ARNS et al., 2012).

2.2.7 Proteínas V e C

As proteínas não estruturais V e C, não são essenciais à replicação viral, mas auxiliam na sobrevivência do vírus *in vitro* e são determinantes da sua virulência (LAMB; PARKS, 2013). Também possuem participação na evasão da resposta imune inata pelo vírus. A regulação da síntese do RNA genômico viral também é exercida pela proteína C (ARNS et al., 2012).

2.3 REPLICAÇÃO

CDV se replica no citoplasma das células infectadas, sem a necessidade de funções nucleares (LAMB; PARKS, 2013). As proteínas de ligação reconhecem receptores compatíveis na superfície celular. O principal receptor celular é a molécula SLAM (CD150) que é encontrada em linfócitos, macrófagos e células dendríticas. Após a ligação, a proteína F serve de mediadora para a fusão do envelope viral com a membrana plasmática, a um pH fisiológico. Para que a proteína precursora F0 exerça sua função fusogênica, é necessária a sua clivagem em F1 e F2 (ARNS et al., 2012). Como não depende de pH baixo para a fusão do envelope viral com a membrana da célula, os paramixovírus são chamados de vírus pH independentes (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Após a entrada na célula ocorre o desnudamento do genoma viral (LAMB; PARKS, 2013). No citoplasma da célula hospedeira o RNA livre é transcrito por seis unidades de polimerase viral em mRNA, que servirá como molde para a tradução de proteínas virais e molde para a replicação da fita negativa do genoma. No decorrer do processo as fitas da progênie viral são empacotadas no capsídeo proteico (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Durante o último estágio da replicação viral as proteínas do envelope migram para a membrana da célula hospedeira, os nucleocapsídeos agrupam-se próximo a membrana celular e são liberados da célula pelo processo de brotamento, adquirindo um envoltório lipoprotéico, derivado da membrana da célula hospedeira onde estão presentes as proteínas H e F (ARNS et al., 2012). A proteína M desempenha uma importante função na liberação do vírus maduro e a nucleoproteína é o antígeno viral produzido em maior concentração durante a replicação viral (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

Além de cães domésticos, o CDV infecta várias outras espécies de carnívoros, incluindo os membros das famílias *Canidae* (coiote, lobo, raposa), *Mustelidae* (furão, gambá, lontra), *Procyonidae* (quati, guaxinim, jupará), *Ailuridae* (panda vermelho), *Viverridae* (gineta, urso-gato-asiático, civeta), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (ursos, panda gigante), *Herpestidae* (juricata, mangusto) e *Felidae* (leão, jaguatirica, onça). Também acomete mamíferos marinhos de várias famílias como as baleias, golfinhos, botos, leões marinhos e focas e primatas não humanos como o macaco rhesus (*Macaca mulatta*) (BEINEKE; BAUMGÄRTNER; WOHLSEIN, 2015). Infecção experimental com CDV em gatos domésticos, assim como em suínos, resultou em soroconversão, mas sem desenvolvimento da doença clínica e excreção do vírus, talvez devido a uma resistência natural à doença que impede a replicação viral nos estágios iniciais (APPEL et al., 1974).

A variedade de hospedeiros vem aumentando desde a década de 90, quando diversas espécies de animais selvagens foram infectadas e morreram em zoológicos dos Estados Unidos (APPEL et al., 1994) e em parques da África (CARPENTER et al., 1998). O aumento do número de hospedeiros vem ampliando a transmissão interespecie de CDV, levando a surtos com altas taxas de mortalidade (GUTIERREZ; SAENZ, 2016). Os furões são extremamente sensíveis à infecção pelo CDV, podendo apresentar taxas de morbidade e mortalidade de até 100% (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Análises evolutivas, filogenéticas e moleculares revelaram que mutações que afetam o sítio de ligação da proteína H aos receptores celulares estão associadas à ocorrência da doença em novas espécies hospedeiras (NIKOLIN et al., 2012; ORIGGI et al., 2012; SATTLER et al., 2014).

A maior importância da cinomose na rotina veterinária está relacionada com as manifestações clínicas em cães domésticos (ARNS et al., 2012). A doença acomete cães de diferentes faixas etárias podendo ainda estar associado com diferentes manifestações clínicas sistêmicas (MARTELLA; ELIA; BUONAVOGLIA, 2008). Entretanto a maior prevalência ocorre em filhotes entre três e seis meses de idade, não vacinados, após o declínio dos anticorpos maternos (CHAPPUIS, 1995).

Surtos em populações de cães domésticos e animais selvagens podem ser causados pela variação antigênica de cepas selvagens de CDV e pela capacidade do vírus de infectar outros hospedeiros carnívoros, que passam a atuar como reservatórios (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

2.5 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A principal via de infecção por CDV é a inalação de aerossóis e gotículas com partículas virais (ARNS et al., 2012). O vírus também pode ser excretado nas fezes, saliva, urina, exsudatos conjuntivais e nasais de animais infectados. Independentemente da apresentação de sinais clínicos, a excreção viral pode ocorrer a partir do 5º dia após a infecção, podendo se prolongar por até 60 a 90 dias (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Diversas variações na duração e gravidade dos sinais clínicos têm sido relatadas em animais experimentalmente e naturalmente infectados. Os sinais clínicos variam de acordo com a virulência da cepa, das condições ambientais, da idade e do *status* imunológico do hospedeiro, com mais de 50% das infecções podendo ser assintomáticas (APPEL; SUMMERS, 1995; HEADLEY et al., 2012).

Após a infecção, o vírus replica primariamente no interior de macrófagos nos tecidos do trato respiratório superior e, em seguida, se dissemina pelos órgãos linfóides. CDV infecta as células que expressam o receptor SLAM, presente nos linfócitos, macrófagos e células dendríticas por meio das suas glicoproteínas de superfície (H e F) (GREENE; VANDEVELDE, 2012). O tropismo do CDV por estas células justifica o seu efeito imunodepressor, que ocorre não somente pela morte celular induzida pela ação viral, mas também porque o vírus inibe respostas de interferon (IFN) e citocinas de células linfóides via a expressão do gene P e virulência das proteínas V e C (VON MESSLING et al., 2003).

A inibição e comprometimento da função imune humoral e celular, caracterizada pela imunodepressão, tornam os animais altamente suscetíveis às infecções secundárias como as de origem bacteriana, parasitária, protozoária e de outros patógenos virais que conseqüentemente agravam o quadro clínico do animal infectado (MORETTI et al., 2006; CHVALA et al., 2007; HEADLEY et al., 2013).

Após a multiplicação nos linfonodos regionais, o vírus atinge a corrente sanguínea (viremia primária), onde circula dentro de linfócitos B e T infectados, disseminando-se para todos os tecidos linfóides (baço, timo, linfonodos, medula óssea), incluindo tecidos linfóides associados ao intestino e macrófagos teciduais, tais como as células de Kupffer no fígado e placas de peyer (ARNS et al., 2012). A proliferação generalizada do vírus nesses tecidos provoca aumento da temperatura corporal e leucopenia entre o 3º e o 6º dia após a infecção (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

A progressão da infecção depende da resposta imunológica do animal (ARNS et al., 2012). Do 7º ao 14º dia de infecção, dependendo da cepa viral, o cão pode desenvolver

resposta imune celular e humoral eficaz e não manifestar sinais clínicos da doença. Títulos de anticorpos adequados e citotoxicidade mediada por células eliminam o vírus e esses animais não apresentam sinais clínicos. O anticorpo IgG-CDV específico é eficaz na neutralização de CDV extracelular e na inibição da sua propagação intercelular (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Em até três semanas após a infecção os cães que não conseguem montar resposta imune eficiente apresentam a doença em diferentes graus de intensidade. Nesses animais, o vírus é transportado por células mononucleares sanguíneas, produzindo um segundo pico febril (viremia secundária), disseminando-se para vários tecidos, incluindo o tegumento, trato digestório, respiratório, urinário, genital e sistema nervoso central (SNC) (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Esses animais podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas, relacionadas com os órgãos e os tecidos afetados, e a sequência de eventos patogênicos depende da cepa viral e os sinais clínicos da doença nestes cães geralmente são graves (ARNS et al., 2012).

A infecção de cadelas prenhes pode resultar na transmissão transplacentária do vírus, podendo causar abortamento, natimortos, nascimento de filhotes fracos debilitados (ARNS et al., 2012).

No decorrer da infecção podem ser observados quadros de anorexia, descarga nasal, conjuntivite, tosse, vômitos, diarreia e depressão (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011). Na forma menos grave da doença são encontrados quadros de redução do apetite, febre e sinais clínicos relacionados ao trato respiratório superior. Alguns sinais inespecíficos como descarga ocular serosa bilateral, que pode tornar-se mucopurulenta, tosse e dispnéia também podem ocorrer (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

As células mononucleares carregam CDV para o SNC através da barreira hematoencefálica e/ou pelo líquido cefalorraquidiano (ARNS et al., 2012). No SNC, se replica em neurônios e em células gliais, resultando em lesões na substância cinzenta e na substância branca, com desmielinização. As manifestações neurológicas ocorrem entre uma a três semanas após o início dos sinais clínicos agudos, mas podem também aparecer depois de infecção subclínica. Convulsões, sinais cerebelares e vestibulares, paraparesia ou tetraparesia com ataxia sensitiva e mioclonias são comuns (GREENE; VANDEVELDE, 2012). Sinais neurológicos, agudos ou crônicos, geralmente são progressivos, o que leva a um prognóstico reservado; cães que sobrevivem podem ter sequelas permanentes no SNC (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da cinomose com base nos achados clínicos de anamnese e exame físico é inconclusivo, uma vez que o CDV é um vírus pantrópico capaz de causar quadros clínicos distintos e inespecíficos que se confundem com outras doenças. Para fins de diagnóstico diferencial, devem ser consideradas as enfermidades como: tosse dos canis, parvovirose, coronavirose, infecções bacterianas, doença neurológica como toxoplasmose, neosporose, criptococose, intoxicação por chumbo e raiva (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Para o diagnóstico laboratorial, na dependência da apresentação clínica e da evolução da cinomose, o vírus pode estar presente em várias amostras biológicas. Nos diferentes estágios da infecção, amostras biológicas como órgãos, urina, sangue total, leucócitos, fezes, líquor, secreção respiratória e ocular podem apresentar concentrações variadas do vírus (AMUDE et al., 2007; GEBARA et al., 2004; NEGRÃO et al., 2013; SILVA et al., 2014).

No exame hematológico pode-se observar linfopenia, durante a fase inicial da infecção, combinada com leucopenia ou leucocitose, anemia, monocitose e, raramente, trombocitopenia (GEBARA et al., 2004). Porém, nenhum desses sinais é específico para a doença e variam de animal para animal e de acordo com a fase da infecção viral (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

O diagnóstico rápido de CDV pode ser obtido por meio de *kits* comerciais de ensaio imunocromatográfico para a detecção da proteína F. A vantagem desse sistema é a realização em clínicas e consultórios veterinários utilizando como amostras biológicas *swab* conjuntival, urina, saliva, soro, plasma ou líquor, enquanto sua maior desvantagem é a possibilidade de resultado falso-negativo (CURTI; ARIAS; ZANUTTO, 2012).

A histopatologia possibilita o diagnóstico definitivo de infecção pelo vírus por meio da observação de corpúsculos de inclusão intranucleares e eosinofílicos (corpúsculo de Lentz), porém, o resultado negativo não exclui a infecção (HEADLEY; GRAÇA, 2000). A desvantagem da técnica é a realização apenas *post mortem* (KOUTINAS et al., 2004).

O isolamento de CDV em cultivo celular, embora seja considerada a prova ouro no diagnóstico da infecção, não se aplica na rotina diagnóstica, pois além de demorada, é necessário a adaptação do vírus aos cultivos celulares (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011).

Desde 1995 a RT-PCR tem sido utilizada como ferramenta para o diagnóstico da cinomose (SHIN et al., 1995). Trata-se de uma técnica com alta sensibilidade e especificidade, que permite a amplificação de fragmentos genômicos mesmo em amostras com

pequenas quantidades de partículas virais, sendo muito eficiente para diagnóstico em animais assintomáticos (NEGRÃO et al., 2013; BUDASZEWSKI et al., 2014).

2.7 CLASSIFICAÇÃO EM LINHAGENS

O gene H tornou-se foco dos estudos filogenéticos devido à sua alta variabilidade, revelando padrões de agrupamentos geográficos que são úteis para monitorar a epidemiologia molecular de CDV (MARTELLA et al., 2006; NEGRÃO et al., 2013; BUDASZEWSKI et al., 2014; RILEY; WILKES, 2015).

Com base nas sequências parciais e completas do gene H de cepas de CDV isoladas de diferentes regiões geográficas do mundo, pelo menos 15 linhagens já foram descritas, sendo elas: América do Norte 1 (NA1), América do Norte 2 (NA) , Ásia 1 (AS1), Ásia 2 (AS2), Ásia 3 (AS3), Ásia 4 (AS4), Europa 1 / América do Sul 1 (EU1/SA1), América do Sul 2 (SA2), América do Sul 3 (SA3), América do Sul 4 (SA4), *European Wild-life, Article-like, Rockborn-like* , África 1 e África 2 (WOMA et al., 2010; MARTELLA et al., 2011; PANZERA et al., 2014; KE et al., 2015). As análises com base nas sequências do gene H de cepas brasileiras demonstraram um predomínio da linhagem EU1/SA1 no país (PANZERA et al., 2012; ROSA et al., 2012; BUDASZEWSKI et al., 2014).

Assim como o gene H, o gene F também atua como determinante antigênico, sendo descrito como uma região com variabilidade suficiente para a realização de estudos filogenéticos e obtenção de maior compreensão sobre a epidemiologia dos surtos causados pelo CDV (SULTAN et al., 2009; LEE et al., 2010; ROMANUTTI et al., 2016). Dentro do gene F, uma curta região (Fsp) apresenta-se extremamente variável, considerada útil para caracterização das cepas circulantes do vírus (SARUTE et al., 2013; 2014 et al.; ROMANUTTI et al., 2016).

Na América do Sul, três linhagens de CDV foram identificadas com base em análises da região Fsp, sendo elas: EU1/SA1, presente no Brasil, Uruguai e Argentina; SA2 circulante somente na Argentina; e SA3 presente no Equador (SARUTE et al., 2014). Com base na análise de uma região parcial (630 pb) do gene H comum a todas as cepas de CDV da América do Sul, uma quarta linhagem foi descrita, constituída por cepas colombianas, para a qual foi sugerida a denominação SA4 (PANZERA et al., 2014). Entretanto, a região Fsp das cepas de CDV colombianas não foi analisada.

Análises filogenéticas com base no gene H e F evidenciaram a existência de acentuada diversidade genética nas novas cepas de campo (denominadas *new* CDV),

englobando cepas isoladas na Europa, Ásia, Américas do Norte e do Sul, quando comparada à diversidade genética de cepas antigas de CDV (denominadas *old* CDV), incluindo as cepas padrões e vacinais isoladas nas décadas de 50 e 60, como a Onderstepoort, Snyder Hill, Lederle e Rockborn (BUDASZEWSKI et al., 2014; SARUTE et al., 2014; RILEY; WILKES, 2015).

2.8 CONTROLE E PROFILAXIA

A medida mais eficaz para controlar a cinomose é a imunização, por meio de vacinação, ainda que as medidas clássicas de higiene devam ser aplicadas em paralelo (ARNS et al., 2012). A imunização ativa obteve sucesso a partir da década de 50 com uma drástica redução do impacto de CDV na população canina (GREENE; VANDEVELDE, 2012).

Controlar a disseminação do vírus no ambiente ainda é muito difícil, pois, a cobertura vacinal é insuficiente na maioria das regiões menos desenvolvidas, fato associado com o poder aquisitivo dos cidadãos, com o tamanho da população canina, com o alto número de cães não domiciliados, resultando em muitos animais suscetíveis; e também em relação ao grande número de espécies selvagens suscetíveis ao vírus (LAN et al., 2006; ARNS et al., 2012; HEADLEY et al., 2012).

A vacinação com cepas atenuadas do CDV, em formulações polivalentes, é a estratégia mais utilizada no combate a cinomose (ARNS et al., 2012). Cepas que circulavam mundialmente nas décadas de 50 e 60 (Onderstepoort, Snyder Hill, Rockborn e Lederle) ainda são utilizadas na produção das vacinais disponíveis no mercado atualmente (MARTELLA et al., 2011).

A cepa Rockborn foi retirada do mercado após meados de 1990, como consequência de notificações de casos suspeitos de encefalite pós-vacinal, considerada menos atenuada e menos segura que outras cepas vacinais, entretanto, Martella e colaboradores (2011) demonstraram que essa cepa ainda faz parte da composição das vacinais comerciais.

As falhas vacinais podem ser geradas por múltiplos fatores como interferência de anticorpos transmitidos passivamente, falhas individuais de resposta imune, qualidade, conservação, variabilidade antigênica do imunógeno e infecção anterior a vacinação (ARNS et al., 2012).

Vacinas recombinantes estão disponíveis no mercado na tentativa de evitar reações adversas como a encefalite pós-vacinal, entretanto, apresentam menor duração de imunidade quando comparadas com as vacinas de vírus vivo atenuado (ARNS et al., 2012).

Por ser um vírus de genoma RNA, muitas mutações foram identificadas nas últimas décadas, tornando as cepas de CDV circulantes atualmente geneticamente diferentes das cepas vacinais (SARUTE et al., 2014; KE et al., 2015; RILEY; WILKES, 2015).

Surtos em populações de cães domésticos e animais selvagens podem ser causados pela variação antigênica de cepas selvagens do CDV e, conseqüentemente, pelo surgimento de novas cepas de campo capazes de evadir-se da resposta imunológica gerada pelas “cepas antigas” que ainda são utilizadas nas vacinas comerciais (CALDERON et al., 2007; IWATSUKI et al., 2000; MARTELLA et al., 2010). As novas cepas de CDV podem, ainda, apresentar capacidade de infectar outros hospedeiros carnívoros, que passam a atuar como reservatórios, mantendo a circulação do vírus entre animais suscetíveis (GREENE; VANDEVELDE, 2012; BEINEKE; BAUMGÄRTNER; WOHLSEIN, 2015; GUTIERREZ; SAENZ, 2016).

Além da vacinação, as pessoas envolvidas nos cuidados ambulatoriais com animais doentes devem sempre utilizar medidas de biossegurança (luvas descartáveis, esterilização e descarte de fômites, higiene pessoal e do ambiente), associadas com o isolamento dos animais infectados, prevenindo a disseminação do vírus no ambiente residencial e hospitalar (ARNS et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 6, p. 679-687, 2006.
- AMUDE, A.M.; CARVALHO, G.A.; ALFIERI, A.A. et al. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.354-356, 2007.
- APPEL, M.; SHEFFY, B.E.; PERCY, D.H.; GASKIN, J.M. Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 35, n. 6, p. 803-806, 1974.
- 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.; KELLING, S.P.; SUMMERS, B.A. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 3, p. 277-288, 1994.
- APPEL, M.J.; SUMMERS, B.A. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 187-191, 1995.
- ARNS, C.W.; ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; SANTOS, M.B. Paramyxoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. 2th ed. Santa Maria:UFSM, 2012. p. 759-792.
- BEINEKE, A.; BAUMGÄRTNER, W.; WOHLSEIN, P. Cross-species transmission of canine distemper virus—an update. **One Health**, v. 1, p. 49-59, 2015.
- BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? **Historia Medicinae Veterinariae**, v. 29, n. 2, p. 35-41, 2004.
- BUDASZEWSKI, R.F.; PINTO, L.D.; WEBER, M.N.; CALDART, E.T.; ALVES, C.D.; 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.
- CALDERON, M.G.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTION, N.; LA TORRE, J. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. **Veterinary Microbiology**, v. 125, n. 3-4, p. 341-349, 2007.
- CARPENTER, M.A.; APPEL, M.J.; ROELKE-PARKER, M.E.; MUNSON, L.; HOFER, H.; EAST, M.; O'BRIEN, S.J. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, n. 2-4, p. 259-266, 1998.
- CHAPPUIS, G. Control of canine distemper. **Veterinary Microbiology**, v. 44, n. 2-4, p. 351-358, 1995.

CHVALA, S.; BENETKA, V.; MOSTL, K.; ZEUGSWETTER, F.; SPERGSEER, J.; WEISSENBOCK, H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 4, p. 508-512, 2007.

CURTI, M.C.; ARIAS, M.V.B.; ZANUTTO, M.S. Avaliação de um kit de imunoenensaio cromatográfico para detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2383-2390, 2012.

ESPINAL, M.A.; DIAZ, F.J.; RUIZ-SAENZ, J. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 1-2, p. 168-176, 2014.

GEBARA, C.M.S.; WOSIACKI, S.R.; NEGRÃO, F.J.; OLIVEIRA, D.B.D.; BELONI, S.N.E.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 480-487, 2004.

GLEDHILL, A.W. Some veterinary diseases of medical interest. **British Medical**, v.9, n.3, p.237-241, 1953.

GREENE, C.E.; VANDEVELDE, M. Canine Distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. Saint Louis:Elsevier, 2012. p. 25-42.

GUTIERREZ, M.M.; SAENZ, J.R. Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. **BMC Veterinary Research**, v. 12, p. 1-11, 2016.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, p. 136-140, 2000.

HEADLEY, S.A.; AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.F.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A. Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review. . **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1945-1978, 2012.

HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A.; FRITZEN, J.T.; GARCIA, J.L.; WEISSENBOCK, H.; DA SILVA, A.P.; BODNAR, L.; OKANO, W.; ALFIERI, A.F. Concomitant canine distemper, infectious canine hepatitis, canine parvoviral enteritis, canine infectious tracheobronchitis, and toxoplasmosis in a puppy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 25, n. 1, p. 129-135, 2013.

IWATSUKI, K.; TOKIYOSHI, S.; HIRAYAMA, N.; NAKAMURA, K.; OHASHI, K.; WAKASA, C.; MIKAMI, T.; KAI, C. Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viroses. **Veterinary Microbiology**, v.71, p.281-286, 2000.

KE, G.M.; HO, C.H.; CHIANG, M.J.; SANNO-DUANDA, B.; CHUNG, C.S.; LIN, M.Y.; SHI, Y.Y.; YANG, M.H.; TYAN, Y.C.; LIAO, P.C.; CHU, P.Y. Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 164, 2015.

KOUTINAS, A.F.; BAUMGARTNER, W.; TONTIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; LEKKAS, S. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard Pad disease) in dogs with natural canine distemper. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 1, p. 2-9, 2004.

LAMB, R.A.; PARKS, G.D. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 957-995.

LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; INOMATA, A.; FURUYA, Y.; UCHIDA, K.; SUGANO, S.; TATEYAMA, S. Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1-3, p. 32-42, 2006.

LEE, M.S.; TSAI, K.J.; CHEN, L.H.; CHEN, C.Y.; LIU, Y.P.; CHANG, C.C.; LEE, S.H.; HSU, W.L. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. **The Veterinary Journal**, v. 183, n. 2, p. 184-190, 2010.

MACLACHLAN, N.J.; DUBOVI, E.J. Paramyxoviridae. In: **Fenner's Veterinary Virology**. 4th ed. San Diego:Academic Press, 2011. p. 299-325.

MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M.S.; BELLACICCO, A.L.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 301-309, 2006.

MARTELLA, V.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; DECARO, N.; LORUSSO, E.; BANYAI, K.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; CIRONE, F.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. **Veterinary Microbiology**, v. 122, n. 1-2, p. 32-42, 2007.

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. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v.16, p.2007-2009, 2010.

MARTELLA, V.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; ELIA, G.; LUCENTE, M.S.; CIRONE, F.; DECARO, N.; NIELSEN, L.; BANYAI, K.; CARMICHAEL, L.E.; BUONAVOGLIA, C. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. **Vaccine**, v. 29, n. 6, p. 1222-1227, 2011.

MITCHELL, W.J.; RUSSELL, S.E.; CLARK, D.K.; RIMA, B.K.; APPEL, M.J. Identification of negative strand and positive strand RNA of canine distemper virus in animal tissues using single stranded RNA probes. **Journal of Virological Methods**, v. 18, n. 2-3, p. 121-131, 1987.

MORETTI, L.; DA SILVA, A.V.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C.; LANGONI, H. Toxoplasma gondii genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 359-363, 2006.

NEGRÃO, F.J.; GARDINALI, N.R.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A.; FERNANDEZ, M.A.; ALFIERI, A.F. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2549-2555, 2013.

NIKOLIN, V.M.; WIBBELT, G.; MICHLER, F.U.; WOLF, P.; EAST, M.L. Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages. **Veterinary Microbiology**, v. 156, n. 1-2, p. 45-53, 2012.

ORIGGI, F.C.; PLATTET, P.; SATTLER, U.; ROBERT, N.; CASAUBON, J.; MAVROT, F.; PEWSNER, M.; WU, N.; GIOVANNINI, S.; OEVERMANN, A.; STOFFEL, M.H.; GASCHEN, V.; SEGNER, H.; RYSER-DEGIORGIS, M.P. Emergence of canine distemper virus strains with modified molecular signature and enhanced neuronal tropism leading to high mortality in wild carnivores. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 6, p. 913-929, 2012.

PANZERA, Y.; CALDERÓN, M.G.; SARUTE, N.; GUASCO, S.; CARDEILLAC, A.; BONILLA, B.; HERNÁNDEZ, M.; FRANCIÀ, L.; BEDÓ, G.; LA TORRE, J.; PÉREZ, R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. **Virus Research**, v. 163, n. 1, p. 401-404, 2012.

PANZERA, Y.; SARUTE, N.; CARRAU, L.; ALDAZ, J.; PÉREZ, R. Genetic diversity of canine distemper virus in South America. **British Journal of Virology**, v. 1, n. 2, p. 48-53, 2014.

PANZERA, Y.; SARUTE, N.; IRAOLA, G.; HERNANDEZ, M.; PEREZ, R. Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 92, p. 147-154, 2015.

PARDO, I.D.; JOHNSON, G.C.; KLEIBOEKER, S.B. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5009-5017, 2005.

PRATAKPIRIYA, W.; SEKI, F.; OTSUKI, N.; SAKAI, K.; FUKUHARA, H.; KATAMOTO, H.; HIRAI, T.; MAENAKA, K.; TECHANGAMSUWAN, S.; LAN, N.T.; TAKEDA, M.; YAMAGUCHI, R. Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. **Journal of Virology**, v. 86, p. 10207-10210, 2012.

RILEY, M.C.; WILKES, R.P. Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. **Virology Journal**, v. 12, p. 219, 2015.

ROSA, G.N.; DOMINGUES, H.G.; SANTOS, M.M.A.B.D.; FELIPPE, P.A.N.; SPILKI, F.R.; ARNS, C.W. Detecção molecular e análise filogenética do gene H de amostras do vírus da cinomose canina em circulação no município de Campinas, São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 72-77, 2012.

ROMANUTTI, C.; GALLO CALDERON, M.; KELLER, L.; MATTION, N.; LA TORRE, J. RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine Distemper Virus from domestic dogs. **Journal of Virological Methods**, v. 228, p. 79-83, 2016.

SARUTE, N.; CALDERON, M.G.; PEREZ, R.; LA TORRE, J.; HERNANDEZ, M.; FRANCA, L.; PANZERA, Y. The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63595, 2013.

SARUTE, N.; PEREZ, R.; ALDAZ, J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; NAME, D.; LLANES, J.; HERNANDEZ, M.; FRANCA, L.; PANZERA, Y. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 474-478, 2014.

SATTLER, U.; KHOSRAVI, M.; AVILA, M.; PILO, P.; LANGEDIJK, J.P.; ADER-EBERT, N.; ALVES, L.A.; PLATTET, P.; ORIGGI, F.C. Identification of amino acid substitutions with compensational effects in the attachment protein of canine distemper virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 14, p. 8057-8064, 2014.

SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 57, n. 3, p. 439-445, 1995.

SILVA, A.P.; BODNAR, L.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Molecular detection of canine distemper virus (CDV), canine adenovirus A types 1 and 2 (CAV-1 and CAV-2), and canine parvovirus type 2 (CPV-2) in the urine of naturally infected dogs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3231-3236, 2014.

SULTAN, S.; CHAROENVISAL, N.; LAN, N.T.; YAMAGUCHI, R.; MAEDA, K.; KAI, K. The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper viruses. **Virology Journal**, v. 6, p. 157, 2009.

VON MESSLING, V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. **Journal of Virology**, v. 75, n. 14, p. 6418-6427, 2001.

VON MESSLING, V.; CATTANEO, R. Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. **Journal of Virology**, v. 76, n. 9, p. 4172-4180, 2002.

VON MESSLING, V.; SPRINGFELD, C.; DEVAUX, P.; CATTANEO, R. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. **Journal of Virology**, v. 77, n. 23, p. 12579-12591, 2003.

VON MESSLING, V.; OEZGUEN, N.; ZHENG, Q.; VONGPUNSAWAD, S.; BRAUN, W.; CATTANEO, R. Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 9, p. 5857-5862, 2005.

WOMA, T.Y.; VAN VUUREN, M.; BOSMAN, A.M. et al. 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.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a sequência completa de nucleotídeos do gene F de cepas brasileiras de CDV identificadas em cães e realizar análises filogenéticas comparativas entre as cepas estudadas e aquelas disponíveis em bancos públicos de dados (GenBank).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Amplificar, por meio de RT-PCR, o gene de fusão completo de cepas brasileiras de CDV;
- Sequenciar os fragmentos do gene F amplificados na RT-PCR para a classificação do vírus em linhagens;
- Realizar análise filogenética comparativa entre as cepas de CDV antigas e contemporâneas circulantes no Brasil;
- Realizar análise filogenética comparativa das cepas virais encontradas com as cepas virais de referência (protótipos) disponíveis em bases públicas de dados (*GenBank*), incluindo as cepas vacinais;
- Avaliar a utilização da região Fsp do gene F na classificação das cepas circulantes de CDV.

4 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Artigo formatado de acordo com as normas de publicação do periódico *Archives of Virology*, disponível em:

http://www.springer.com/biomed/medical+microbiology/journal/705?detailsPage=pltc_i_1060661

4.1 The full-length fusion gene analysis of canine distemper virus field strains from dogs in Brazil

Abstract

Canine distemper is a highly contagious systemic viral disease, of worldwide distribution and that affects a wide variety of terrestrial carnivores. This study aimed to analyze the whole CDV F gene of Brazilian field strains and compared it with other CDV isolates. Canine biological samples ($n=15$) that were collected among 2003-2004 ($n=6$) and 2013-2016 ($n=9$) were subjected to RT-PCR assays for the amplification of 2,426 bp of the full-length of CDV F gene. Fourteen Brazilian CDV strains were classified as EU1/SA1 lineage, with a temporal clustering into past (2003-2004) and contemporaneous (2013-2016) strains, regardless of the vaccination status of animals sampled. One Brazilian strain clustered into the Rockborn-like lineage, showing high similarity (98.5%) with the Rockborn vaccine isolate. For all the Brazilian strains, the Fsp region showed high aa variation (67.4% – 96.2%). The Brazilian strains were more Fsp-divergent of the NA1 (24.5% – 36.3%) than to the Rockborn (11.2% – 14.9%) vaccine strains. Seventeen cysteine residues in the full-length F gene and four non-conserved glycosylation sites were found in the Fsp region of Brazilian strains. The results suggest a 25-year circulation of EU1/SA1 lineage in Brazil and reveal a currently co-circulation of past and contemporaneous

CDV strains. The Fsp-coding region of CDV genome was shown to be suitable for evolutionary studies. This is the first study dedicated to the whole CDV F gene analysis from Brazilian field strains, complementing the knowledge on molecular epidemiology of the virus.

Keywords: Paramyxovirus. CDV. F gene. Fusion protein. Phylogenetic analysis. Molecular epidemiology.

Introduction

Canine distemper virus (CDV) is a highly contagious pathogen for domestic dogs and several wild carnivore species [9]. CDV is the etiological agent of canine distemper (CD), a severe multisystemic and globally distributed disease [31]. The clinical manifestations of CDV infections vary widely and depend on factors such as individual immune status, vaccination history, and virus strain virulence. Main clinical signs include dermatologic, respiratory, gastrointestinal, neurological, and immunological disorders such as immunodepression [11].

CDV is a member of the *Morbillivirus* genus within the *Paramyxoviridae* family. The virus is enveloped and its genome consists of a non-segmented single-stranded negative-sense RNA of approximately 15.7 kb [20]. CDV genome encodes eight viral proteins, being two nonstructural proteins (C and V) and six structural proteins called hemagglutinin (H), fusion (F), matrix (M), phosphoprotein (P), large polymerase (L), and nucleocapsid (N) [11].

The H and F glycoproteins are located at the virus envelope and are more variable than other CDV proteins [2, 24, 45, 46]. The H protein helps in attachment of the virus to the host cell, while the F protein mediates fusion between the virus and infected cells [43]. Both glycoproteins are the antigenic determinants that induce protective immune responses against CDV [15, 50]. Genetic variation in genes encoding the H and F envelope proteins is regarded as possible cause of the increasing number of CDV infections in dogs [21, 22, 24].

Sequence analysis of the H gene has been widely studied and employed to characterize CDV field strains worldwide [8, 18, 34]. In addition the F gene, in particular the fusion protein signal-peptide (Fsp) coding region has been focused in new studies, due to its high variability, contributing to the knowledge of molecular epidemiology of CDV and characterization of CDV field strains [22, 36, 40, 42].

The open reading frame of the CDV F gene encodes 662 amino acids (aa), comprising the regions Fsp (aa 1–135), F2 (aa 136–224), and F1 (aa 225–662), which are produced via post-translational proteolysis [36]. The F gene is synthesized initially as an inactive precursor, named F0, which is cleaved by furin [48]. Such cleavage is essential for virus infectivity, since it activates a cellular serine protease that acts in the Golgi complex and plays a determining role for CDV pathogenicity. Cleavage releases the new N-terminus of F1, thus forming the biologically active protein consisting of the disulphide-linked F1 and F2 subunit proteins [44, 48]. The F1 subunit contains two hydrophobic regions important for promotion of membrane fusion, the fusion peptide (FP) domain, located at the F1 subunit N-terminus and the trans-membrane (TM) domain at its C-terminus [20].

In Brazil, CD is one of the most important viral diseases and still the principal cause of mortality in some urban canine populations [14]. Increasing in the incidence of the disease has been demonstrated in Brazil and in the world even in vaccinated dog populations [5, 13, 25, 30]. Most of the CDV-based molecular epidemiologic studies conducted in Brazil were based on analysis of the N and H genes [1, 5, 6, 29, 37]. Currently there are no reports of the full-length F gene analysis for characterization of Brazilian field strains as already done in other Asian and American countries [22, 36, 41, 45].

In this context, the aim of this study was to investigate the genetic diversity of the full-length F gene of CDV Brazilian field strains from 2003 to 2004 and 2013 to 2016 and compared it with worldwide circulating wild-type and vaccine strains.

Materials and Methods

Specimens included in this study were selected from a collection of CDV-positive canine biological samples that were collected between 2003 and 2016 and stored at -80°C . The inclusion criterion was samples that remained positive by conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for amplification of 287 bp fragment size of the N gene of CDV [10]. A total of 15 specimens were selected in this analysis and included urine ($n=6$), whole blood ($n=5$), and central nervous tissues ($n=4$) that were collected from domestic dogs of Northern Paraná, Brazil, among 2003-2004 ($n=6$) and 2013-2016 ($n=9$); these specimens were grouped into past and contemporaneous samples (Table 1).

The nucleic acid was extracted from 250 μL of whole blood and tissue suspension samples using TRIzol[®] LS Reagent (Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The nucleic acid was extracted from 300 μL of urine samples based on the silica/guanidinium isothiocyanate method [4]. The nucleic acid was eluted in 30 μL of ultrapure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water. During the nucleic acid extraction and the following procedures, an attenuated vaccine CDV strain and aliquots of ultrapure sterile water were used as positive and negative controls, respectively.

Four primer sets were used to amplify the full-length (2426 bp) of CDV F gene (Table 2). The amplification reactions were performed in final solutions of 50 μL for each targeted fragment using a One-Step RT-PCR kit (Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The reaction solutions contained 5 μL of extracted nucleic acid, 25 μL of 2x Reaction Mix (buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM MgSO_4), 20 pmol of each primer (forward and reverse), and 2 μL of SuperScript[®] III RT/Platinum[®] *Taq* Mix. Reverse transcription reactions were performed at 55°C for 30 min; PCR amplification reactions were performed at 94°C for 2 min for denaturation followed by 40

cycles at 94°C/15 s, 50°C/30 s, and 68°C/1 min, and a final extension at 68°C for 5 min using the thermocycler ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA).

The amplicons were purified by the PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified by Qubit® Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced in both directions with forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyzer Sequencer with the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were assembled using Phred/Phrap/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Sequence identity matrix was performed using the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). Only full-length F gene sequences of CDV were selected for analysis (Table 3), with exception of a partial F gene aa sequence of a Rockborn vaccine strain (GenBank accession number AF026244). A phylogenetic tree based on aa was obtained using the neighbor joining statistical method based on maximum composite likelihood model (MEGA v. 6), which provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates. The GenBank accession numbers of the nucleotides (nt) sequences described in this study are KY057345 to KY057359.

Table 1: Sampling data according to the year of collection and animal age, sex, and health status.

Identification	Sample ^a	Year of collection	Animal data			
			Age (months)	Gender ^{b,c}	Vaccination status ^{d,e,f}	Main clinical signs
BRA/UEL-05/03	Whole Blood	2003	36	F	NV	Weakness of hind limbs, spastic tetraparesis/plegia, ataxia, and nystagmus.
BRA/UEL-13/03	Whole Blood	2003	132	F	NV	Personality change, compulsive walking, ataxia, head pressing, postural reactions deficits, and tetraparesis.
BRA/UEL-15/03	CNS	2003	62	M	V	Weakness of the hind limbs, ataxia, nystagmus, spastic tetraparesis/plegia, and myoclonus.
BRA/UEL-18/03	Whole Blood	2003	21	M	NA	Ataxia, spastic tetraparesis, nystagmu, and postural reactions deficits.
BRA/UEL-16/04	Whole Blood	2004	7	F	V	Compulsive walking, seizure, nystagmus, menace deficit, spastic tetraparesis, and postural reactions deficits.
BRA/UEL-30/04	CNS	2004	55	M	V	Ataxia, head tilt to the right, spastic tetraparesis/plegia, and nystagmus.
BRA/UEL-BLU/13	Urine	2013	96	M	NV	Weakness of hind limbs, ocular discharge, lateral recumbency, and pneumonia.
BRA/UEL-SIM/13	Urine	2013	Adult	M	NA	Head Tilt, spastic tetraparesis, hip dysplasia and pain in cervicothoracic region.
BRA/UEL-MEG/14	CNS	2014	2	F	NV	Ocular discharge, lateral recumbency, excessive vocalization, myoclonus, and dry fur.
BRA/UEL-LLA/14	Urine	2014	21	F	NA	Stupor, ataxia, spastic tetraparesis, decreased nasal mucosal sensitivity, myoclonus, and cervical pain.
BRA/UEL-FRD/15	CNS	2015	2	M	NA	Excessive vocalization, dry eyes, and bloody stools.
BRA/UEL-ZNH/16	Urine	2016	15	M	NV	Weakness of hind limbs, myoclonus, trismu, and enophthalmos.
BRA/UEL-LLK/16	Whole Blood	2016	Adult	F	NV	Ocular discharge, incoordination, myoclonus and weakness of hind limbs.
BRA/UEL-TCO/16	Urine	2016	Adult	M	NV	Pneumonia, lateral recumbency, and otitis.
BRA/UEL-MEL/16	Urine	2016	60	F	V	Spastic tetraparesis/plegia, weakness of hind limbs and pain in cervicothoracic region.

^aCNS: Central Nervous System; ^bM: male; ^cF: female; ^dV: vaccinated; ^eNV: non-vaccinated; ^fNA: not available.

Table 2: Oligonucleotide primers used in the One-Step RT-PCR assay for the amplification of the canine distemper virus full-length F gene.

Primer	Sequence (5' – 3')	Genomic position*	Fragment length (bp)	Reference
CDV-1 Fw	CAGGACATAGCAAGCCA	4856-4872		This study
		5426–	588	[36]
1Rev	AGTTTTATGACCAAGTAC	5444		
		5369–		
2F	TGGGATTATCGGGACTGA	5387	558	[36]
		5909–		
3Rev	GGGCCAAATATTGACAAC	5927		
		5829–		
4F	GTCCCTGCTATGCAACAT	5847	483	[36]
		6293–		
5Rev	GGAGTTCTGGCTACAAATG	6312		
		6270–		[36]
6F	TGTGTATTCGTCTCAGA	6287	797	This study
CDV-7Rev	CTGAGCCCTAAGTTTTCT	7050-7067		

*Genomic position corresponding to the F gene sequence of the Onderstepoort strain (GenBank accession number AF305419).

Results

Phylogenetic analysis of full-length F gene

The deduced aa sequences of the CDV F gene of the 15 Brazilian wild-type strains were aligned with full-length F gene sequences from different geographic regions, to explore their aa profiles. Additionally, potential sequence differences were assessed among vaccine and wild-type strains circulating worldwide.

The full-length F gene deduced aa sequence analysis among representative and this study CDV strains showed the clades Europe 1/South America 1 (EU1/SA1), South America 2

(SA2), Europe 2 (EU2), Asia 1 (AS1), Asia 2 (AS2), North America 1 (NA1), North America 2 (NA2), Rockborn-like and Artic-like (Figure 1A). The comparison of the phylogenetic trees constructed based on the full-length and partial (Fsp region) deduced aa sequences of the F gene revealed a similar pattern of clades, including for the similar bootstrap values (Figure 1B).

Table 3: GenBank accession numbers and origin of the full-length CDV F gene sequences used in phylogenetic analysis.

Origin	Country	Strain	Accession numbers*
Vaccine	UK	Onderstepoort	AF305419
	USA	Onderstepoort	AF378705
America	USA	Snyder Hill	JN896987
	USA	18133	AY964108
	USA	21261	AY964112
	USA	25259	AY964114
	USA	171391-513	KJ123771
	USA	01-2689	AY649446
	USA	164071	EU716337
	Argentina	Benito	KT224731
	Argentina	Pampa	KT224732
	Uruguay	Uy251	KM280689
Europe	Germany	5804P	AY386316
	Italy	CDV2784/2013	KF914669
	Switzerland	A75-17	AF112188
Asia	China	GZ2	JN381189
	China	GN	EF596900
	China	HL	EF596901
	China	SC01	EF596902
	Indian	Ludhiana	LC011102
	Japan	55L	AB475099
	Japan	009L	AB475101
	Japan	50Cbl	AB476403
	Taiwan	TW-TP1	EU191985
	Taiwan	TW-KS15	EU192026
	Thailand	270Lu	AB509346
Africa	Tanzania	Lion94SNP	JN812977

*GenBank

Brazilian CDV strains did not group according to the vaccination status of the animals included in this study. Fourteen wild-type Brazilian strains were closely related to each other, sharing the EU1/SA1 clade. As expected, it was noted two clusters within this clade composed of strains from CDV-positive samples collected among 2003-2004 and 2013-2016. There are two exceptions; the first is the strain BRA/UEL-BLU/13, which clustered together with the strains collected between 2003 and 2004 and the second exception refers to the BRA/UEL-30/04 CDV strain, which is more similar to the European 5804P isolate than to any other Brazilian field strains.

A single CDV strain, BRA/UEL-FRD/15, clustered in the Rockborn-like clade, together with the 25259 strain, a canine CDV strain isolated in the USA [32]. To confirm the result from BRA/UEL-FRD/15, a new aa alignment and phylogenetic tree were realized based on the Fsp region; these analyses included an aa sequence of a Rockborn vaccine strain [23]. The results confirmed the classification of BRA/UEL-FRD/15 as Rockborn-like strain (Figure 2).

The Fsp sequence analysis of the Brazilian wild-type strains among each other showed similarities varying from 86.6% to 100%. The higher divergence (13.4%) was shown between the BRA/UEL-30/04 – BRA/UEL-SIM/13 and BRA/UEL-FRD/15 – BRA/UEL-BLU/13 strains. The comparison of the deduced aa sequences in this study with CDV strains from other countries revealed similarities ranging from 67.4% to 96.2%, with the greater divergence (32.6%) presented with the Italian CDV2784/2013 strain. Most of the aa sequences showed higher similarities (89.6% to 92.5%) with the strain Uruguayan Uy251. The exceptions are the BRA/UEL-30/04 and BRA/UEL-FRD/15, which presented similarities of 91.1% and 96.2% with the strains European 5804P and American 25259, respectively. The alignment of the Fsp region of the samples herein with CDV vaccine strains included in the NA1 clade showed a divergence even higher, with values ranging from 24.5% to 36.3% (Online Resource 1).

When the Fsp aa sequences from Brazilian strains were compared with the Rockborn vaccine strain, lower divergence were obtained, with values varying from 11.2% to 14.9%. The exception was the BRA/UEL-FRD/15, which presented the lowest divergence value (1.5%) with the Rockborn vaccine strain (Online Resource 2).

Differently from the high variation of the Fsp region, the aa sequences of regions F2 and F1 presented results that are more homogeneous. The similarities among Brazilian strains for these two regions were $\geq 96.1\%$. When aligned with wild-type strains from other countries the deduced aa sequence similarities varied from 94.3% to 100% for the F2 and from 94.9% to 99.5% for the F1. Regarding the CDV vaccine strains the similarities were of 93.2% to 98.8% for the F2 (Online Resource 3) and 94.5% to 97.4% for the F1 (Online Resource 4).

Cysteine residues and N-linked glycosylation sites

Seventeen cysteine residues were identified in the full-length F gene of the Brazilian CDV strains in this study, of which 16 were located at same positions of the reference vaccine strains. All the Brazilian wild-type strains presented one additional residue of cysteine at aa position 67 within the Fsp region (Figure 3).

Four glycosylation sites (N-X-S/T) were found in the Fsp region of Brazilian sequences; however, none were conserved among them. The glycosylation sites at positions 62-64 and 76-78 were common to at least one of the vaccine strains analyzed. Two further additional potential sites were identified in this region, one between residues 88-90 (N-H-T) specific of the strain BRA/UEL-MEL/16 and another between residues 108-110 (N-A-T) present in the strains BRA/UEL-30/04 and BRA/UEL-FRD/15 (Figure 3). In the other regions were identified four conserved glycosylation sites, three at positions 141-143, 173-175, and 179-181 within the F2 (Online Resource 5) and one at position 517-519 within the F1 region (Online Resource 6).

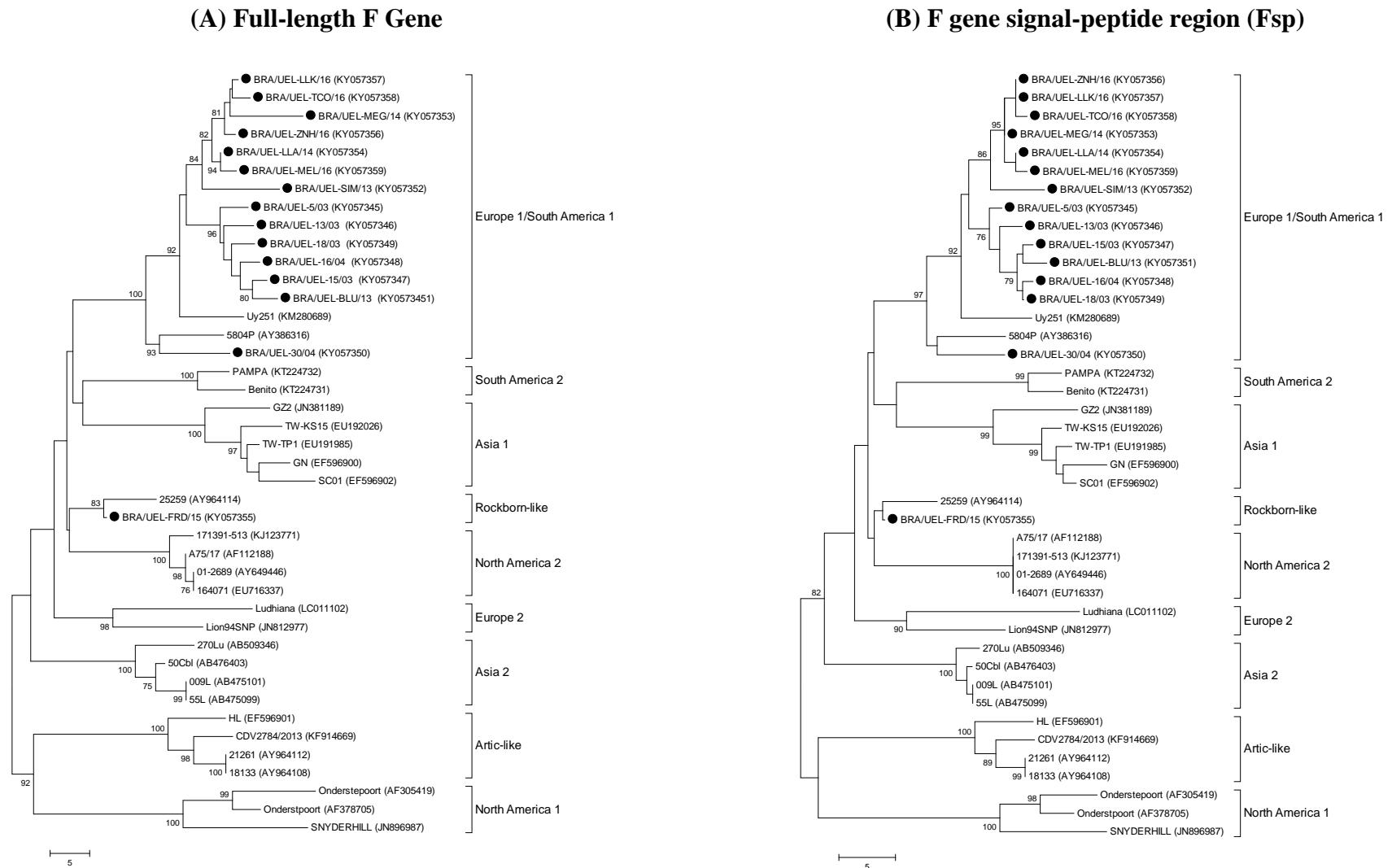


Figure 1. Phylogenetic analysis of deduced amino acid sequences of the full-length F gene (panel A) and on the F gene signal peptide region (Fsp) (panel B) of Brazilian CDV field strains. Neighbor-joining phylogenetic tree construction using the maximum composite likelihood model. Bootstrap values were determined in 1,000 replications; only bootstrap values $\geq 75\%$ are shown. GenBank accession numbers of representative sequences and CDV Brazilian strains (black-filled circles) herein are indicated between parentheses.

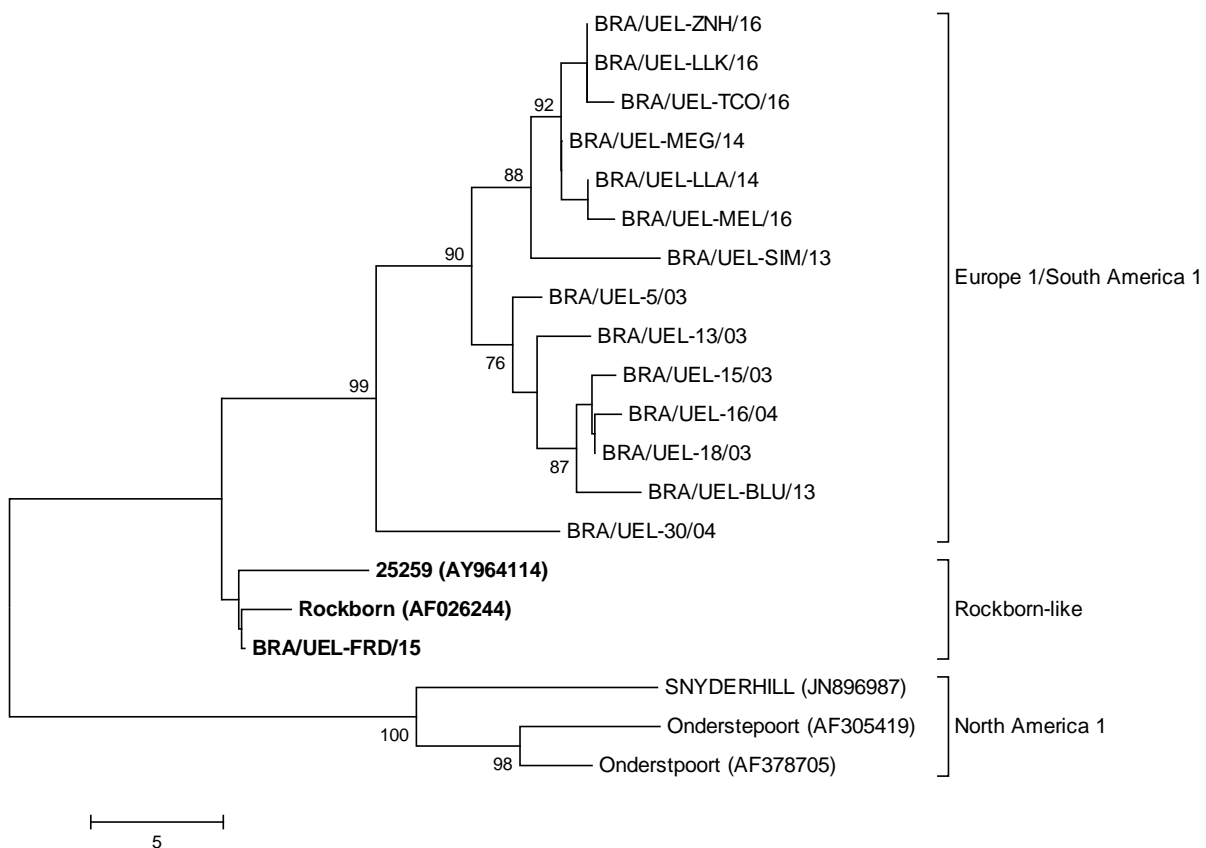


Figure 2. Phylogenetic analysis of deduced amino acid (aa) sequences of F gene signal peptide region (Fsp) with 135 aa of Brazilian, 25259, and vaccine canine distemper virus strains, including the Rockborn vaccine isolate. Neighbor-joining phylogenetic tree construction using the maximum composite likelihood model. Bootstrap values were determined in 1,000 replications; only bootstrap values $\geq 75\%$ are shown. GenBank accession numbers of representative sequences and CDV Brazilian strains herein are indicated between parentheses.

Cleavage sites and hydrophobic regions analysis

The two conserved cleavage sites in the C-terminus of Fsp ($A\downarrow QIHW$) and in the N-terminus of F1 (RRQRR) regions were present in all the Brazilian strains (Online Resource 4).

The FP domain located at the F1 subunit N-terminus was highly conserved in all CDV strains analyzed. However, the TM domain at F1 C-terminus showed aa changes when compared other CDV sequences, including the vaccine strains. A common change to all Brazilian isolates was found at the position 616 ($S \rightarrow I$). Only strain BRA/UEL-30/04 and

BRA/UEL-SIM/13 presented a specific change at position 618 (T→I). Another common change was found at position 621, except for the strain BRA/UEL-30/04 and BRA/UEL-FRD/15, which presented the same aa of the vaccine strains (V → A) (Online Resource 6).

Discussion

In Brazil the available molecular data on CDV strains are based on N and H genes; this study represents the first full-length F gene sequence analysis of CDV from Brazilian wild-type strains. To date, there are only two studies from South America, specifically from Uruguay [41] and Argentina [36] that characterized the full-length CDV F gene. Contemporaneous studies presented the F gene as a useful tool for characterization and classification of the CDV field strains [22, 36, 42].

Phylogenetic analysis in this study revealed the circulation of two lineages of CDV in Brazil, the EU1/SA1 and the Rockborn-like, in agreement with previous H gene-based studies from Brazilian wild-type strains [5, 37]. In accordance to previous studies [5, 29, 42] the predominance of EU1/SA1 lineage strains was herein identified, including the high similarities of the Brazilian CDV aa sequences with the Uruguayan Uy251 and for their clustering in a separate clade of the Argentinean strains, which are classified as SA2. The strain BRA/UEL-30/04 was closely related to European 5804P strain. Although there was no geographical grouping of this strain with the other Brazilian strains, a temporal pattern can be observed. The European 5804P strain was obtained in 2003, after a serial passage of the virulent 5804 strain in domestic ferrets, and the wild-type strain 5804 was isolated in 1989 of a distemper outbreak in a dog shelter in northern Germany [49]. Considering that the strains analyzed in this study were collected up to the year 2016 and that the introduction of the virus in Brazil (the onset of SA1 lineage) was estimated to have taken place in 1989 [9], we can assume that the EU1/SA1

lineage has circulating in Brazilian territories for approximately 25 years.

The Brazilian full-length F gene sequences within the EU1/SA1 clade formed two groups according to the year of collection, revealing a temporal division of the Brazilian strains into past (2003-2004) and contemporaneous (2013-2016) CDV strains. However, the clustering of strains obtained in 2003-2004 with a Brazilian strain of a sample that was collected in 2013 (BRA/UEL-BLU/13) suggests the likely current co-circulation of past and contemporaneous CDV strains. Only BRA/UEL-FRD/15 strain grouped in a phylogenetic clade clearly separated from the other Brazilian strains, presenting the highest aa similarity (96.2%) with the American isolate 25259 [32].

The high genetic identity among strains of this study and European and American strains suggests that CDV in these different geographical regions has a common ancestral origin. A study suggested that current CDV strains emerged in the United States in the 1880s and that this ancestor diversified through time into two ancestral clades, one that spread worldwide and originated eight of current lineages, and the other gave rise to the NA1 lineage, which comprehends most of vaccine strains [31]. The Brazilian territorial extension together with the increasing of the global displacement of animals also support the possibility of concomitant circulation of different CDV lineages in the country [29].

Brazilian CDV strains did not group according to the vaccination status of the animals included in this survey. However, all the wild-type CDV strains herein were distant of the lineage NA1, in which most of the vaccine strains are included. This result is in agreement with other studies that analyzed H and F gene sequences of CDV [24, 29, 36, 37, 42]. The phylogenetic analysis of the full-length F gene was compared with the analysis of its most variable region (Fsp); both phylogenetic trees showed similar classification by grouping the CDV strains analyzed in this study into the same clades. Meanwhile, results revealed 24.5-36.3% of divergence in the Fsp region among the Brazilian CDV field isolates and

Onderstepoort and Snyder Hill vaccine strains; the results of the comparison of Fsp aa sequences of Brazilian strains with the Rockborn vaccine isolate revealed lower divergence (11.2% to 14.9%), suggesting that the Brazilian strains are closely related with the Rockborn vaccine isolate than to the NA1 vaccine strains. These results confirm previous reports that indicated that Fsp-coding region sequence analysis is suitable for evolutionary studies as it allows for straightforward identification of CDV lineages [40, 42, 45]. Conversely of the high deduced aa divergence in the Fsp region, lower variations were verified within F1 and F2 regions; this last had the most conserved aa sequences of the three F gene regions, in agreement to previous studies [22, 45, 48].

Onderstepoort and Snyder Hill strains, designated as NA1, were used for vaccine production in the 1950s and since then these CDV strains have been used in commercial vaccine [7, 26]. The genetic diversity observed among the Brazilian strains in this study, CDV isolates worldwide, and NA1 vaccine strains has raised concerns over a possible alteration in the antigenic profile of new variants that could compromise the immunity elicited by vaccine strains [16, 24, 25, 47]. Repeated attenuation of commercially produced vaccines and the concomitant presence of other viral agents within these vaccines might induce genetic mutations [51] and, consequently, impact the vaccine efficacy. However, the genetic CDV diversity, the interference of maternal antibody, and improper handling of the vaccine were claimed to be possible causes in immunization failures of the current vaccines [17, 34].

Rockborn vaccine strain also was isolated 1950s in primary cells of canine kidney [35]; however this vaccine strain is not within the NA1 clade. This CDV strain was withdrawn from several markets after the mid-1990s due to reports of suspected cases of post-vaccinal encephalitis and the resulting belief that it could be less attenuated and less safe than other CDV strains [5, 26]. Martella et al. [26] suggested that Rockborn-like strains are still available in commercial vaccines. The Fsp phylogenetic analysis revealed that the Brazilian BRA/UEL-

FRD/15 strain grouped together with the 25259 and Rockborn vaccine isolates. The classification of the 25259 isolate as Rockborn-like strain was performed in previous studies based on the H gene [8, 18, 26]. The phylogenetic result and high similarity values among the BRA/UEL-FRD/15 with Rockborn vaccine isolate and 25259 strain (98.5% and 96.2%, respectively) in the present study confirm such classification and include the BRA/UEL-FRD/15 as Rockborn-like strain.

The BRA/UEL-FRD/15 strain was obtained from a two-month-old pup with a limited clinical history access. It was known that this animal had been purchased 15 days before the beginning of clinical signs, which included excessive vocalization, dry eyes, and blood stools, and no vaccination history was available. Based on these data, we formulated three hypotheses. The first considered that the pup was not vaccinated and the reported clinical manifestations were likely due to infection with a wild-type Rockborn-like CDV strain that has circulating in Brazil. The second hypothesis considered that the unvaccinated pup had natural contact with an attenuated Rockborn CDV strain of vaccine origin that converted in the clinical manifestations observed. Finally, the third hypothesis considered that the pup had been vaccinated and presented subsequent post-vaccine encephalitis due to reversal of the Rockborn CDV strain virulence, as previously described [12, 26].

The two cleavage sites of the F gene (A[↓]QIHW and RRQRR) were conserved in all CDV Brazilian strains. The Fsp region cleavage is necessary for the F gene activation and expression on the cell surface. Fsp region is cleaved in an early stage of the F protein processing and is not present in the mature F protein [48]; however, previous reports have demonstrated that some mutations within the Fsp peptide can lead to changes in the fusogenicity of the resulting protein [33, 48].

In this study four non-conserved N-glycosylation sites within the Fsp region of the Brazilian strains were found; two extra N-glycosylation sites were observed in three of the 15

Brazilian CDV strains. Further, an additional cysteine residue (position 67) also was identified in the Brazilian CDV sequences. The N-linked glycosylation of viral envelope proteins plays a number of critical roles in the virus life cycle and in virulence mechanisms, such as binding to cell surface receptors and protecting against neutralization by antibody [19, 27]. The different glycosylation sites of the F proteins suggest that these F proteins have different biological and/or morphological features; however, more studies are needed to evaluate these purposes. Cysteine amino acids are important factors for the intra molecular disulfide bond and the steric structure of protein [36, 45]. This additional residue was also reported by authors who analyzed strains from other countries and is indicative of changes in protein structure [36, 45]. All together, the findings in this study suggest possible alterations in the F gene structure with consequent potential modulation of antigenicity or even virulence of these CDV strains.

The membrane-anchored F1 subunit of paramyxoviruses contains two hydrophobic domains, the FP and TM segments. The FP domain was conserved in all CDV strains of this study; TM domain of the Brazilian strains showed aa changes when compared with the vaccine strains. Hydrophobic FP domains are conserved regions of paramyxovirus fusion-mediating glycoproteins and contain conserved glycine residues that appear to have a primary role in regulating the activation of the metastable native form of F gene and the fusion activation [38, 39]. The TM anchors the protein in the cell membrane; modifications in this domain can result in modulation of viral fusion protein activity, including impairment of fusion pore opening, enlargement, or alterations of fusion promotion efficiency [3, 28]. Further studies based on the full-length F gene are needed to better elucidate the relationship of the variability of the TM domains in CDV fusion process.

The present study is the first to analyze the full-length F gene of CDV wild-type strains of domestic dogs in Brazil. The results herein indicate co-circulation of two CDV lineages (EU1/SA1 and Rockborn-like) in the country and suggested that the EU1/SA1 has circulating

in Brazil for 25 years. It also was demonstrated the co-circulation of past and contemporaneous CDV strains in the country, since CDV Brazilian strains analyzed present approximately 10 years of difference in the date of collection. The CDV wild-type strains described in this study presented variability of the F gene when compared to vaccine strains. However, comparisons of the F_{sp} regions of Brazilian strains with vaccine isolates revealed that the strains in this study are more similar to the Rockborn than to the NA1 vaccine isolates. Thus, we conclude that the F gene diversity is useful to investigate the molecular diversity of CDV, providing complementary information to understand epidemiology of the virus. Further studies based on the full-length F gene analyses of the CDV strains should be conducted to improve knowledge on the biological roles of this protein.

References

1. Amude AM, Carvalho GdA, Alfieri AA, Alfieri AF (2007) Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Braz J Microbiol* 38:354-356. doi: 10.1590/S1517-83822007000200031
2. Bae CW, Lee JB, Park SY, Song CS, Lee NH, Seo KH, Kang YS, Park CK, Choi IS (2013) Deduced sequences of the membrane fusion and attachment proteins of canine distemper viruses isolated from dogs and wild animals in Korea. *Virus Genes* 47:56-65. doi: 10.1007/s11262-013-0916-0
3. Bissonnette ML, Donald JE, DeGrado WF, Jardetzky TS, Lamb RA (2009) Functional analysis of the transmembrane domain in paramyxovirus F protein-mediated membrane fusion. *J Mol Biol* 386:14-36. doi: 10.1016/j.jmb.2008.12.029
4. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495-503. doi: 0095-1137/90/030495-09\$02.00/0
5. Budaszewski Rda F, Pinto LD, Weber MN, Caldart ET, Alves CD, Martella V, Ikuta N, Lunge VR, Canal CW (2014) Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Res* 180:76-83. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.024
6. Castilho JG, Brandão PE, Carnieli Jr P, Oliveira RN, Macedo CI, Peixoto ZMP, Carrieri ML, Kotait I (2007) Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec* 59:654-659. doi: 10.1590/S0102-09352007000300016
7. Demeter Z, Palade EA, Hornyak A, Rusvai M (2010) Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet Microbiol* 142:420-426. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.10.017

8. Espinal MA, Diaz FJ, Ruiz-Saenz J (2014) Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet Microbiol* 172:168-176. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.019
9. Fischer CD, Graf T, Ikuta N, Lehmann FK, Passos DT, Makiejczuk A, Silveira MA, Jr., Fonseca AS, Canal CW, Lunge VR (2016) Phylogenetic analysis of canine distemper virus in South America clade 1 reveals unique molecular signatures of the local epidemic. *Infect Genet Evol* 41:135-141. doi: 10.1016/j.meegid.2016.03.029
10. Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgartner W (1999) Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol* 37:3634-3643. doi: 0095-1137/99/\$04.0010
11. Greene CE, Vandeveld (2012) Canine Distemper. In: Greene CE (ed) *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th (edn). Elsevier, Saint Louis, pp 25-42
12. Hartley WJ (1974) A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Vet Pathol* 11:301-312. doi: 10.1177/030098587401100403
13. Headley SA, Graça DL (2000) Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. *Braz J Vet Res Anim Sci* 37:00-00. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33n5p1945
14. Headley SA, Amude AM, Alfieri AF, Bracarense APFRL, Alfieri AA (2012) Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus induced infections in Brazil: a review. *Semina Cienc Agrar* 33:1945–1978. doi: 10.1590/S1413-95962000000200009
15. Hiram K, Togashi K, Wakasa C, Yoneda M, Nishi T, Endo Y, Miura R, Tsukiyama-Kohara K, Kai C (2003) Cytotoxic T-lymphocyte activity specific for hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus in dogs. *J Vet Med Sci* 65:109-112. doi:

16. Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T, Kai C (2000) Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet Microbiol* 71:281-286. doi: 0378-1135/00/\$
17. Kapil S, Yeary TJ (2011) Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 41:1069-1086. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.08.005
18. Ke GM, Ho CH, Chiang MJ, Sanno-Duanda B, Chung CS, Lin MY, Shi YY, Yang MH, Tyan YC, Liao PC, Chu PY (2015) Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Vet Res* 11:164. doi: 10.1186/s12917-015-0491-9
19. Kim JM, Yun SI, Song BH, Hahn YS, Lee CH, Oh HW, Lee YM (2008) A single N-linked glycosylation site in the Japanese encephalitis virus prM protein is critical for cell type-specific prM protein biogenesis, virus particle release, and pathogenicity in mice. *J Virol* 82:7846-7862. doi: 10.1128/jvi.00789-08
20. Lamb RA, Parks GD (2013) Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields Virology*, 6th (edn). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, pp 957-995
21. Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S (2006) Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet Microbiol* 115:32-42. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.01.010
22. Lee MS, Tsai KJ, Chen LH, Chen CY, Liu YP, Chang CC, Lee SH, Hsu WL (2010) The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Vet J* 183:184-190. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.10.001
23. Liermann H, Harder TC, Lochelt M, Von Messling V, Baumgartner W, Moennig V, Haas L (1998) Genetic analysis of the central untranslated genome region and the proximal

coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper morbilliviruses. *Virus Genes* 17:259-270. doi: 10.1023/a:1008069805011

24. Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkron-Moller M, Carmichael LE, Buonavoglia C (2006) Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol* 116:301-309. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.019
25. Martella V, Elia G, Buonavoglia C (2008) Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 38:787-797, vii-viii. doi: 10.1016/j.cvsm.2008.02.007
26. Martella V, Blixenkron-Moller M, Elia G, Lucente MS, Cirone F, Decaro N, Nielsen L, Banyai K, Carmichael LE, Buonavoglia C (2011) Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine* 29:1222-1227. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.001
27. Moeller-Ehrlich K, Ludlow M, Beschorner R, Meyermann R, Rima BK, Duprex WP, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J (2007) Two functionally linked amino acids in the stem 2 region of measles virus haemagglutinin determine infectivity and virulence in the rodent central nervous system. *J Gen Virol* 88:3112-3120. doi: 10.1099/vir.0.83235-0
28. Muhlebach MD, Leonard VH, Cattaneo R (2008) The measles virus fusion protein transmembrane region modulates availability of an active glycoprotein complex and fusion efficiency. *J Virol* 82:11437-11445. doi: 10.1128/jvi.00779-08
29. Negrão FJ, Gardinali NR, Headley SA, Alfieri AA, Fernandez MA, Alfieri AF (2013) Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. *Genet Mol Res* 12:2549-2555. doi: 10.4238/2013.March.11.2
30. Panzera Y, Calderon MG, Sarute N, Guasco S, Cardeillac A, Bonilla B, Hernandez M, Francia L, Bedo G, La Torre J, Perez R (2012) Evidence of two co-circulating genetic

lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res* 163:401-404. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.008

31. Panzera Y, Sarute N, Iraola G, Hernandez M, Perez R (2015) Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. *Mol Phylogenet Evol* 92:147-154. doi: 10.1016/j.ympev.2015.06.015
32. Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB (2005) Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J Clin Microbiol* 43:5009-5017. doi: 10.1128/jcm.43.10.5009-5017.2005
33. Plattet P, Cherpillod P, Wiener D, Zipperle L, Vandeveld M, Wittek R, Zurbriggen A (2007) Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J Virol* 81:11413-11425. doi: 10.1128/jvi.01287-07
34. Riley MC, Wilkes RP (2015) Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Viol J* 12:219. doi: 10.1186/s12985-015-0445-7
35. Rockborn G (1958) Canine distemper virus in tissue culture. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 8:485-492. doi: 10.1007/bf01243067
36. Romanutti C, Gallo Calderon M, Keller L, Mattion N, La Torre J (2016) RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine Distemper Virus from domestic dogs. *J Virol Methods* 228:79-83. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.11.011
37. Rosa GN, Domingues HG, Santos MMABd, Felipe PAN, Spilki FR, Arns CW (2012) Molecular detection and phylogenetic analysis of the gene H from canine distemper virus isolates circulating at the municipality of Campinas, São Paulo. *Pesq Vet Bras* 32:72-77. doi: 10.1590/S0100-736X2012000100012

38. Russell CJ, Jardetzky TS, Lamb RA (2001) Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *EMBO J* 20:4024-4034. doi: 10.1093/emboj/20.15.4024
39. Russell CJ, Jardetzky TS, Lamb RA (2004) Conserved glycine residues in the fusion peptide of the paramyxovirus fusion protein regulate activation of the native state. *J Virol* 78:13727-13742. doi: 10.1128/jvi.78.24.13727-13742.2004
40. Sarute N, Calderon MG, Perez R, La Torre J, Hernandez M, Francia L, Panzera Y (2013) The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. *PLoS One* 8:e63595. doi: 10.1371/journal.pone.0063595
41. Sarute N, Delgado MV, Carrau L, Benech A, Francia L, Pérez R, Panzera Y (2014) First genome sequence of a canine distemper virus strain from South America. *Genome Announcements* 2:e01009-01014. doi: 10.1128/genomeA.01009-14
42. Sarute N, Perez R, Aldaz J, Alfieri AA, Alfieri AF, Name D, Llanes J, Hernandez M, Francia L, Panzera Y (2014) Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes* 48:474-478. doi: 10.1007/s11262-014-1054-z
43. Sawatsky B, von Messling V (2010) Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J Virol* 84:2753-2761. doi: 10.1128/jvi.01813-09
44. Scheid A, Choppin PW (1977) Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* 80:54-66. doi:
45. Sultan S, Charoenvisal N, Lan NT, Yamaguchi R, Maeda K, Kai K (2009) The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper viruses. *Virol J* 6:157. doi: 10.1186/1743-422x-6-157

46. Swati, Deka D, Uppal SK, Verma R (2015) Isolation and phylogenetic characterization of Canine distemper virus from India. *Virusdisease* 26:133-140. doi: 10.1007/s13337-015-0256-x
47. Uema M, Ohashi K, Wakasa C, Kai C (2005) Phylogenetic and restriction fragment length polymorphism analyses of hemagglutinin (H) protein of canine distemper virus isolates from domestic dogs in Japan. *Virus Res* 109:59-63. doi: 10.1016/j.virusres.2004.10.008
48. von Messling V, Cattaneo R (2002) Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J Virol* 76:4172-4180. doi: 10.1128/JVI.76.9.4172-4180.2002
49. von Messling V, Springfield C, Devaux P, Cattaneo R (2003) A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J Virol* 77:12579-12591. doi: 10.1128/JVI.77.23.12579-12591.2003
50. Wild TF, Buckland R (1997) Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J Gen Virol* 78 (Pt 1):107-111. doi: 10.1099/0022-1317-78-1-107
51. Woma TY, van Vuuren M, Bosman AM, Quan M, Oosthuizen M (2010) Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet Microbiol* 143:126-132. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.11.01

5 CONCLUSÕES

- Foi possível amplificar e sequenciar o gene de fusão completo das cepas brasileiras de CDV selecionadas para este estudo;
- Existe cocirculação de cepas de CDV antigas (2003-2004) e contemporâneas (2013-2016) no Brasil;
- A análise filogenética do gene F completo das cepas brasileiras indica a circulação de duas linhagens de CDV (EU1 / SA1 e Rockborn-like) e a presença da linhagem EU1 / SA1 há pelo menos 25 anos no país.
- As cepas brasileiras de CDV são mais semelhantes à cepa vacinal Rockborn do que com isolados vacinais da linhagem NA1.
- A diversidade genética do gene F é útil para investigar a diversidade molecular de cepas de CDV, fornecendo informações complementares que auxiliam compreender a epidemiologia do vírus.
- A região Fsp é a mais variável do gene F do genoma de CDV e permite a classificação de cepas de campo do vírus.
- Estudos adicionais baseados nas análises completas do gene F das cepas CDV devem ser conduzidos para melhorar o conhecimento sobre os papéis biológicos desta proteína.

APÊNDICES

APÊNDICE A

	Percentage of divergence																											
	1	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	
Onderstepoort (AF305419)	1	ID	6.0	14.1	34.1	26.7	31.9	35.6	34.1	32.6	30.4	34.9	34.1	34.9	35.6	34.1	34.9	34.1	34.1	35.6	36.3	34.1	34.9	26.0	34.1	34.1	34.9	34.9
Onderstepoort (AF378705)	2	94	ID	11.2	32.6	25.2	30.4	34.1	31.9	31.9	30.4	34.9	31.9	32.6	33.4	31.2	32.6	31.9	32.6	32.6	34.9	32.6	33.4	24.5	32.6	32.6	33.4	33.4
SNYDERHILL (JN896987)	3	85.9	88.8	ID	35.6	28.2	32.6	62.9	33.4	34.1	35.6	34.1	32.6	34.9	35.6	32.6	34.1	33.4	34.1	33.4	36.3	34.1	34.9	27.5	34.1	34.1	34.9	34.9
UY251 (KM280689)	4	65.9	67.4	64.4	ID	15.6	23.8	22.3	22.3	12.6	18.6	26.0	30.4	7.5	8.9	9.7	8.2	8.9	12.6	10.4	10.4	7.5	8.2	12.6	8.2	8.2	8.9	8.9
25259 (AY964114)	5	73.3	74.8	71.8	84.4	ID	16.3	20.0	16.3	12.6	13.4	22.3	20.8	14.1	15.6	14.9	14.9	14.1	12.6	17.1	16.3	13.4	14.1	3.8	14.1	14.1	14.9	14.9
55L (AB475099)	6	68.1	69.6	67.4	76.2	83.7	ID	28.2	24.5	20.8	20.8	27.5	26.0	20.0	22.3	23.0	23.0	22.3	20.0	23.8	24.5	21.5	22.3	14.1	21.5	21.5	22.3	23.0
SC01 (EF596902)	7	64.4	65.9	62.9	77.7	80	71.8	ID	20.8	20.0	22.3	30.4	32.6	22.3	22.3	24.5	23.8	23.8	22.3	25.2	22.3	21.5	22.3	16.3	22.3	22.3	23.0	23.0
PAMPA (KT224732)	8	65.9	68.1	66.6	77.7	83.7	75.5	79.2	ID	21.5	21.5	30.4	29.7	21.5	21.5	21.5	23.0	22.3	20.8	22.3	22.3	21.5	22.3	14.1	22.3	22.3	23.0	23.0
5804P (AY386316)	9	67.4	68.1	65.9	87.4	87.4	79.2	80	78.5	ID	17.8	25.2	29.7	10.4	11.9	11.2	11.2	10.4	8.9	13.4	12.6	10.4	11.2	8.9	11.2	11.2	11.9	11.9
A75-17 (AF164967)	10	69.6	69.6	64.4	81.4	86.6	79.2	77.7	78.5	82.2	ID	25.2	27.5	19.3	20.8	20.0	20.0	19.3	18.6	22.3	21.5	18.6	19.3	9.7	19.3	19.3	20.0	20.0
LUDHIANA (LC011102)	11	65.1	65.1	65.9	74	77.7	72.5	69.6	69.6	74.8	74.8	ID	31.2	23.8	25.2	26.7	26.0	26.0	23.8	27.5	26.7	24.5	25.2	19.3	25.2	25.2	26.0	26.0
CDV2784/2013 (KF914669)	12	65.9	68.1	67.4	69.6	79.2	74	67.4	70.3	70.3	72.5	68.8	ID	30.4	31.2	31.9	32.6	31.9	28.9	31.9	32.6	29.7	28.9	21.5	29.7	29.7	30.4	29.7
BRA/UEL-5/03 (KY057345)	13	65.1	67.4	65.1	92.5	85.9	80	77.7	78.5	89.6	80.7	76.2	69.6	ID	3.0	3.8	3.8	3.0	8.2	4.5	7.5	4.5	5.2	10.4	5.2	5.2	6.0	6.0
BRA/UEL-13/03 (KY057346)	14	64.4	66.6	64.4	91.1	84.4	77.7	77.7	78.5	88.1	79.2	74.8	68.8	97	ID	3.8	3.8	3.0	11.2	4.5	7.5	6.0	6.7	11.9	6.7	6.7	7.5	7.5
BRA/UEL-15/03 (KY057347)	15	65.9	68.8	67.4	90.3	85.1	77	75.5	78.5	88.8	80	73.3	68.1	96.2	96.2	ID	0.5	0.8	11.9	2.3	9.7	6.7	7.5	11.2	7.5	7.5	8.2	8.2
BRA/UEL-16/04 (KY057348)	16	65.1	67.4	65.9	91.8	85.1	77	76.2	77	88.8	80	74	67.4	96.2	96.2	98.5	ID	0.8	11.9	3.8	9.7	6.7	7.5	11.2	7.5	7.5	8.2	8.2
BRA/UEL-18/03 (KY057349)	17	65.9	68.1	66.6	91.1	85.9	77.7	76.2	77.7	89.6	80.7	74	68.1	97	97	99.2	99.2	ID	11.2	3.0	8.9	6.0	6.7	10.4	6.7	6.7	7.5	7.5
BRA/UEL-30/04 (KY057350)	18	65.9	67.4	65.9	87.4	87.4	80	77.7	79.2	91.1	81.4	76.2	71.1	91.8	88.8	88.1	88.1	88.8	ID	12.6	13.4	10.4	11.2	9.7	11.2	11.2	11.9	11.9
BRA/UEL-BLU/13 (KY057351)	19	64.4	67.4	66.6	89.6	82.9	76.2	74.8	77.7	86.6	77.7	72.5	68.1	95.5	95.5	97.7	96.2	97	87.4	ID	10.4	7.5	7.5	13.4	8.2	8.2	8.9	8.2
BRA/UEL-SIM/13 (KY057352)	20	63.7	65.1	63.7	89.6	83.7	75.5	77.7	77.7	87.4	78.5	73.3	67.4	92.5	92.5	90.3	90.3	91.1	86.6	89.6	ID	4.5	5.2	12.6	5.2	5.2	6.0	6.0
BRA/UEL-MEG/14 (KY057353)	21	65.9	67.4	65.9	92.5	86.6	78.5	78.5	78.5	89.6	81.4	75.5	70.3	95.5	94	93.3	93.3	94	89.6	92.5	95.5	ID	0.8	9.7	0.8	0.8	0.5	0.5
BRA/UEL-LLA/14 (KY057354)	22	65.1	66.6	65.1	91.8	85.9	77.7	77.7	77.7	88.8	80.7	74.8	71.1	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	92.5	94.8	99.2	ID	10.4	0.5	0.5	2.3	0.8
BRA/UEL-FRD/15 (KY057355)	23	74	75.5	72.5	87.4	96.2	85.9	83.7	85.9	91.1	90.3	80.7	78.5	89.6	88.1	88.8	88.8	89.6	90.3	86.6	87.4	90.3	89.6	ID	10.4	10.4	11.2	11.2
BRA/UEL-ZNH/16 (KY057356)	24	65.9	67.4	65.9	91.8	85.9	78.5	77.7	77.7	88.8	80.7	74.8	70.3	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	91.8	94.8	99.2	98.5	89.6	ID	0.0	0.8	2.3
BRA/UEL-LLK/16 (KY057357)	25	65.9	67.4	65.9	91.8	85.9	78.5	77.7	77.7	88.8	80.7	74.8	70.3	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	91.8	94.8	99.2	98.5	89.6	100	ID	0.8	2.3
BRA/UEL-TCO/16 (KY057358)	26	65.1	66.6	65.1	91.1	85.1	77.7	77	77	88.1	80	74	69.6	94	92.5	91.8	91.8	92.5	88.1	91.1	94	98.5	97.7	88.8	99.2	99.2	ID	3.0
BRA/UEL-MEL/16 (KY057359)	27	65.1	66.6	65.1	91.1	85.1	77	77	77	88.1	80	74	70.3	94	92.5	91.8	91.8	92.5	88.1	91.8	94	98.5	99.2	88.8	97.7	97.7	97	ID
	1	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	
	Percentage of similarity																											

Online Resource 1. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F gene signal peptide region (Fsp).

APÊNDICE B

		Percentage of divergence																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Onderstepoort (AF305419)	1	ID	6.0	14.1	24.5	26.7	34.9	35.6	34.1	34.9	34.1	34.1	35.6	36.3	34.1	34.9	26	34.1	34.1	34.9	34.9
Onderstpoort (AF378705)	2	94	ID	11.2	23	26.8	32.6	33.4	31.2	32.6	31.9	32.6	32.6	34.9	32.6	33.4	24.5	32.6	32.6	33.4	33.4
SNYDERHILL (JN896987)	3	85.9	88.8	ID	26	28.2	34.9	35.6	32.6	34.1	33.4	34.1	33.4	36.3	34.1	34.9	27.5	34.1	34.1	34.9	34.9
Rockborn (AF026244)	4	75.5	77	74	ID	5.2	11.9	13.4	12.6	12.6	11.9	11.2	14.9	14.1	11.2	11.9	1.5	11.9	11.9	12.6	12.6
25259 (AY964114)	5	73.3	74.8	71.8	94.8	ID	14.1	15.6	14.9	14.9	14.1	12.6	17.1	16.3	13.4	14.1	3.8	14.1	14.1	14.9	14.9
BRA/UEL-5/03 (KY057345)	6	65.1	67.4	65.1	88.1	85.9	ID	3.0	3.8	3.8	3.0	8.2	4.5	7.5	4.5	5.2	10.4	5.2	5.2	6.0	6.0
BRA/UEL-13/03 (KY057346)	7	64.4	66.6	64.4	86.6	84.4	97	ID	3.8	3.8	3.0	11.2	4.5	7.5	6.0	6.7	11.9	6.7	6.7	7.5	7.5
BRA/UEL-15/03 (KY057347)	8	65.9	68.8	67.4	87.4	85.1	96.2	96.2	ID	1.5	0.8	11.9	2.3	9.7	6.7	7.5	11.2	7.5	7.5	8.2	8.2
BRA/UEL-16/04 (KY057348)	9	65.1	67.4	65.9	87.4	85.1	96.2	96.2	98.5	ID	0.8	11.9	3.8	9.7	6.7	7.5	11.2	7.5	7.5	8.2	8.2
BRA/UEL-18/03 (KY057349)	10	65.9	68.1	66.6	88.1	85.9	97	97	99.2	99.2	ID	11.2	3.0	8.9	6.0	6.7	10.4	6.7	6.7	7.5	7.5
BRA/UEL-30/04 (KY057350)	11	65.9	67.4	65.9	88.8	87.4	91.8	88.8	88.1	88.1	88.8	ID	12.6	13.4	10.4	11.2	9.7	11.2	11.2	11.9	11.9
BRA/UEL-BLU/13 (KY057351)	12	64.4	67.4	66.6	85.1	82.9	95.5	95.5	97.7	96.2	97	87.4	ID	10.4	7.5	7.5	13.4	8.2	8.2	8.9	8.2
BRA/UEL-SIM/13 (KY057352)	13	63.7	65.1	63.7	85.9	83.7	92.5	92.5	90.3	90.3	91.1	86.6	89.6	ID	4.5	5.2	12.6	5.2	5.2	6.0	6.0
BRA/UEL-MEG/14 (KY057353)	14	65.9	67.4	65.9	88.8	86.6	95.5	94	93.3	93.3	94	89.6	92.5	95.5	ID	0.8	9.7	0.8	0.8	1.5	1.5
BRA/UEL-LLA/14 (KY057354)	15	65.1	66.6	65.1	88.1	85.9	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	92.5	94.8	99.2	ID	10.4	1.5	1.5	2.3	0.8
BRA/UEL-FRD/15 (KY057355)	16	74	75.5	72.5	98.5	96.2	89.6	88.1	88.8	88.8	89.6	90.3	86.6	87.4	90.3	89.6	ID	10.4	10.4	11.2	11.2
BRA/UEL-ZNH/16 (KY057356)	17	65.9	67.4	65.9	88.1	85.9	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	91.8	94.8	99.2	98.5	89.6	ID	0.0	0.8	2.3
BRA/UEL-LLK/16 (KY057357)	18	65.9	67.4	65.9	88.1	85.9	94.8	93.3	92.5	92.5	93.3	88.8	91.8	94.8	99.2	98.5	89.6	100	ID	0.8	2.3
BRA/UEL-TCO/16 (KY057358)	19	65.1	66.6	65.1	87.4	85.1	94	92.5	91.8	91.8	92.5	88.1	91.1	94	98.5	97.7	88.8	99.2	99.2	ID	3.0
BRA/UEL-MEL/16 (KY057359)	20	65.1	66.6	65.1	87.4	85.1	94	92.5	91.8	91.8	92.5	88.1	91.8	94	98.5	99.2	88.8	97.7	97.7	97	ID
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
		Percentage of similarity																			

Online Resource 2. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences of deduced amino acid sequences of F gene signal peptide region (Fsp) with 135 aa of Brazilian, 25259, and vaccine CDV strains, including the Rockborn vaccine isolate.

APÊNDICE C

		Percentage of divergence																								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Onderstepoort (AF305419)	1	ID	1.2	4.5	3.4	2.3	5.7	5.7	2.3	4.5	2.3	3.4	2.3	3.4	3.4	4.5	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	2.3	3.4	3.4
Onderstepoort (AF378705)	2	98.8	ID	3.4	2.3	1.2	4.5	4.5	1.2	3.4	1.2	2.3	1.2	2.3	2.3	2.3	3.4	3.4	2.3	2.3	2.3	3.4	2.3	1.2	3.4	3.4
SNYDERHILL (JN896987)	3	95.5	96.6	ID	5.7	4.5	6.8	7.9	4.5	6.8	4.5	5.7	4.5	5.7	5.7	6.8	6.8	5.7	5.7	5.7	6.8	5.7	4.5	6.8	6.8	
UY251 (KM280689)	4	96.6	97.7	94.3	ID	1.2	2.3	4.5	2.3	1.2	1.2	3.4	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	
25259 (AY964114)	5	97.7	98.8	95.5	98.8	ID	3.4	3.4	1.2	2.3	0.0	2.3	0.0	1.2	1.2	1.2	2.3	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	1.2	0.0	2.3	2.3
55L (AB475099)	6	94.3	95.5	93.2	97.7	96.6	ID	6.8	4.5	3.4	3.4	5.7	3.4	2.3	2.3	2.3	3.4	3.4	2.3	2.3	2.3	3.4	2.3	3.4	3.4	3.4
SC01 (EF596902)	7	94.3	95.5	92.1	95.5	96.6	93.2	ID	4.5	5.7	3.4	5.7	3.4	4.5	4.5	4.5	5.7	5.7	4.5	4.5	4.5	5.7	4.5	3.4	5.7	5.7
PAMPA (KT224732)	8	97.7	98.8	95.5	97.7	98.8	95.5	95.5	ID	3.4	1.2	1.2	1.2	2.3	2.3	2.3	3.4	3.4	2.3	2.3	2.3	3.4	2.3	1.2	3.4	3.4
5804P (AY386316)	9	95.5	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	ID	2.3	4.5	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	1.2	2.3	2.3	2.3
A75-17 (AF164967)	10	97.7	98.8	95.5	98.8	100	96.6	96.6	98.8	97.7	ID	2.3	0.0	1.2	1.2	1.2	2.3	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	1.2	0.0	2.3	2.3
LUDHIANA (LC011102)	11	96.6	97.7	94.3	96.6	97.7	94.3	94.3	98.8	95.5	97.7	ID	2.3	3.4	3.4	3.4	4.5	4.5	3.4	3.4	3.4	4.5	3.4	2.3	4.5	4.5
CDV2784/2013 (KF914669)	12	97.7	98.8	95.5	98.8	100	96.6	96.6	98.8	97.7	100	97.7	ID	1.2	1.2	1.2	2.3	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	1.2	0.0	2.3	2.3
BRA/UEL-5/03 (KY057345)	13	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	ID	0.0	0.0	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-13/03 (KY057346)	14	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	ID	0.0	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-15/03 (KY057347)	15	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	100	ID	1.2	1.2	0.0	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-16/04 (KY057348)	16	95.5	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	ID	2.3	1.2	1.2	1.2	2.3	1.2	2.3	2.3	2.3
BRA/UEL-18/03 (KY057349)	17	96.6	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	ID	1.2	1.2	1.2	0.0	1.2	2.3	0.0	0.0
BRA/UEL-30/04 (KY057350)	18	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	100	100	98.8	98.8	ID	0.0	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-BLU/13 (KY057351)	19	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	100	100	98.8	98.8	100	ID	0.0	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-SIM/13 (KY057352)	20	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	100	100	98.8	98.8	100	100	ID	1.2	0.0	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-MEG/14 (KY057353)	21	96.6	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	100	98.8	98.8	98.8	ID	1.2	2.3	0.0	0.0
BRA/UEL-LLA/14 (KY057354)	22	96.6	97.7	94.3	100	98.8	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	96.6	98.8	100	100	100	98.8	98.8	100	100	100	98.8	ID	1.2	1.2	1.2
BRA/UEL-FRD/15 (KY057355)	23	97.7	98.8	95.5	98.8	100	96.6	96.6	98.8	97.7	100	97.7	100	98.8	98.8	98.8	97.7	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	98.8	ID	2.3	2.3
BRA/UEL-ZNH/16 (KY057356)	24	96.6	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	100	98.8	98.8	98.8	100	98.8	97.7	ID	0.0
BRA/UEL-LLK/16 (KY057357)	25	96.6	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	100	98.8	98.8	98.8	100	98.8	97.7	100	ID
BRA/UEL-TCO/16 (KY057358)	26	96.6	96.6	93.2	98.8	97.7	96.6	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	100	98.8	98.8	98.8	100	98.8	97.7	100	100
BRA/UEL-MEL/16 (KY057359)	27	95.5	96.6	94.3	98.8	97.7	97.7	94.3	96.6	97.7	97.7	95.5	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	97.7	98.8	98.8	98.8	97.7	98.8	97.7	97.7	97.7
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
		Percentage of similarity																								

Online Resource 3. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F2 region of F gene.

APÊNDICE D

		Percentage of divergence																										
		1	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
Onderstepoort (AF305419)	1	ID	1.2	2.6	3.7	3.5	3.2	4.6	3.5	3.7	3.5	3.5	3.7	4.8	4.6	4.8	4.4	4.6	4.2	4.8	4.8	5.5	3.7	3.5	3.9	4.2	4.2	3.7
Onderstepoort (AF378705)	2	98.8	ID	1.4	2.8	2.6	2.3	3.7	2.6	2.8	2.6	2.6	2.8	3.9	3.7	3.9	3.5	3.7	3.2	3.9	3.9	4.6	2.8	2.6	3.0	3.2	3.2	2.8
SNYDERHILL (JN896987)	3	97.4	98.6	ID	3.2	2.6	2.3	3.0	2.6	2.8	2.6	2.6	2.3	3.9	3.7	3.9	3.5	3.7	3.2	3.9	4.2	5.1	3.2	2.6	3.5	3.7	3.7	3.2
UY251 (KM280689)	4	96.3	97.2	96.8	ID	2.6	2.8	3.7	1.6	1.4	1.6	2.1	3.2	1.6	1.4	1.6	1.2	1.4	1.9	1.6	1.6	2.8	0.5	2.1	0.7	1.0	1.0	0.5
25259 (AY964114)	5	96.5	97.4	97.4	97.4	ID	1.9	3.0	1.9	2.6	1.9	1.9	2.1	3.7	3.5	3.2	3.2	3.5	3.0	3.2	3.7	4.4	2.6	0.5	2.8	3.0	3.0	2.6
55L (AB475099)	6	96.8	97.7	97.7	97.2	98.1	ID	3.5	2.1	2.8	2.1	2.1	2.3	3.5	3.2	3.2	3.0	3.2	3.2	3.9	4.6	2.8	1.9	3.0	3.2	3.2	2.8	
SC01 (EF596902)	7	95.4	96.3	97.0	96.3	97.0	96.5	ID	3.0	3.7	3.0	3.0	3.9	4.8	4.6	4.4	4.4	4.6	4.2	4.4	4.4	5.1	3.7	2.6	3.9	4.2	4.2	3.7
PAMPA (KT224732)	8	96.5	97.4	97.4	98.4	98.1	97.9	97.0	ID	1.6	1.4	1.4	2.6	2.8	2.6	2.8	2.3	2.6	2.1	2.8	2.8	3.5	1.6	1.4	1.9	2.1	2.1	1.6
5804P (AY386316)	9	96.3	97.2	97.2	98.6	97.4	97.2	96.3	98.4	ID	1.9	2.1	3.2	1.6	1.4	1.6	1.2	1.4	1.0	1.6	2.1	2.8	1.0	2.1	1.2	1.4	1.4	1.0
A75-17 (AF164967)	10	96.5	97.4	97.4	98.4	98.1	97.9	97.0	98.6	98.1	ID	1.4	2.6	2.8	2.6	2.8	2.3	2.6	2.6	2.8	2.8	3.9	1.6	1.4	1.9	2.1	2.1	1.6
LUDHIANA (LC011102)	11	96.5	97.4	97.4	97.9	98.1	97.9	97.0	98.6	97.9	98.6	ID	2.6	3.2	3.0	3.2	2.8	3.0	2.6	3.2	3.2	3.9	2.1	1.4	2.3	2.6	2.6	2.1
CDV2784/2013 (KF914669)	12	96.3	97.2	97.7	96.8	97.9	97.7	96.1	97.4	96.8	97.4	97.4	ID	4.4	4.2	4.4	3.9	4.2	3.5	4.4	3.9	5.1	3.2	2.6	3.5	3.7	3.7	3.2
BRA/UEL-5/03 (KY057345)	13	95.2	96.1	96.1	98.4	96.3	96.5	95.2	97.2	98.4	97.2	96.8	95.6	ID	0.7	1.0	0.5	1.2	2.1	1.0	2.3	3.5	1.2	3.2	1.4	1.6	1.6	1.2
BRA/UEL-13/03 (KY057346)	14	95.4	96.3	96.3	98.6	96.5	96.8	95.4	97.4	98.6	97.4	97.0	95.8	99.3	ID	0.7	0.3	1.0	1.9	0.7	2.1	3.2	1.0	3.0	1.2	1.4	1.4	1.0
BRA/UEL-15/03 (KY057347)	15	95.2	96.1	96.1	98.4	96.8	96.8	95.6	97.2	98.4	97.2	96.8	95.6	99	99.3	ID	0.5	1.2	2.1	0.5	2.3	3.0	1.2	2.8	1.4	1.6	1.6	1.2
BRA/UEL-16/04 (KY057348)	16	95.6	96.5	96.5	98.8	96.8	97.0	95.6	97.7	98.8	97.7	97.2	96.1	99.5	99.7	99.5	ID	0.7	1.6	0.5	1.9	3.0	0.7	2.8	1.0	1.2	1.2	0.7
BRA/UEL-18/03 (KY057349)	17	95.4	96.3	96.3	98.6	96.5	96.8	95.4	97.4	98.6	97.4	97.0	95.8	98.8	99.0	98.8	99.3	ID	1.9	1.2	2.1	2.8	1.0	3.0	1.2	1.0	1.0	1.0
BRA/UEL-30/04 (KY057350)	18	95.8	96.8	96.8	98.1	97.0	96.8	95.8	97.9	99.0	97.4	97.4	96.5	97.9	98.1	97.9	98.4	98.1	ID	2.1	2.1	3.2	1.4	2.6	1.6	1.9	1.9	1.4
BRA/UEL-BLU/13 (KY057351)	19	95.2	96.1	96.1	98.4	96.8	96.8	95.6	97.2	98.4	97.2	96.8	95.6	99.0	99.3	99.5	99.5	98.8	97.9	ID	2.3	3.5	1.2	2.8	1.4	1.6	1.6	1.2
BRA/UEL-SIM/13 (KY057352)	20	95.2	96.1	95.8	98.4	96.3	96.1	95.6	97.2	97.9	97.2	96.8	96.1	97.7	97.9	97.7	98.1	97.9	97.9	97.7	ID	3.5	1.2	3.2	1.4	1.6	1.6	1.2
BRA/UEL-MEG/14 (KY057353)	21	94.5	95.4	94.9	97.2	95.6	95.4	94.9	96.5	97.2	96.1	96.1	94.9	96.5	96.8	97.0	97.0	97.2	96.8	96.5	96.5	ID	2.3	3.9	2.6	2.1	2.3	2.3
BRA/UEL-LLA/14 (KY057354)	22	96.3	97.2	96.8	99.5	97.4	97.2	96.3	98.4	99.0	98.4	97.9	96.8	98.8	99.0	98.8	99.3	99	98.6	98.8	98.8	97.7	ID	2.1	0.3	0.5	0.5	1.0
BRA/UEL-FRD/15 (KY057355)	23	96.5	97.4	97.4	97.9	99.5	98.1	97.4	98.6	97.9	98.6	98.6	97.4	96.8	97.0	97.2	97.2	97.0	97.4	97.2	96.8	96.1	97.9	ID	2.3	2.6	2.6	2.1
BRA/UEL-ZNH/16 (KY057356)	24	96.1	97.0	96.5	99.3	97.2	97.0	96.1	98.1	98.8	98.1	97.7	96.5	98.6	98.8	98.6	99.0	98.8	98.4	98.6	98.6	97.4	99.7	97.7	ID	0.7	0.7	0.3
BRA/UEL-LLK/16 (KY057357)	25	95.8	96.8	96.3	99.0	97.0	96.8	95.8	97.9	98.6	97.9	97.4	96.3	98.4	98.6	98.4	98.8	99.0	98.1	98.4	98.4	97.9	99.5	97.4	99.3	ID	0.5	0.5
BRA/UEL-TCO/16 (KY057358)	26	95.8	96.8	96.3	99.0	97.0	96.8	95.8	97.9	98.6	97.9	97.4	96.3	98.4	98.6	98.4	98.8	99.0	98.1	98.4	98.4	97.7	99.5	97.4	99.3	99.5	ID	0.5
BRA/UEL-MEL/16 (KY057359)	27	96.3	97.2	96.8	99.5	97.4	97.2	96.3	98.4	99.0	98.4	97.9	96.8	98.8	99.0	98.8	99.3	99.0	98.6	98.8	98.8	97.7	100	97.9	99.7	99.5	99.5	ID
	1	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	
		Percentage of similarity																										

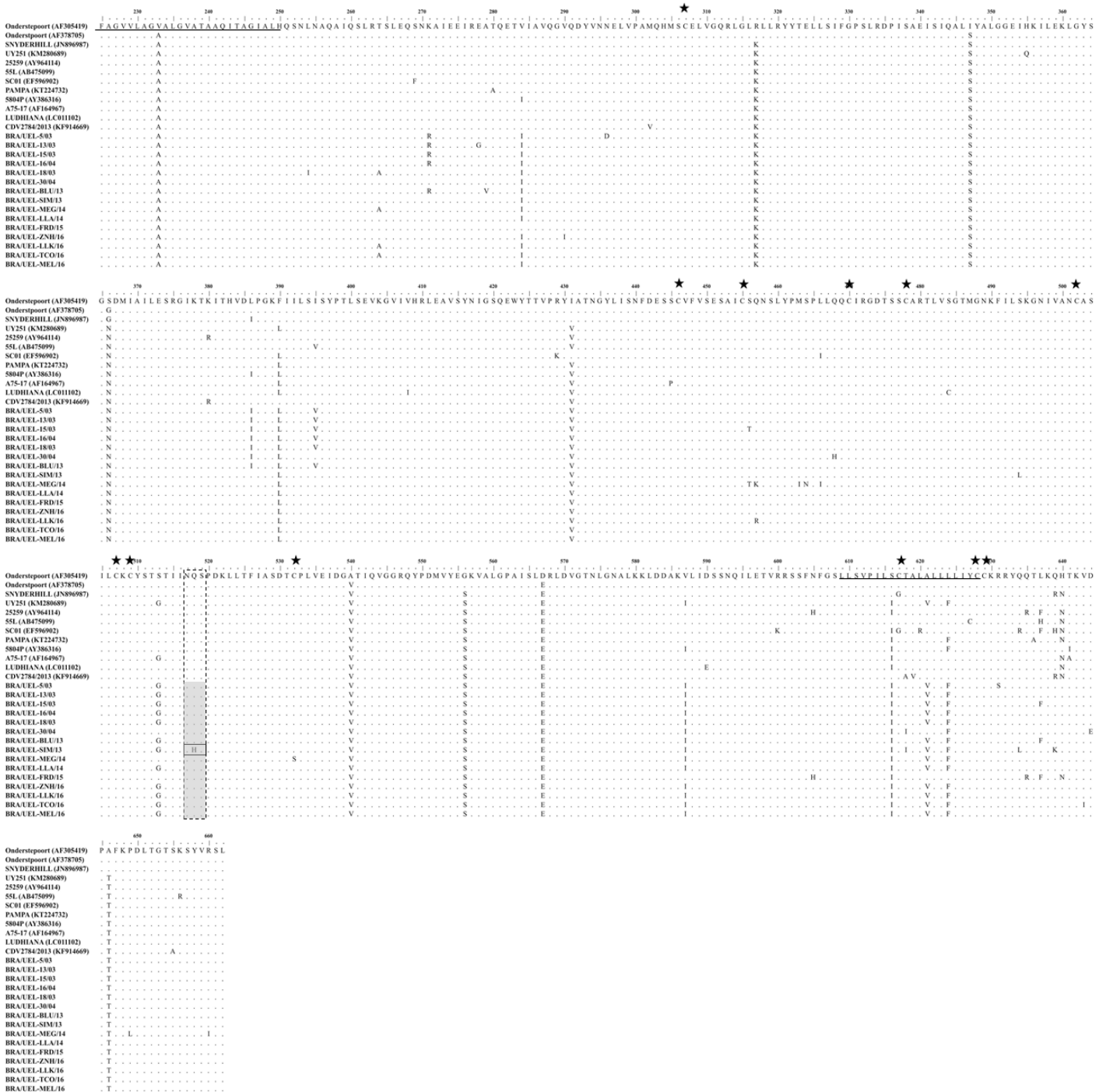
Online Resource 4. Divergence and similarities of deduced amino acid sequences among different CDV strains based on the F1 region of F gene.

APÊNDICE E

	140	150	160	170	180	190	200	210	220
Onderstepoort (AF305419)	Q I H W N	N L S T I G I I G T D S V H Y K I M T R P S H Q Y L V I K L M P	N V S L I E N C T K A E L G E Y E K L L N S V L E P I N Q A L T L M T K N V K P L Q S L G S G	R R Q R R					
Onderstepoort (AF378705)					D				
SNYDERHILL (JN896987)			A		D	V			A
UY251 (KM280689)					D		S		V
25259 (AY964114)					D				V
55L (AB475099)					D	D	S I		V
SC01 (EF596902)		A			D			I N	V
PAMPA (KT224732)					D				I
5804P (AY386316)					D	S		S	V
A75-17 (AF164967)					D				V
LUDHIANA (LC011102)					D	S			I
CDV2784/2013 (KF914669)					D				V
BRA/UEL-5/03					D		S		V
BRA/UEL-13/03					D		S		V
BRA/UEL-15/03					D		S		V
BRA/UEL-16/04					D		S		V
BRA/UEL-18/03				I	D		S		V
BRA/UEL-30/04					N		S		V
BRA/UEL-BLU/13					D		S		V
BRA/UEL-SIM/13					D		S		V
BRA/UEL-MEG/14					N		S		V
BRA/UEL-LLA/14					D		S		V
BRA/UEL-FRD/15					D		S		V
BRA/UEL-ZNH/16					N		S		V
BRA/UEL-LLK/16					N		S		V
BRA/UEL-TCO/16					N		S		V
BRA/UEL-MEL/16					D	S	S		V

Online Resource 5. Alignment of deduced amino acid sequences of CDV strains of the F gene F2 region. Only amino acids different from the Onderstepoort vaccine sequence (AF305419) are shown. Potential N-linked glycosylation sites (N-X-S/T) are shaded grey and open rectangles indicate glycosylation sites common to at least one vaccine strain analyzed. Cleavage sites identified with closed rectangle: A[↓]QIHW and RRQRR. Stars indicate cysteine residues.

APÊNDICE F



Online Resource 6. Alignment of deduced amino acid sequences of CDV strains of the F gene F1 region. Only amino acids different from the Onderstepoort vaccine sequence (AF305419) are shown. Potential N-linked glycosylation sites (N-X-S/T) are shaded grey and open rectangles indicate glycosylation sites common to at least one vaccine strain analyzed. Hydrophobic regions were underlined: the fusion peptide (FP) and the transmembrane (TM) segment. Stars indicate cysteine residues.

ANEXOS

ANEXO A – LISTA DE REAGENTES

1. Acetona P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
3. Ácido etilenodiaminotetraácido sal dissódico (EDTA) P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{NA}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
4. Agarose (Gibco BRL[®])
5. Água dietil pirocarbonato (DEPC) (*Invitrogen Life Technologies*[®])
6. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
7. Azul de bromofenol (Sigma[®])
8. Brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
9. *Buffer* PCR 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen Life Technologies*[®])
10. Cloreto de potássio (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
11. Cloreto de sódio (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
12. Conjunto dNTP 100 mM, 4 x 250 mL; 25 mmol de cada (100 mM das soluções dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (*Invitrogen Life Technologies*[®])
13. Dodecil sulfato de sódio (SDS) ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NAO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (BDH)
14. Fosfato de sódio dibásico anidro (NA_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
15. Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
16. Hidroximetil amino metano TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
17. Isotiocianato de guanidina (*Invitrogen Life Technologies*[®])
18. Kit de purificação *Purelink Quick Gel Extraction* (*Invitrogen Life Technologies*[®])
19. Kit de quantificação *Quant-iT*[™] (*Invitrogen Life Technologies*[®])
20. Kit de sequenciamento *BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems[®])
21. One-Step RT-PCR kit (*Invitrogen*[™] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
22. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* **CDV-1** (forward; 5'-ACAGGATTGCTGAGGACCTAT -3'; nucleotide (nt) 769-789) Frisk et al. (1999) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])

23. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* **CDV-2** (reverse; 5'-CAAGATAACCATGTACGGTGC-3'; nucleotide (nt) 1055-1035) Frisk et al. (1999) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
24. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* **CDV-1 Fw** (forward; 5'-CAGGACATAGCAAGCCA-3'; nucleotide (nt) 4856-4872) Desenhado neste estudo - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
25. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* **1Rev** (reverse; 5'-AGTTTTATGACCAAGTAC-3'; nucleotide (nt) 5426-5444) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
26. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* **2F** (forward; 5'-TGGGATTATCGGGACTGA-3'; nucleotide (nt) 5369-5387) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
27. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* **3Rev** (reverse; 5'-GGGCCAAATATTGACAAC-3'; nucleotide (nt) 5909-5927) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
28. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* **4F** (forward; 5'-GTCCCTGCTATGCAACAT-3'; nucleotide (nt) 5829-5847) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
29. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* **5Rev** (reverse; 5'-GGAGTTCTGGCTACAAATG-3'; nucleotide (nt) 6293-6312) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* **6F** (forward; 5'-TGTGTATTCGTCTCAGA-3'; nucleotide (nt) 6270-6287) Romanutti et al. (2016) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
31. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* **CDV-7Rev** (reverse; 5'-CTGAGCCCTAAGTTTTCT-3'; nucleotide (nt) 7050-7067) Desenhado neste estudo - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
32. Padrão de tamanho molecular DNA 123 bp (*Invitrogen Life Technologies*[®])
33. Polimerase recombinante Platinum Taq DNA (500 unidades) (*Invitrogen Life Technologies*[®])
34. Sacarose/sucrose P.A. (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342.31 (Reagen[®])

35. Sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®)
36. Transcriptase reversa M-MLV (200 unidades) (*Invitrogen Life Technologies*®)
37. Triton x-100 (J.T. Baker®)
38. TRIzol® LS Reagent (*Invitrogen Life Technologies*®)

ANEXO B – SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Gel de agarose 2%**
 - 1,0 g de agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 20 µL de brometo de etídeo
- **Hidratação da sílica**
 - 6 g de sílica (Sigma®)
 - Adicionar 50 mL de água ultrapura autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 44 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 50 mL de água ultrapura autoclavada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 44 mL do sobrenadante
 - Ajustar o pH (pH 2,0)
 - Aliquotar e autoclavar
- **SDS 10%**
 - 5 g dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - água bidestilada q.s.p. 50 mL
- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton x-100
- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**

- 107,78 g de TRIS 0,89 M
- 55,03 g de ácido bórico 0,89 M
- 7,45 g de EDTA 0,02 M
- água bidestilada q.s.p. 1 litro
- ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- 0,25 g de azul de bromofenol 0,25%
- 45 g de sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%
- água bidestilada q.s.p. 100 mL

ANEXO C – PROTOCOLOS DE TÉCNICAS

• Extração do RNA pelo método sílica/tiocianato de guanidina

- Pipetar 300 μ L da urina
- Adicionar 500 μ L da solução L6
- Adicionar 25 μ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em *vortex*
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 μ L de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60 °C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56 °C (15 min)

- Adicionar 50 μ L de água DEPC
 - Homogeneizar em *vortex*
 - Banho-maria 56 °C/15 min
 - Homogeneizar em *vortex*
 - Centrifugar 13.000 x *g* /4 min
 - Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
 - Estocar à -20 °C até a utilização
- **Extração de RNA pelo método TRIzol® LS Reagent (Invitrogen Life Technologies®)**

Sangue total:

- Pipetar 250 uL de sangue total
- Adicional 750 uL de TRIzol LS

Órgão:

- Macerar 50-100 mg de órgão em 1 mL de água DPEC.
- Centrifugar a 3000 x *g* / 10 min
- Pipetar 250 μ L do sobrenadante
- Adicionar 750 uL de TRIzol LS

Prosseguir com as seguintes etapas para os dois materiais biológicos:

- Homogeneizar em *vortex*.
- Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- Adicionar 200 uL de clorofórmio
- Homogeneizar em *vortex* por 15 segundos.
- Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente.
- Centrifugar por 15 minutos a 12000 RCF a 4°C.
- Recolher a fase aquosa.
- Adicionar 500 uL de propanol e homogeneizar em *vortex*
- Incubar por 10 minutos em temperatura ambiente.
- Centrifugar por 10 minutos a 12000 RCF a 4°C.

- Desprezar todo o conteúdo do microtubo.
- Adicionar 1mL de etanol a 75% e homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar por 5 minutos a 7500 RCF a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e secar no termobloco a 56°C até evaporar.
- Adicionar 30 uL de água DPEC e vortexar.
- Incubar a 56°C por 10 minutos.
- Centrifugar e recolher o sobrenadante.

- **RT-PCR para gene N do CDV**

Desnaturação

- 9 µL do RNA extraído
- 20 pmol do primer *forward*

Programa: 70°C por 10 min e banho de gelo por 5 min

Transcrição reversa

- 1x RT *buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)
- 1,3 mM de cada dNTP
- 0,1 M de DTT
- 50 unidades de transcriptase reversa M-MLV

Programa: 37°C/50 min; 70°C/15 min.

PCR

- 1x PCR *buffer* (30 mM Tris-HCl, pH 8,4 e 75 mM KCl)
- 3 mM de MgCl₂
- 0,8 mM de cada dNTP
- 20 pmol de cada *primer*
- 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase
- 5 µL de cDNA
- Água q.s.p. 50 µL

Programa: 94°C/1 min; 35 ciclos de 94°C/1 min, 59,5°C/1 min e 72°C/1 min; 72°C/5 min.

- **RT-PCR para o gene F de CDV**

- 25 μ L de 2X Reaction Mix (0,4 mM de cada dNTP, 3,2 mM de $MgSO_4$)
- 1 μ L de cada *primer* (20 pmol)
- 2 μ L *SuperScript*[®] III RT/*Platinum*[®] Taq Mix
- 10 μ L do RNA extraído
- Água q.s.p. 50 μ L
- Programa: 55°C/30 min; 40 ciclos de 94°C/2 min; 94°C/15 seg; 50°C/ 30 seg e 68°C/1 min; 68°C/5 min.

- **Eletroforese em gel de agarose a 2%**

- 1,0 g de agarose
- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4
- 20 μ L de brometo de etídeo (0,5 μ g/mL)

São utilizados 5 μ L do *amplicon* e 1 μ L do tampão de amostra. A eletroforese sob voltagem (100V) e amperagem (80A) constantes por aproximadamente 50 min.

- **Purificação de produto de PCR excisado do gel**

- Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
- Adicionar 3 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.
- Incubar o tubo a 50 °C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
- Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com coluna.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo coletor.
- Adicionar 500 μ L do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
- Adicionar 30 μ L do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

- **Purificação direta de produto de PCR**

- Adicionar 4 volumes do *Binding buffer* (B2) a 1 volume de reação de PCR.
- Transferir a solução para uma coluna de purificação.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- Adicionar 650 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
- Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
- Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
- Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
- Centrifugar a 13.000 x g / 1 min.
- Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

- **Quantificação de produto de PCR**

- Certificar-se de que todos os reagentes estão em temperatura ambiente.
- Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer* Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
- Homogeneizar em *vortex*.
- No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 2 µL do fragmento de DNA purificado.
- No microtubo do padrão 0 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10 µL do padrão 0.
- No microtubo do padrão 100 adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10 µL do padrão 100.
- Homogeneizar os microtubos em *vortex* por 2-3 s
- Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
- Realizar a leitura usando Qubit™ fluorometer (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

- **Sequenciamento pelo método de Sanger**

- **Preparo de amostras para o sequenciamento**

As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na tabela abaixo:

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/ μ L ou μ g/mL)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/ μ L ou μ M)
< 300	2	5
300 – 700	4	5
>700	10	10

- **Mix do sequenciamento**

Reagente*	Volume
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	2,0 μ L
Tampão 5x	1,5 μ L
Água ultrapura autoclavada	0,5 μ L
Volume final	4,0 μ L

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 μ L de amostra purificada + 1 μ L de *primer*.

- **Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento***

Reação	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	96 °C	1 minuto	1
Desnaturação	96 °C	15 segundos	35
Anelamento	50 °C	15 segundos	35
Extensão	60 °C	4 minutos	35

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

- **Precipitação com EDTA e Etanol**

- Adicionar os 10 μ L da reação de sequenciamento em um poço de uma placa *MicroAmp*[®] *Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (*Applied Biosystems*)
- Adicionar 2,5 μ L de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0
- Adicionar 30 μ L de etanol 100%
- Homogeneizar lentamente a placa
- Incubar a placa por 10 minutos em temperatura ambiente
- Centrifugar a 2720 x g durante 30 minutos a 20 °C

- Desprezar o conteúdo da placa
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 minuto a 20 °C com a placa invertida sobre papel
- Adicionar 100 µL de etanol 70%
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 minuto a 20 °C
- Desprezar o conteúdo da placa
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 minuto a 20 °C com a placa invertida sobre papel
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 minutos
- Adicionar 10 µL de formamida (HIDI)
- Adicionar a septa
- Homogeneizar a placa em vórtex
- Submeter à placa a um spin no *miniplate spinner*
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 minutos
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 minuto
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (ABI 3500 *Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

ANEXO D – LISTA DE SOFTWARES

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3

(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)

- BLAST The Basic Local Alignment Search Tool

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- MEGA package software version 6

(<http://www.megasoftware.net/mega4/mega41.html>)

- BioEdit software version 7.1.11

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)