

ANALISE FILOGENÉTICA DO GENE DA HEMAGLUTININA DO VÍRUS DA
CINOMOSE EM CANÍDEOS DOMÉSTICOS E SILVESTRES NATURALMENTE
INFECTADOS

ANALYSIS PHYLOGENETIC OF THE HEMAGLUTININE GENE OF THE
CANINE DISTEMPER VIRUS IN DOMESTIC AND WILD CANINES
NATURALLY INFECTED

Romeu Moreira dos Santos^{1*}, Denise Granato Chung², Márcia Ferreira da Rosa
Sobreira³, Helio José Montassier³

*1 Pós-graduandos do programa de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal - São Paulo, Brasil. *Autor principal:*

romeumdsantos@hotmail.com

2 Pós-graduanda do Programa de Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal - São Paulo, Brasil.

3 Docente do Departamento de Patologia Veterinária, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal – São Paulo, Brasil.

Resumo

A cinomose canina é uma das enfermidades infectocontagiosas mais importantes que acomete os cães. É uma doença causada pelo vírus da Cinomose (CDV), um Paramyxovirus, do gênero Morbilivirus, de ocorrência mundial, sem sazonalidade, sem predileção de sexo ou raça, apresenta maior incidência em animais jovens, podendo acometer todas as idades. Ainda que seja reconhecido um único sorotipo do CDV, surtos ocorridos nos últimos anos nos Estados Unidos e estudos de filogenia com base principalmente no gene H realizados também em outros países têm apontado para um distanciamento genético entre as amostras de CDV utilizadas como estirpes vacinais e as estirpes circulantes na população canina doméstica e silvestre. Com base neste contexto, o objetivo deste estudo foi realizar a análise molecular e filogenética do gene H de estirpes isoladas do CDV em caninos domésticos e silvestres naturalmente infectados. Para

análise filogenética foram selecionadas sequências completas do gene H de variantes do CDV isoladas no Brasil e Estados Unidos de canídeos domésticos e silvestres, em seguida foram analisadas pelo programa PAUP v.4.0 utilizando o método de Máxima Parcimônia com modelo de busca Branch-and-Bound. Os resultados obtidos sugerem que o grupo de isolados do CDV no Brasil são distintos dos isolados norte-americanos e próximos genotipicamente dos isolados vacinais. Além disso, a filogenia viral dos isolados do CDV em animais silvestres indica os cães domésticos como fonte de infecção para estes carnívoros selvagens.

Palavras-chaves: Encefalite viral. Esgana canina. Paramixovírus.

Abstract

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

Key-words: Viral encephalitis. canine distemper. Paramyxovirus.

INTRODUÇÃO

A cinomose canina é uma das enfermidades infectocontagiosas mais importantes que acomete os cães. É uma doença causada pelo vírus da Cinomose (CDV), um *Paramyxovirus*, do gênero *Morbilivirus*, de ocorrência mundial, sem sazonalidade, sem predileção de sexo ou raça, apresenta maior incidência em animais jovens, podendo acometer todas as idades. Apresenta quadro clínico sistêmico e/ou neurológico, dependendo da idade do animal, do estado imunológico e da cepa viral (ARNS et al., 2007).

O CDV já foi relatado em várias espécies das famílias dos: *Canidae*, *Ailuridae*, *Mustelidae*, *Hyaenidae*, *Ursidae*, *Viverridae*, *Procyonidae* e *Felidae* (HIRAMA et al. 2004). Em muitas partes do mundo, o cachorro doméstico é considerado hospedeiro de manutenção e fonte de infecção deste vírus para diversos animais silvestres (ROELKE-PARKER et al. 1996).

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

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

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

Assim, fica evidenciado que as relações dos parâmetros de patogenicidade e de filogenia, entre os isolados de campo e as estirpes de referência do CDV, especialmente

àquelas utilizadas na produção de vacinas, ainda não é muito bem conhecida, de forma que investigações adicionais são necessárias para melhor caracterizar as mudanças causadas por mutações e/ou recombinações gênicas na proteína H das variantes do CDV.

Com base neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a análise molecular e filogenética do gene H de estirpes isoladas do CDV em caninos domésticos e silvestres naturalmente infectados no Brasil e nos Estados Unidos (EUA).

MATERIAL E MÉTODOS

Sequências

Para análise filogenética foram selecionados sequências completas do gene H de variantes do CDV isoladas no Brasil e EUA de canídeos domésticos e silvestres. Como grupo controle foram utilizadas sequências das estirpes vacinais Onderstepoort, Snyderhill e Lederle. O vírus da peste dos pequenos ruminantes foi utilizado como grupo externo. Todas as sequências foram obtidas no genbank (National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]).

Alinhamento e análise filogenética do gene H

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

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

RESULTADOS

A análise das amostras brasileiras (AY548111, AY548110, AY548109) revelou elevada identidade com amostras de estirpes vacinais (100% a 84% EF418782Lederle; GU138403Snyder e EU143737onderstepoort). Entretanto, amostras do CDV isoladas de cães dos Estados Unidos (EU098105, EU098104, EU098103 e EU098102) ficaram distantes dos genótipos brasileiros, porém estavam mais próximos dos isolados do CDV em raposas silvestres (87% a 52% KC916716bataredfox e JN153019wildredfox); este grupo encontra-se geneticamente mais distante do grupo nomeado vacinal, composto das estirpes vacinais Snyder, Onderstepoort e Lederle (Figura 1).

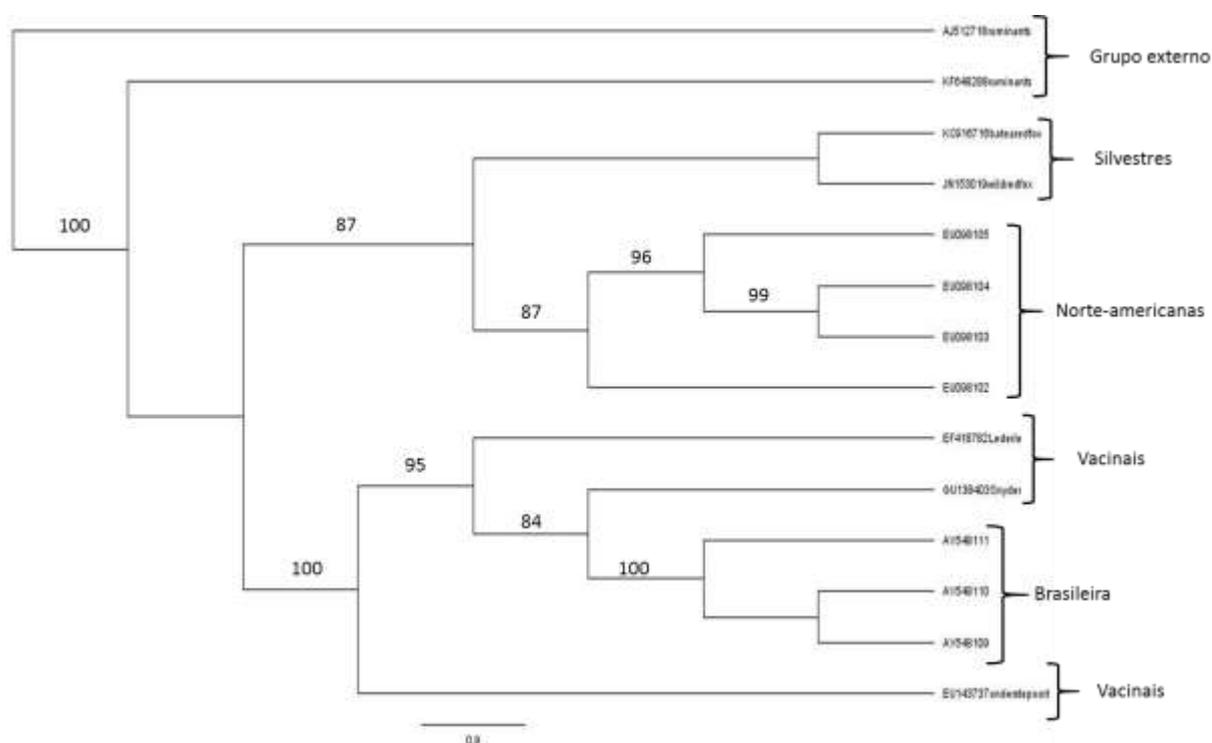


Figura 1. Árvore filogenética enraizada utilizando a sequência de nucleotídeos de um segmento do gene que codifica a proteína H do CDV. As sequências derivadas de paramixovírus dos pequenos ruminantes (AJ512718ruminants; KF648288ruminants) foram utilizadas como grupo externo. Valores de bootstrap inferiores de 70 não são mostrados.

DISCUSSÃO

A cinomose é considerada a doença infecciosa mais importante entre os canídeos domésticos e silvestres, sendo os cães seus principais reservatórios (HIRAMA et al. 2004).

Nas últimas décadas, a análise do gene H e de outros genes do CDV permitiram identificar diversas classes filogenéticas classificadas de acordo com sua origem geográfica em canídeos domésticos e animais silvestres (MOCHIZUKI et al. 1999, MARTELLA et al. 2002, PARDO et al. 2005).

A análise filogenética realizada neste trabalho, sugere que as amostras brasileiras avaliadas neste estudo encontram-se geneticamente relacionadas às linhagens vacinais. É notável nos resultados obtidos, o afastamento das amostras de campo americanas em relação ao grupo isolado no Brasil e as estirpes vacinais. O que difere dos resultados encontrados por Rosa et al.(2012), que descrevem o surgimento de amostras brasileiras geneticamente relacionadas às linhagens europeias e norte-americanas.

Entretanto, as amostras isoladas de animais silvestres (raposas) neste estudo estão mais próximas das amostras norte-americanas o que sugere uma adaptação e evolução entre as espécies domésticas e silvestres desta região.

Alguns autores alegam, que devido ao aumento de cães abandonados, principalmente em proximidades com ambientes naturais o surgimento da doença em animais silvestres vem aumentando significativamente. E as amostras isoladas em animais silvestres diferenciam das amostras vacinais (ARNS et al., 2007; BRICKNER 2003).

Segundo Garcia et al. (2012) o cão é transmissor de mais de 100 doenças infecciosas como a raiva e a cinomose, e a persistência desta última, gera um grande impacto no contexto de conservação de animais silvestres.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que o grupo de isolados do CDV no Brasil são distintos dos isolados norte-americanos e próximos genotipicamente dos isolados vacinais.

A filogenia viral dos isolados do CDV em animais silvestres indica os cães domésticos como fonte de infecção para estes carnívoros selvagens. Estes resultados sugerem o potencial de transmissão entre cães domésticos e carnívoros selvagens, no entanto estudos de epidemiologia molecular mais amplos são necessários para caracterizar sua origem evolutiva.

REFERÊNCIAS

ARNS, C. W.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S. Paramyxoviridae: Vírus da Cinomose. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ufsm, p. 674-677, 2007.

BRICKNER, I. The Impact of Domestic dogs (*Canis familiaris*) on Wildlife Welfare and Conservation: **A Literature Review with a Situation Summary from Israel**. Internal Report, Israel Park and Nature Authority. Department of Zoology, Tel Aviv University. p 31. 2003.

DEMETER, Z.; PALADE, E. A.; HORNYÁK, Á.; RUSVAI, M. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. **Veterinary Microbiology**, v.142, p. 420-426, 2010.

GARCIA, R.C.M.; CALDERÓN, N. & FERREIRA, F. Consolidação de diretrizes internacionais de manejo de populações caninas em áreas urbanas e proposta de indicações para seu gerenciamento. **Revista Panamericana de Salud Publica**, 32(2): 140-144. 2012.

HIRAMA, K., GOTO, Y., UEMA, M., ENDO, Y., MIURA, R., KAI, C. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civet (*Paguma larvata*). **Journal of Veterinary Medical Science**. 66, 1575–1578. 2004.

MARTELLA V, CIRONE F, ELIA G, LORUSSO E, et al. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**. 116: 301-309. 2006.

MARTELLA V., PRATELLI A., CIRONE F., ZIZZO N., DECARO N., TINELLI A., FOTI M. & BUONAVOGLIA C. Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. **Molecular and Cellular Probes** 16:77-83. 2002.

MOCHIZUKI M., HASHIMOTO M., HAGIWARA S., YOSHIDA Y. & ISHIGURO S. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent Isolates from dogs in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**. 37:29 36-2942. 1999.

PARDO, INGRID D. R.; JOHNSON, GAYLE C.; KLEIBOEKER, STEVEN B.. Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington Dc, p. 5009-5017. jul. 2005.

ROELKE-PARKER M.E., MUNSON L., PARCKER C., KOCK R., CLEVELAND S. & CARPENTER M. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). **Nature** 379: 441-445. 1996.

ROSA, G. N. et al. 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**. Campinas, p. 72-77, 2012.