

Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay

Sarute, N.; Pérez, R.; Francia, L.; Hernández, M.; Bedó, G.; Bonilla, B.; Guasco, S.; Cardeillac, A.; Panzera, Y.

RESUMEN

El virus Distemper Canino (CDV) es el agente etiológico de una severa enfermedad infecciosa, denominada Distemper o Carré, que afecta a cánidos y diversas familias de carnívoros. La enfermedad se caracteriza por presentar síntomas clínicos asociados a lesiones en el aparato respiratorio, digestivo y/o el sistema nervioso central. Su diversidad sintomatológica dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso. En este trabajo implementamos por primera vez en Uruguay, una metodología diagnóstica *ante-mortem* mediante RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa precedida por retrotranscripción) amplificando un fragmento conservado de 287 pb del gen de la nucleocápside a partir de muestras provenientes de canes con sintomatología clínica de Distemper. Se obtuvieron amplicones en 44 de las 51 muestras analizadas. El análisis de las secuencias nucleotídicas de tres muestras de campo reveló un 100% de identidad. La comparación de estas secuencias con la cepa vacunal (Onderstepoort) reveló numerosas variaciones nucleotídicas. Estas diferencias nos permitieron diseñar un método de RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción) para discriminar entre la cepa vacunal y virus de campo.

Palabras clave: CDV, gen de la nucleocápside, diagnóstico molecular, RFLP

SUMMARY

Canine Distemper Virus (CDV) is the etiologic agent of a severe infectious disease, known as Distemper or Carré, which affects dogs and various families of carnivores. The disease is characterized by clinical symptoms associated with lesions in the respiratory, digestive and/or central nervous system. The diversity of the symptoms makes it difficult to establish a clinical *ante-mortem* diagnosis. In this work we implemented for the first time in Uruguay, an *ante-mortem* diagnostic method using RT-PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) to amplify a conserved fragment of 287 bp of the nucleocapsid gene from samples belonging to dogs with symptoms of Distemper. Amplicons were obtained in 44 out of the 51 samples tested. The analysis of nucleotide sequences of three field samples revealed that they were 100% identical. The comparison of these sequences with the vaccine strain (Onderstepoort) revealed numerous nucleotide variations. These differences allowed us to design a method of RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) to discriminate between the vaccine strain to field cases.

Key words: CDV, nucleocapsid gene, molecular diagnosis, RFLP

INTRODUCCIÓN

El virus Distemper Canino (CDV) es un virus envuelto perteneciente al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Se trata del agente etiológico de una de las principales patologías infecciosas de canes jóvenes y adultos, conocida como Distemper, Enfermedad de Carré o Joven Edad (1). La enfermedad no se restringe exclusivamente a cánidos, ya que se han registrado casos en poblaciones silvestres de diversas familias de carnívoros como vivérridos, mustélidos, felinos y prociónidos (8-9, 12, 17-18).

Distemper se caracteriza por presentar una amplia variedad de síntomas clínicos asociados con lesiones en el aparato respiratorio, digestivo y/o sistema nervioso central (SNC) que pueden causar la muerte del animal (1). La diversidad en la sintomatología, asociada al ciclo impredecible y variable del virus en el huésped, dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso en la mayoría de los animales afectados (7). Los síntomas clínicos de Distemper son similares a los de otras patologías, como los de parainfluenza canina, adenovirus canino tipo 2 o coronavirus respiratorio canino, provocando frecuentemente confusión en el diagnóstico clínico (4).

Se han desarrollado diversas metodologías de diagnóstico complementario entre las que se incluyen ensayos de inmunohistoquímica y ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Sin embargo, dichas técnicas no satisfacen los requerimientos de un ensayo de detección sensible, rápido y específico (7). El

desarrollo de metodologías moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) precedida por retrotranscripción (RT) del RNA genómico, permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido, con un alto grado de sensibilidad y especificidad (7, 10, 14, 20). La técnica RT-PCR permite detectar genoma viral por amplificación de regiones específicas, y brindar información para análisis posteriores de su composición nucleotídica y aminoacídica.

Se ha detectado al genoma viral mediante RT-PCR en muestras de suero, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina, independientemente de los signos clínicos del animal, títulos de anticuerpos neutralizantes y distribución de antígenos virales (7, 10). Mediante infección experi-

mental, se ha demostrado que el virus de campo es indistinguible de la cepa vacunal (Onderstepoort) en términos de síntomas clínicos y de resultados de diagnóstico molecular (7, 10).

¹Sección Genética Evolutiva. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: ypanzera@fcien.edu.uy
Recibido: 18/10/10 Aprobado: 21/3/11

mental de canes se demostró que en la secreción ocular el genoma viral es detectado tempranamente y por períodos más prolongados respecto a la orina, sangre y LCR (14).

CDV presenta un genoma de RNA de cadena simple, polaridad negativa, y aproximadamente 15.6 kb (15). Su genoma codifica para seis componentes estructurales del virión: dos proteínas de membrana, la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F), la proteína de matriz (M), la proteína de nucleocápside (N), y dos proteínas que integran el complejo RNA polimerasa RNA dependiente: la proteína larga (L) y la fosfoproteína (P) (23). Particularmente la secuencia nucleotídica de la región central del gen N se halla muy conservada entre diversas cepas de CDV, siendo generalmente utilizada para realizar el diagnóstico etiológico (7, 10, 20).

La enfermedad de Distemper se ha controlado por décadas con el uso de vacunas con virus vivos atenuados desarrolladas en los años 50 (5). Sin embargo, en los últimos años se ha registrado un incremento en el número de casos de Distemper en poblaciones caninas en diversas regiones geográficas, e incluso una expansión en el rango de huésped (3, 11, 18). Resulta preocupante que dicho incremento se observe también en poblaciones de canes correctamente vacunados (2, 6, 11, 13, 16). Aunque la explicación específica del aumento de casos de Distemper aún se desconoce, existen varias hipótesis, como la insuficiente atenuación del virus vacunal (13), o la circulación de nuevas cepas con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas administradas (19).

En Argentina, se ha reportado recientemente un incremento en el número de casos de Distemper (2). Si bien no se cuenta con estudios epidemiológicos de la enfermedad en nuestro país, en los últimos años se han registrado numerosos casos de Distemper.

Los objetivos del presente trabajo fueron implementar por primera vez en el país un método de diagnóstico molecular y desarrollar un ensayo capaz de discriminar entre variantes de campo y la cepa comúnmente utilizada en la fabricación de vacunas (cepa Onderstepoort).

Como diseño experimental hemos amplificado por RT-PCR un fragmento conser-

vado de 287 pb del gen N, que nos permitió detectar el genoma viral en muestras provenientes de canes con síntomas clínicos presuntivos de la enfermedad. Los amplicones obtenidos fueron posteriormente analizados mediante secuenciación y un sistema de RFLP (Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción), desarrollado para la rápida caracterización de las cepas circulantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Analizadas

Todas las muestras de campo recibidas en el laboratorio para análisis de Distemper, fueron alicuotadas y almacenadas a -20 °C a la espera de ser procesadas.

Se emplearon muestras de orina y secreción óculo-nasal que ya han sido previamente reportadas como adecuadas para la detección del genoma viral (10, 14, 20); además, presentan la ventaja de que son de fácil recolección y no invasivas para el animal.

Las muestras de secreciones óculo-nasales fueron colectadas entre 1-14 días luego de la aparición de síntomas clínicos, mientras que las de orina se colectaron entre 7-30 luego de la observación de síntomas.

Se analizaron 39 muestras de orina y 14 de secreciones óculo-nasales provenientes de 51 perros con síntomas clínicos presuntivos de infección por CDV y 2 perros sin sintomatología clínica (Cuadro 1). Estos dos últimos (CDV29 y CDV99) se utilizaron como control negativo. Como control positivo se utilizó una muestra liofilizada de una vacuna conteniendo la cepa Onderstepoort, con la cual se estandarizó la extracción del RNA genómico y la reacción de RT-PCR.

Obtención del genoma viral

La extracción de RNA a partir de muestras de orina y liofilizado de vacuna (un vial fue resuspendido en 800 µl de 1X PBS) se realizó con el kit «PureLink Viral DNA/RNA MiniKit» (Invitrogen, California, USA) partiendo de 500 µl de volumen inicial.

Para las muestras de secreciones óculo-nasales, el RNA viral fue extraído mediante el reactivo TRIzol (Invitrogen, California, USA), homogeneizando la secreción con 1 ml de este reactivo. En am-

bos casos se siguió el protocolo sugerido por el fabricante. Todas las extracciones se realizaron en paralelo con las muestras de perros sanos (CDV29 y CDV99).

Ensayo de RT-PCR

La reacción de retrotranscripción (RT) fue realizada con la enzima «RevertAid M-MiLV Reverse Transcriptase» (Fermentas, Vilna, Lituania) utilizando el cebador directo **p1** y siguiendo las especificaciones del fabricante.

En la reacción de PCR se utilizaron los cebadores **p1** y **p2** (7) capaces de amplificar un fragmento de 287 pb correspondiente a la región conservada del gen de la nucleocápside (Cuadro 2). En todas las reacciones se ensayaron distintos volúmenes de DNA complementario (cDNA) y se incluyeron a las muestras de perros sanos (CDV29 y CDV99).

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 10 µl conteniendo 1-3 µl de cDNA, 0.3 µl de cada cebador, 0.2 mM de dNTPs, 2.0 mM de MgCl₂, 1U de Taq polimerasa (Fermentas, Vilna, Lituania) en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, California, USA) bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C durante 30 s, apareamiento a 49 °C por 45 s, extensión a 72 °C por 1 min) y un ciclo de extensión final a 72 °C por 15 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y revelados por tinción con nitrato de plata.

Clonación de amplicones positivos

Se clonaron cuatro amplicones con el kit «GeneJet PCR Product Cloning kit» (Fermentas, Vilna, Lituania) utilizando células competentes de *E. Coli XL-1 Blue*.

El primer amplicón clonado fue el correspondiente a la cepa vacunal Onderstepoort. CDV11 fue el primer amplicón obtenido de una muestra de campo, siendo clonado y enviado a secuenciar para confirmar su identidad con la base de datos del NCBI. CDV20 y CDV75 fueron seleccionados debido a que pertenecían a un animal no vacunado y uno recientemente vacunado respectivamente.

Cuadro 1. Muestras empleadas en el estudio. Se detalla la denominación, edad, localidad, vacunación y sintomatología de los animales. NV: no vacunado; V: vacunado; SN: sintomatología neurológica; GI: sintomatología gastrointestinal; SR: sintomatología respiratoria; Conj: conjuntivitis; ND: no determinado.

Muestra	Edad (meses)	Procedencia	Vacunación	Sintomatología Clínica				
				SN	GI	SR	Conj	Otros
CDV2	8	Canelones (Solymar)	V	+	-	+	-	
CDV3	ND	Montevideo	ND	+	-	-	-	
CDV8	24	ND	ND	-	+	-	-	
CDV10	8	Montevideo	V	+	-	+	-	
CDV11	144	Montevideo	V (ND)	+	-	-	-	
CDV13	6	Montevideo	V	+	+	-	-	
CDV14	108	Montevideo	V	+	-	+	-	
CDV17	7	Lavalleja	V	-	+	-	+	Pirexia
CDV20	ND	Montevideo	NV	+	-	+	+	
CDV24	60	Montevideo	NV	+	-	-	-	
CDV29	24	Montevideo	V	-	-	-	-	Animal Sano
CDV30	ND	Montevideo	V	-	+	-	-	Depresión
CDV33	30	Canelones (Santa Lucía) V		-	+	+	+	Depresión
CDV35	14	Canelones (Solymar)	V	+	-	-	-	
CDV36	72	Montevideo	V	-	+	-	-	
CDV40	2	Montevideo	NV	-	+	-	-	
CDV44	22	Paysandú	NV	-	+	-	+	
CDV63	12	ND	V	-	+	-	-	Hiperqueratosis
CDV67	48	San José	NV	+	-	-	-	
CDV73	2	Rivera	V	+	-	-	-	
CDV74	60	Canelones (El Pinar)	V	+	-	-	-	
CDV75	5	Canelones (Santa Lucía)	V (dos dosis C4 02 y 03/ 2007)	+	-	+	+	Leuco-penia
CDV81	96	Canelones (Solymar)	NV	+	-	-	-	
CDV88	4	ND	NV	+	-	-	-	
CDV99	ND	Montevideo	ND	-	-	-	-	Animal Sano
CDV102	36	Montevideo	V	-	+	+	-	
CDV104	6	Montevideo	V	-	+	-	-	
CDV107	10	ND	V	-	-	+	-	Pirexia
CDV109	4	Canelones	NV	ND	ND	ND	ND	
CDV110	10	Canelones	V	+	-	-	-	
CDV111	ND	ND	V	-	+	+	-	
CDV112	ND	Canelones (Toledo)	NV	ND	ND	ND	ND	
CDV113	ND	Canelones (Toledo)	NV	ND	ND	ND	ND	
CDV114	4	Canelones (Solymar)	V	+	-	-	-	
CDV115	12	Canelones (Rincón de la Bolsa)	V	+	-	-	+	
CDV116	8	Montevideo	V	+	-	+	-	
CDV117	36	Montevideo	V	-	+	-	+	
CDV118	15	Montevideo	V	+	+	-	+	
CDV119	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
CDV120	15	Colonia	V	-	+	-	-	
CDV121	13	Canelones (El Pinar)	V	-	+	-	+	
CDV122	ND	ND	ND	+	-	-	-	
CDV123	11	Montevideo	V	+	-	-	+	Pirexia
CDV124	3	Montevideo	V	-	-	-	+	
CDV126	48	Canelones (Santa Rosa)	NV	+	-	+	-	Pirexia
CDV127	24	Canelones (Santa Rosa)	V	-	-	+	+	
CDV128	6	Canelones (Santa Rosa)	NV	-	-	+	+	
CDV129	60	Montevideo	NV	+	-	-	-	
CDV130	84	Montevideo	V	-	+	-	+	Pirexia
CDV131	ND	Canelones (Santa Lucía) NV		+	+	-	-	Depresión
CDV132	ND	ND	V	-	+	-	+	Depresión
CDV139	12	Canelones (Santa Lucía)	V	-	-	+	+	Pirexia
CDV141	2	ND	V	+	-	+	+	

Cuadro 2. Cebadores utilizados para amplificar por RT-PCR un fragmento de 287 pb del gen N. Se indica la secuencia nucleotídica de cada cebador y su posición en el genoma. nt: nucleótido.

Cebador	Secuencia 5' - 3'	Posición en el genoma (nt)
p1	ACAGGATTGCTGAGGACCTAT	769-789
p2	CAAGATAACCATGTACGGTGC	1055-1035

La extracción del DNA plasmídico de las colonias con el inserto, se realizó mediante la técnica de mini-preparaciones descrita por Sambrook y col. (21).

Secuenciación y análisis

Los insertos de 287 pb fueron secuenciados automáticamente utilizando el equipo ABI3130 (Applied Biosystems, California, USA). Las secuencias nucleotídicas se analizaron y compararon con secuencias provenientes de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) a través del método ClustalX, usando el programa MEGA versión 4.1 (22).

Análisis de restricción y RFLP

La secuencia nucleotídica de tres aislamientos de campo y de la muestra vacunal fueron sometidas a un análisis de restricción con el programa WatCut (<http://watcut.uwaterloo.ca>).

Los productos de PCR de cinco aislamientos de campo y el producto de la muestra vacunal fueron digeridos con EcoRV (Fermentas, Vilna, Lituania) durante 3 horas a 37 °C y posteriormente visualizados en gel de agarosa al 2% con tinción de bromuro de etidio.

RESULTADOS

Diagnóstico

Se amplificó el fragmento de 287 pb del gen N en 34 de las 37 (92%) muestras de orina, y en 10 de las 14 (71%) muestras de secreciones óculo-nasales analizadas.

En ningún caso se registraron amplicones específicos en las muestras de orina CDV29 y CDV99 utilizadas como control negativo.

Análisis de secuencias nucleotídicas

El análisis bioinformático de las secuencias nucleotídicas obtenidas a partir de los clones reveló que las muestras de campo (Uy-06) presentaban 100% de identi-

dad entre sí y 96,2% respecto a la cepa vacunal. Las cepas de campo presentaron 11 variaciones a nivel nucleotídico respecto a la cepa vacunal, todas correspondientes a transiciones (Figura 1). También se realizaron comparaciones con secuencias de la base de datos del GenBank procedentes de diferentes países. La comparación mostró que las secuencias presentan una conservación relativamente elevada en la secuencia de bases. Los cambios nucleotídicos observados fueron mayormente sinónimos, por lo que la secuencia aminoacídica es prácticamente invariable para el fragmento amplificado.

Ensayo de RFLP

El análisis de las secuencias nucleotídicas de las muestras de campo CDV11, CDV20 y CDV75 y su comparación con la cepa vacunal permitió detectar un sitio de restricción diferencial para la enzima EcoRV e implementar un ensayo de RFLP. Las muestras de campo presentan la diana específica (GAT|ATC) mientras que la muestra vacunal registra en dicha posición una transición T→C (GACATC), lo cual determina la pérdida del sitio específico para la enzima (Figura 1).

El ensayo desarrollado fue realizado en las muestras CDV11, CDV20, CDV75, CDV139 y CDV141 y en la cepa vacunal Onderstepoort, corroborándose el patrón de restricción esperado. En la electroforesis de la figura 2 se observa la digestión de las muestras de campo, dando como resultado una banda correspondiente a 233 pb y otra a 54 pb.

El análisis *in silico* del RFLP reveló que todos los aislamientos de campo sudamericanos publicados hasta el momento presentan este mismo patrón de restricción, excepto un aislamiento argentino (n° acceso en GenBank: FJ009229) (Figura 1).

DISCUSIÓN

Distemper es una de las enfermedades virales de mayor incidencia en cánidos

domésticos y salvajes (1). Esto es debido al constante surgimiento de brotes infecciosos en diversas regiones del mundo (11, 13, 16-17) y a la expansión en el rango de huéspedes del virus (12, 18).

Muchos de los nuevos brotes de la enfermedad se observan en poblaciones de canes correctamente inmunizados, lo cual ha puesto en duda la eficacia de las vacunas administradas en dichos casos (2, 6, 16). Este hecho sumado a la dificultad para realizar un diagnóstico clínico preciso, hacen imprescindible la implementación de metodologías que permitan realizar un diagnóstico *ante-mortem* rápido y específico. En la actualidad, la técnica basada en RT-PCR es una de las metodologías más utilizadas para realizar el diagnóstico de Distemper (7).

En el presente trabajo se presenta la implementación, por primera vez en Uruguay, de una metodología de diagnóstico molecular basada en la amplificación de un fragmento de 287 pb del gen N. Nuestro estudio constató la presencia del fragmento en el 86% de las muestras remitidas al laboratorio como casos sospechosos de Distemper. El sistema de detección mediante la amplificación de dicho fragmento ha sido empleado por otros autores como un método de detección del genoma viral altamente sensible y específico en muestras de distinto origen (7, 10, 20). En nuestro estudio, se detectó el genoma de CDV en el 71% de las muestras de secreciones óculo-nasales y en el 92% de las muestras de orina analizadas. Si bien ambos porcentajes no son comparables debido a que las muestras provienen de distintos casos clínicos, nuestros resultados indican que estos fluidos son adecuados para estudios diagnósticos, como ha sido reportado previamente (10, 14, 20).

En el 14% de los casos clínicos donde no se detectó el genoma viral, puede haber ocurrido que las muestras no correspondieran a Distemper o bien que éstas presentaran una carga viral indetectable.

El análisis de las secuencias nucleotídicas correspondiente a la región del gen N de las muestras de campo uruguayas reveló 100% de identidad, sugiriendo que estos aislamientos corresponderían a un CDV predominante en Uruguay. La comparación de esta secuencia con las de cepas de otras regiones mostró una elevada

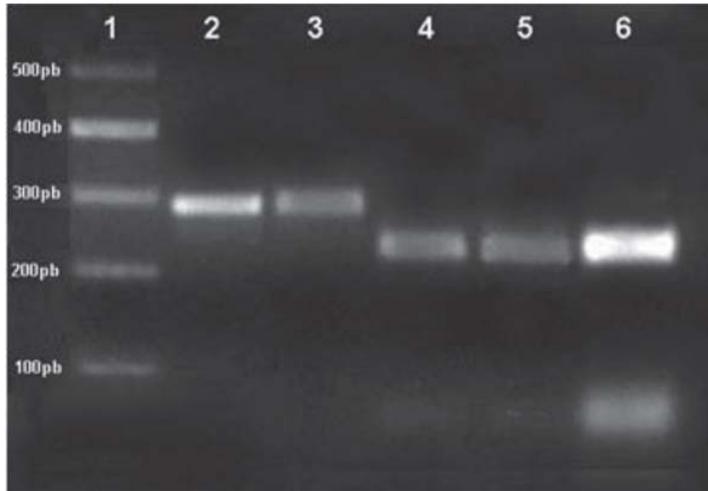


Figura 2. Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de PCR con la enzima EcoRV. Carriles: 1) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas), 2) Amplición de muestra de campo sin digerir (287 pb), 3) Amplición vacunal sometido a digestión, 4) a 6) Muestras de campo digeridas (233 pb y 54 pb).

conservación a nivel nucleotídico y aminoacídico. La mayoría de los cambios registrados corresponden a transiciones que no determinan sustituciones aminoacídicas (Figura 1).

Los valores de identidad nucleotídica observados entre los aislamientos uruguayos y los provenientes de otras regiones sustentan que la región conservada del gen N es idónea para la detección del genoma viral en muestras de campo.

Esto motivó al desarrollo de un ensayo de RFLP cuya discriminación fuera de utilidad para aportar información epidemiológica; su desarrollo se basó en el análisis de la secuencia nucleotídica de los aislamientos uruguayos y la cepa vacunal (Figura 1). Dicho ensayo permite diferenciar cepas de campo con respecto a la cepa vacunal Onderstepoort de manera rápida y eficaz en virtud de diferencias nucleotídicas. El RFLP se aplicó en tres

muestras de orina de animales con historia de vacunación (CDV11, CDV75 y CDV139), una muestra de orina de un animal sin historia de vacunación (CDV20) y en una muestra de secreción óculo-nasal de un can vacunado (CDV141). Los resultados obtenidos confirman que la infección de los canes fue causada por un virus de campo.

CONCLUSIONES

La implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico (RT-PCR) y caracterización (RFLP) nos permitió detectar y diferenciar virus de campo de virus vacunal de manera rápida y eficaz. De cualquier forma, no se puede descartar la ocurrencia de mutaciones en el genoma que alteren la diana de restricción. En aquellos casos que se sospeche de una infección por cepas de campo y el análisis de restricción sugiera una cepa vacunal, se debe recurrir a la secuenciación del fragmento para confirmar su procedencia.

Agradecimientos

Este trabajo fue parcialmente financiado por el laboratorio Merial (Uruguay), el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) de Uruguay. Durante la investigación se utilizó equipamiento adquirido por el proyecto INIA FPTA 264 y por el proyecto «APOYO AL DESARROLLO DE LAS BIOTECNOLOGÍAS EN EL MERCOSUR-BIOTECH», N° ALA/2005/017/350 (Cadena de Producción de Carne Aviar).

Referencias Bibliográficas

- (1) Appel, M.J.; Summers, B.A. (1999). Canine Distemper: Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Carmichael, L.E. Ed. International Veterinary Information Service.
- (2) Calderon, M.G.; Remorini, P.; Periolo, O.; Iglesias, M.; Mattion, N.; La Torre, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341-349.
- (3) Decaro, N.; Camero, M.; Greco, G.; Zizzo, N.; Tinelli, A.; Campolo, M.; Pratelli, A.; Buonavoglia, C. (2004). Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol.* 27, 177-181.
- (4) Demeter, Z.; Lakatos, B.; Palade, E.A.; Kozma, T.; Forgách, P.; Rusvai, M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122, 258-269.
- (5) Demeter, Z.; Palade, E.A.; Hornyák, A.; Rusvai, M. (2009). Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet. Microbiol.* 142, 420-426.
- (6) Ek-Kommonen, C.; Sihvonon, L.; Pekkanen, K.; Rikula, U.; Nuotio, L. (1997). Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec.* 141, 380-383.
- (7) Frisk, A.L.; Konig, M.; Moritz, A.; Baumgartner, W. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluids from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634-3643.
- (8) Ferreyra, H.; Calderón, M.G.; Marticorena, D.; Marull, C.; Leonardo, B.C. (2009). Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *J. Wild Dis.* 45, 1158-62.

- (9) **Frolich, K., Czupalla, O., Haas, L., Hentschke, J., Dedek, J., Fickel, J.** (2000). Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet. Microbiol.* 74, 283-292.
- (10) **Gebara, C.M.S.; Wosiacki, S.R.; Negrao, F.J.; de Oliveira, D.B.; Beloni, S.N.E.; Alfieri, A.A.; Alfieri, A.F.** (2004). Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 480-487.
- (11) **Gemma, T.; Watari, T.; Akiyama, K.; Miyashita, N.; Shin, Y.S.; Iwatsuki, K.; Kai, C.; Mikami, T.** (1996). Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 547-550.
- (12) **Harder T.C.; Kenter M.; Vos H, Siebelink K.; Huisman W.; van Amerongen G.; Orvell C.; Barrett T.; Appel M.J.; Osterhaus A.D.** (1996). Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77, 397-405.
- (13) **Keawcharoen, J.; Theamboonlers, A.; Jantaradsamee, R.; Rungsipipat, A.; Poovorawan, Y.; Oraveerakul, K.** (2005). Nucleotide Sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol.* 105, 137-142.
- (14) **Kim, Y.; Cho, K.; Youn, H.; Yoo, H.; Han, H.** (2001). Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2, 59-63.
- (15) **Lamb, R.A.; Parks, G.D.** (2007). Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, 5^o Ed.
- (16) **Lan N.T.; 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.
- (17) **Lednicky, J.A.; Dubach, J.; Kinsel, M.J.; Meehan, T.P.; Bocchetta, M.; Hungerford, L.L.; Sarich, N.A.; Witecki, K.E.; Braid, M.D.; Pedrak, C.; Houde, C.M.** (2004). Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virol. J.* 2, 1:2.
- (18) **Nava, A.F.; Cullen, L. Jr; Sana, D.A.; Nardi, M.S.; Filho, J.D.; Lima, T.F.; Abreu, K.C.; Ferreira, F.** (2008). First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth* 5, 513-518.
- (19) **Pardo, I.; Johnson, G.C.; Kleiboeker, S.B.** (2005). Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5009-5017.
- (20) **Saito, T.B.; Alfieri, A.A.; Wosiacki, S.R.; Negrao, F.J.; Morais, H.S.A.; Alfieri, A.F.** (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80, 116-119.
- (21) **Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2^o ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- (22) **Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.
- (23) **Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.** (2000). Virus Taxonomy: The classification and nomenclature of viruses. Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 7, 1167.