

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS  
RESPIRATÓRIOS EM CÃES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Francielle Liz Monteiro**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

# **DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CÃES**

**Francielle Liz Monteiro**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientador: Prof. Rudi Weiblen**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CÃES**

elaborada por  
**Francielle Liz Monteiro**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Medicina Veterinária**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Rudi Weiblen, PhD.**  
(Presidente/Orientador)

**Luciane Teresinha Lovato, PhD. (UFSM)**

**Andréia Henzel, Dr. (FEEVALE)**

Santa Maria, RS, 20 de fevereiro de 2015

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente, agradeço a Deus por guiar o meu caminho e por todas as oportunidades, que me proporcionaram a concretização deste objetivo.

A toda minha família, em especial a minha mãe Nivia Teresinha Monteiro e minha irmã Greice Ane Monteiro, por todo o apoio durante a vida acadêmica.

Ao Diego Becker Borin, pelo amor incondicional e por toda paciência e incentivo, que não me permitiram desanimar diante dos obstáculos.

Aos meus orientadores, Rudi Weiblen e Eduardo Furtado Flores, pela oportunidade e confiança, e por todos os ensinamentos durante esses dois anos de convívio, que foram indispensáveis para o meu crescimento pessoal e profissional.

A todos os colegas e ex-colegas do Setor de Virologia, pelo companheirismo e amizade e por toda a colaboração durante a execução dos experimentos. Em especial, a Juliana Felipetto Cargnelutti, que não mediu esforços para a conclusão deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realizar o mestrado em um programa de excelência da CAPES; e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

Aos professores do curso de Biomedicina do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) pela motivação e por todos os ensinamentos, que despertaram em mim o interesse pela vida acadêmica; e aos amigos da graduação, que comemoraram comigo cada conquista.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação pessoal e profissional, muito obrigada!

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### DETECÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CÃES

AUTORA: FRANCIELLE LIZ MONTEIRO

ORIENTADOR: RUDI WEIBLEN

Santa Maria, 20 de fevereiro de 2015

Os vírus respiratórios de cães estão associados com uma enfermidade denominada doença respiratória infecciosa canina (*canine infectious respiratory disease* - CIRDC). Os principais agentes da CIRDC são o vírus da cinomose (*canine distemper virus* - CDV), vírus da parainfluenza canina tipo 2 (*canine parainfluenza virus* - cPIV), adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2* - CAAdV-2) e herpesvírus canino tipo 1 (*canid herpesvirus 1* - CaHV-1), que podem causar infecções simples ou mistas. A CIRDC ocorre com maior frequência em locais com alta densidade populacional e constante fluxo de animais. Infecções pelo CDV, cPIV, CAAdV-2 e CaHV-1 tem sido descritas em vários países, contudo, são escassos os relatos da identificação molecular desses agentes no Brasil. Além disso, há falta de estudos relacionados aos fatores que favorecem a ocorrência e disseminação desses agentes em cães de abrigos. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de vírus respiratórios em cães do município de Santa Maria, Rio Grande do Sul, e em cães de abrigos, buscando-se associar a ocorrência das infecções com as condições ambientais. Para isso, foram coletadas secreções nasais de cães com sinais respiratórios em clínicas veterinárias de Santa Maria; e de cães de três abrigos do estado do RS (dois em Cachoeira do Sul [#1 e #2] e um em Passo Fundo [#3]). A identificação viral foi realizada por reação em cadeia de polimerase (PCR) para o CDV, cPIV, CAAdV-2 e CaHV-1. As amostras positivas foram sequenciadas e, para alguns vírus, foi realizada a análise filogenética, comparando-se com sequências depositadas no GenBank. As amostras dos abrigos #1 e #3 foram obtidas durante épocas de baixas temperaturas. O abrigo #1 apresentava condições sanitárias e nutricionais precárias, além de alta densidade populacional e constante contato entre os cães. Neste abrigo, 78% (58/74) das amostras foram positivas para, pelo menos, um dos vírus investigados. As infecções simples foram causadas pelo cPIV em 30% (22/74) das amostras e CAAdV-2 em 5% (4/74). As coinfeções totalizaram 23% (17/74) para o cPIV e CAAdV-2; 13% (10/74) para o cPIV, CDV e CAAdV-2; 4% (3/74) para o cPIV e CDV; e 3% (2/74) para o CDV e CAAdV-2. Os abrigos #2 e #3 eram higienizados corretamente e os cães recebiam alimentação adequada, sendo que no abrigo #2 os animais possuíam amplo espaço para se exercitarem, e no abrigo #3 os animais eram separados em grupos e alojados em gaiolas. No abrigo #2 foram detectadas 8% de amostras positivas para o cPIV e 6% para o CaHV-1; e no abrigo #3, 8% de amostras positivas para o CAAdV-2 e 1% para o CDV. Das amostras obtidas em clínicas de Santa Maria, 40% (10/25) foram positivas para um dos vírus pesquisados, sendo 28% (7/25) para o cPIV, e 4% (1/25) para cada um dos outros vírus. Assim, os resultados obtidos demonstram que infecções e coinfeções por vírus respiratórios são comuns em cães de abrigos no estado do RS, estando relacionadas com a densidade populacional, condições sanitárias e nutricionais e estação do ano. Estes vírus também circulam em cães domésticos em Santa Maria, estando associados com doença respiratória. Este estudo reforça a importância de medidas de prevenção, tendo em vista que a vacinação e boas condições ambientais podem reduzir e/ou prevenir as infecções causadas por vírus respiratórios em cães.

Palavras-chave: vírus da cinomose canina, vírus da parainfluenza canina, adenovírus canino tipo 2, herpesvírus canino 1.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **MOLECULAR DETECTION OF RESPIRATORY VIRUSES IN DOGS**

**AUTHORESS: FRANCIELLE LIZ MONTEIRO**

**ADVISER: RUDI WEIBLEN**

Santa Maria, February 20<sup>th</sup>, 2015

The respiratory viruses of dogs are associated with a disease called canine infectious respiratory disease (CIRD). The main etiological agents of CIRD are canine distemper virus (CDV), canine parainfluenza virus (cPIV), canine adenovirus type 2 and canid herpesvirus type 1 (CaHV-1), which may cause single or mixed infections. CIRD occurs most frequently in places with high animal density and constant movement. CDV, cPIV, CAdV-2 and CaHV-1 infections have been described worldwide, however, few reports of molecular identification of these viruses are available in Brazil. Thus, the objective of this study was to investigate the occurrence of respiratory viruses in dogs in Santa Maria, RS, and in dog shelters in RS, trying to correlate their occurrence with the environmental conditions. Nasal secretions were collected from dogs with respiratory signs submitted to veterinary clinics in Santa Maria; and from dogs of three shelters of RS (Cachoeira do Sul [shelters #1 and #2] and Passo Fundo [shelter #3]). Viral detection/identification was performed by polymerase chain reaction (PCR) for CDV, cPIV, CAdV-2 and CaHV-1. Positive samples were sequenced and, for some viruses, phylogenetic analysis was performed, comparing with sequences deposited in GenBank. Samples of shelters #1 and #3 were obtained during the cold season. Shelter #1 presented poor sanitary and nutrition conditions, high animal density and constant direct contact among dogs. In this shelter 78% (58/74) of the respiratory samples were positive for at least one virus. The single infections were caused by cPIV in 30% (22/74) of the samples and CAdV-2 in 5% (4/74). Coinfections represented 23% (cPIV and CAdV-2); 13% cPIV, CDV and CAdV-2; 4% cPIV-2 and CDV; and 3% CDV and CAdV-2. Shelters #2 and #3 presented satisfactory sanitary and nutrition conditions, with large outdoors exercise areas (#2) and animal separation by groups (#3). In shelter #2, 8% (5/35) of the samples were positive to cPIV and 6% to CaHV-1; in shelter #3, 8% (7/77) of the samples were positive to CAdV-2 and 1% to CDV. Of samples obtained in Santa Maria, 40% (10/25) were positive for virus, being 28% (7/25) for cPIV, and 4% (1/25) to each of the other viruses. Thus, the results obtained demonstrate that infections and coinfections by respiratory viruses are common in shelter dogs in RS, and their occurrence is related to population density, health and nutritional conditions and season. These viruses are also circulating in domestic dogs in Santa Maria, associated with respiratory disease. This study reinforces the importance of preventive measures such as vaccination and good environmental conditions to prevent/reduce infections caused by respiratory viruses in dogs.

Key words: canine distemper virus, canine parainfluenza virus, canine adenovirus type 2, canid herpesvirus 1.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 (Fig.1) - Illustrative conditions of the shelters included in this study. A – *Shelter #1*. B – *Shelter #2*. C – *Shelter #3*..... 32
- FIGURA 2 (Fig.2) - Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of nucleoprotein gene (N) of canine distemper virus (CDV), being included the out-group of phocine distemper virus (PDV). The tree was constructed using the maximum likelihood method with 1,000 bootstrap replicates based on Kimura-2 parameter model and implemented by MEGA 5.0. Values >50% are shown..... 35
- FIGURA 3 (Fig.3) - Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of E3 protein gene (N) of canine adenovirus type 2 (CA<sub>2</sub>AdV), being included the out-group of human adenovirus D (HAdV D). The tree was constructed using the maximum likelihood method with 1,000 bootstrap replicates based on Kimura-2 parameter model and implemented by MEGA 5.0. Values >50% are shown..... 36

### CAPÍTULO 2

- FIGURA 1 (Fig.1) - Árvore filogenética baseada no gene da nucleoproteína (N) do vírus da cinomose canina (*canine distemper virus* - CDV). A árvore foi construída no programa MEGA 5.0 utilizando o método Neighbor-Joining, com bootstrap de 1000 replicatas. Valores >50% são mostrados..... 48
- FIGURA 2 (Fig.2) - Árvore filogenética baseada no gene da proteína E3 (N) do adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2* - CA<sub>2</sub>AdV). A árvore foi construída no programa MEGA 5.0 utilizando o método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas. Valores >50% são mostrados..... 49

## **LISTA DE TABELAS**

### **CAPÍTULO 1**

TABELA 1 (Table 1) - Primers used for detection of respiratory viruses by PCR in dog samples from shelters in RS state .....	33
TABELA 2 (Table 2) - Infections and coinfections by respiratory viruses in dog shelters in RS state .....	34



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 CAPÍTULO 1 – INFECTIONS AND COINFECTIONS BY RESPIRATORY VIRUSES IN SHELTER DOGS, RS, BRAZIL .....</b>	<b>16</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>17</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>18</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>19</b>
<b>Material and Methods .....</b>	<b>21</b>
<b>Results and Discussion .....</b>	<b>23</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>27</b>
<b>References .....</b>	<b>27</b>
<b>3 CAPÍTULO 2 – VÍRUS RESPIRATÓRIOS EM CÃES DE SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL .....</b>	<b>37</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>38</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>39</b>
<b>Nota .....</b>	<b>39</b>
<b>Referências .....</b>	<b>44</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>5 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os agentes causadores de doenças respiratórias em cães podem agir isoladamente ou associados em uma enfermidade, denominada de doença respiratória infecciosa canina (*canine infectious respiratory disease - CIRI*) (ERLES et al., 2004). Os principais vírus envolvidos na CIRI são o vírus da cinomose canina (*canine distemper virus - CDV*), o vírus da parainfluenza canina (*canine parainfluenza virus - cPIV*), o adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2 - CAIV-2*) e o herpesvírus canino 1 (*canid herpesvirus 1 - CaHV-1*) (ERLES et al., 2004).

A cinomose canina é uma doença infectocontagiosa multissistêmica, causada por um *Morbillivirus* da família *Paramyxoviridae*, sendo considerada uma das doenças infecciosas mais importantes de cães, principalmente devido ao seu impacto na saúde animal (LEISEWITZ et al., 2001; AMUDE et al., 2007; KAPIL et al., 2008). Sua natureza contagiosa é conhecida desde o século XIX, mas a etiologia viral somente foi demonstrada em 1905 por Henri Carré, a partir da inoculação de cães saudáveis com a secreção nasal de cães doentes (CARRÉ, 1905 apud LAIDLAW & DUNKIN, 1926). A partir de 1930, a cinomose passou a ser conhecida quanto a sua etiologia e manifestações clínicas (LAIDLAW & DUNKIN, 1926; APPEL & SUMMERS, 1999).

Assim como o CDV, o cPIV pertence a família *Paramyxoviridae*, contudo, é classificado no gênero *Rubulavirus* (ANDREWES et al., 1989). O cPIV é considerado o principal vírus associado à doença respiratória de cães, podendo também atingir uma ampla variedade de hospedeiros (UELANK, 1990; FRISK et al., 1999; ERLES et al., 2004; MOCHIZUKI et al., 2008; SCHULZ et al., 2014). Este vírus foi isolado pela primeira vez no ano de 1967 em cães com doença respiratória (BINN et al., 1967). Estudos posteriores demonstraram a presença do vírus no intestino, baço, fígado, cérebro e fluido cérebro-espinhal de cães, podendo causar, além da doença respiratória, doença sistêmica e encefalite, contudo, a infecção causada pelo cPIV geralmente é restrita ao trato respiratório (EVERMANN et al., 1980; BAUMGÄRTNER et al., 1982; MACARTNEY et al., 1985; DECARO et al., 2008).

Os vírus pertencentes à família *Paramyxoviridae* são pleomórficos, envelopados, com genoma RNA fita simples linear de polaridade negativa, diâmetro de 150 a 300nm e aproximadamente 16kb (ARNS et al., 2012). Uma das proteínas mais conservadas e utilizadas em estudos de diagnóstico é a nucleoproteína (*nucleoprotein - N*), responsável pela proteção do genoma contra a digestão por nucleases (DIALO, 1990; CASTILHO et al., 2007).

O CaHV-1 é classificado no gênero *Varicellovirus*, subfamília *Alphaherpesvirinae* e família *Herpesviridae*, tendo sido isolado pela primeira vez em 1964 como um agente fatal de cães neonatos (CARMICHAEL et al., 1965). São vírus DNA fita dupla linear, envelopados, de 120 a 300nm e com aproximadamente 150kb (FRANCO et al., 2012). A glicoproteína B (*glycoprotein B* - gB), uma das mais conservadas, é responsável pela adsorção viral, juntamente com a glicoproteína C (*glycoprotein C* - gC) (FRANCO et al., 2012). O CaHV-1, assim como o CDV e cPIV, que são vírus envelopados, são pouco resistentes no ambiente, e facilmente inativados por solventes lipídicos, substâncias com pH muito ácido ou muito básico, e temperaturas elevadas (LEISEWITZ et al., 2001; GALOSI et al., 2007). O aspecto mais marcante dos alphaherpesvirus é o estabelecimento de infecções latentes, podendo o vírus reativar em casos de queda da imunidade, estresse, gestação ou doenças prévias (RONSSE et al., 2004; LEDBETTER et al., 2009).

O CAdV é um vírus DNA de fita dupla linear, não envelopado, com diâmetro de 60 a 90nm e, aproximadamente, 35kb, pertencente ao gênero *Mastadenovirus* e família *Adenoviridae*, sendo a região E3 uma das mais conservadas do genoma, possuindo genes que codificam fatores de virulência (HU et al., 2001). O CAdV-2 foi detectado pela primeira vez no Canadá, em 1961, a partir de cães com laringotraqueíte (DITCHFIELD et al., 1962). A cepa recebeu o nome de Toronto A26/61, sendo inicialmente considerada como um adenovírus canino tipo 1 (*canine adenovirus type 1* - CAdV-1) (DITCHFIELD et al., 1962). Somente alguns anos mais tarde, foram observadas diferenças antigênicas e estruturais entre a nova cepa e o CAdV-1, o que determinou a classificação do Toronto A26/61 como CAdV-2 (YAMAMOTO & MARUSYK, 1968; FAIRCHILD & COMEN, 1969). Mesmo que os dois tipos virais sejam relacionados antigenicamente, com 75% de identidade de nucleotídeos, possuem diferente tropismo tecidual (HU et al., 2001).

O CAdV-1 possui tropismo pela células endoteliais e parenquimais hepáticas e renais, sendo considerado o agente responsável pela hepatite infecciosa canina (CAUDELL et al., 2005). Já o CAdV-2 possui tropismo pelo epitélio das vias respiratórias, e em grau limitado, pelo epitélio intestinal, sendo um dos principais agentes envolvidos na etiologia da Traqueobronquite Infecciosa Canina, conhecida como “tosse dos canis” (MORRISON et al., 1997; HU et al., 2001; CAUDELL et al., 2005). Devido à ausência de membrana lipídica, são vírus resistentes a condições ambientais e a solventes orgânicos, porém são inativados por desinfetantes à base de iodo, fenol e hidróxido de sódio (MORAES & COSTA, 2012).

A CIRD apresenta distribuição mundial, com maior ocorrência na estação de inverno, devido às baixas temperaturas e a baixa umidade do ar, que proporcionam a maior

aglomeração dos animais e os tornam mais susceptíveis às infecções respiratórias (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Além disso, cães jovens, imunossuprimidos ou que vivem em condições de estresse, não vacinados e filhotes que apresentem falhas na imunidade materna, são mais acometidos por infecções (FERNANDES & COUTINHO, 2004; MÖSTL et al., 2013; PESAVENTO & MURPLY, 2014).

A transmissão das viroses respiratórias ocorre principalmente através da inalação de aerossóis contendo partículas virais (APPEL & SUMMERS, 1999; PRIESTNALL et al., 2014). As infecções simples causadas pelos agentes da CIRD geralmente cursam subclínicas ou demonstram sinais clínicos leves, como febre, tosse seca, corrimento nasal e dispneia; podendo ocorrer manifestações mais graves dependendo da idade, dose infectante e status imunológico do animal (THRUSFIELD, AITKEN & MUIRHEAD, 1991; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Coinfecções também podem agravar o quadro clínico, com o desenvolvimento de broncopneumonia e até mesmo doença sistêmica e/ou encefalite, dependendo dos agentes etiológicos envolvidos (SHIROTA et al., 1980). Relatos de coinfecções são pouco frequentes, principalmente porque o diagnóstico, na maioria dos casos é realizado com base nos sinais clínicos, sem a identificação dos agentes etiológicos envolvidos (SHIROTA et al., 1980; CHVALA et al., 2007; HEADLEY et al., 2014).

A ocorrência de infecções pelos vírus respiratórios associados à CIRD parece ser elevada, sendo estimado que 30 a 100% dos cães domésticos possuem anticorpos contra o CaHV-1, enquanto que a soroprevalência do cPIV é de 30 a 70%, estando relacionada com a densidade populacional, já que é uma enfermidade altamente contagiosa e o vírus pode se disseminar rapidamente (BAUMGÄRTNER et al., 1985; FRANCO et al., 2012).

Os índices de morbidade e mortalidade entre os vírus envolvidos na CIRD podem ser elevados, sendo que as infecções de cães pelo CDV geralmente resultam em morbidade e mortalidade que pode variar de 30 a 70% (EK-KOMMONEN et al., 1997; GREENE & APPEL, 2006). Em infecções pelo CaHV-1, altas taxas são observadas em cães neonatos, devido a menor temperatura corporal, que é um fator predisponente para a infecção fatal por este vírus (CARMICHAEL et al., 1965; LOVE & HUXTABLE, 1976). Infecções simples pelo cPIV e CAdV-2 geralmente são subclínicas e a morbidade varia de 10 a 50%, enquanto que a mortalidade é considerada rara (SWANGO, 1997).

O CDV replica nas células epiteliais e em macrófagos do sistema respiratório superior, faringe e amígdalas, sendo seguido pela infecção dos linfonodos e disseminação sistêmica, desencadeando um quadro de imunossupressão (KAPIL et al., 2008). Por esta razão, infecções bacterianas secundárias são muitas vezes detectadas em cães com cinomose, além

de coinfeções por outros vírus, tais como CAdV-2 e CaHV-1 (SHIROTA et al., 1980; CHVALA et al., 2007; HEADLEY et al., 2014). Os principais sinais epiteliais observados são descarga nasal e ocular serosa a mucopurulenta, tosse, dispneia, vômito, diarreia e lesões oftálmicas (GREENE & APPEL, 2006; NEGRÃO et al., 2007). A infecção do sistema nervoso central (SNC) ocorre nos cães que não desenvolvem reposta imune eficiente para combater a infecção, sendo que os principais sinais clínicos são mioclonia, convulsões, rigidez cervical, paralisia dos membros inferiores, ataxia, mudanças comportamentais e desorientação (AMUDE et al., 2007).

O cPIV replica nas vias aéreas superiores e inferiores, sendo expelido pelas secreções respiratórias, assim, os sinais clínicos são característicos de traqueobronquite aguda auto-limitante (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Além disso, o cPIV tem maior afinidade pelos macrófagos alveolares, podendo causar pneumonia intersticial (SWANGO, 1997). Geralmente, os cães se recuperam da traqueobronquite entre 3 a 7 dias, após o surgimento dos sinais clínicos, sendo que a recuperação da infecção confere imunidade de longa duração (SWANGO, 1997). A presença da infecção pelo cPIV pode predispor o epitélio respiratório à entrada de outros patógenos, culminando com sinais clínicos graves (ERLES et al., 2004).

Assim como é observado com o cPIV, o CAdV-2 também é restrito ao trato respiratório, e a infecção resulta em sinais clínicos respiratórios leves a severos, em consequência da lesão do epitélio respiratório, inflamação aguda e perda da função dos cílios das vias aéreas (MORAES & COSTA, 2012). Os quadros graves geralmente ocorrem quando o vírus está associado com infecções bacterianas secundárias, principalmente pela *Bordetella bronchiseptica*, que possui importante papel na etiologia da traqueobronquite (FERNANDES & COUTINHO, 2004; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

O CaHV-1 está associado com doença respiratória e reprodutiva em cães adultos, podendo ocasionar rinite, faringite e traqueobronquite, além de balanopostite em machos e infertilidade, abortamento e vulvovaginite em fêmeas (HASHIMOTO et al., 1982; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007; EVERMANN et al., 2011). A transmissão aos filhotes pode ocorrer pela via transplacentária, mas principalmente pelas secreções oronasais da fêmea (HASHIMOTO et al., 1982; GALOSI, 2007). Após a infecção, o CaHV-1 replica na mucosa nasal, tonsilas e faringe, podendo ocorrer viremia associada à células, com consequente disseminação viral para o fígado, rins, tecidos linfáticos, pulmões e SNC (CARMICHAEL, SQUIRE & KROOK, 1965; EVERMANN et al., 2011). Clinicamente, os cães podem apresentar anorexia, dor abdominal, dispneia, diarreia e incoordenação motora, podendo ocorrer descarga nasal hemorrágica e petéquias nas mucosas (BUONAVOGLIA &

MARTELLA, 2007). Contudo, grande parte das infecções em cães adultos cursam subclínicas ou com sinais clínicos restritos ao trato respiratório (FRANCO et al., 2012). A gravidade da doença é observada em filhotes de até duas semanas, quando ocorre doença necrótica generalizada e hemorrágica, sendo fatal de 24 a 48 horas, na maioria dos casos (HASHIMOTO et al., 1982; OLIVEIRA et al., 2009). Em ninhadas acometidas pelo vírus, a mortalidade pode atingir 100% dos animais (DECARO et al., 2008).

Devido à diversidade de agentes causadores de doenças respiratórias em cães e da não especificidade dos principais sinais clínicos, o diagnóstico deve ser baseado na identificação dos vírus, seja por isolamento, detecção de antígenos ou de ácidos nucleicos virais (FERNANDES & COUTINHO, 2004). Atualmente, os métodos que utilizam a biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), têm contribuído com o diagnóstico etiológico de diversas viroses respiratórias em animais (NEGRÃO et al., 2007; MOCHIZUKI et al., 2008; SCHULZ et al., 2014). As principais vantagens dessa técnica, precedida por uma etapa de transcrição reversa (RT-PCR) para os vírus RNA, como o CDV e cPIV, incluem a rapidez na obtenção dos resultados e a alta sensibilidade e especificidade (FLORES & CARGNELUTTI, 2012). A sorologia pode auxiliar no diagnóstico, porém não é possível distinguir os anticorpos vacinais daqueles produzidos em resposta a um vírus circulante (ANDREWES et al., 1989). No Brasil, a sorologia para o CaHV-1 é importante, tendo em vista que não há vacina comercial disponível.

Atualmente, utilizam-se vacinas polivalentes como medida de prevenção do cPIV, CDV e CAdV-2, sendo recomendado três doses com intervalos de 21 a 30 dias, em filhotes a partir de 45 dias de idade, com reforço anual (SWANGO, 1997; EDIMBORO et al., 2004). Embora a vacinação tenha reduzido a incidência de infecções respiratórias em cães, não há comprovação da sua eficácia absoluta e fatores como a persistência do vírus no ambiente e em animais portadores, a presença de variantes e a ocorrência de falhas vacinais, favorecem a circulação dos vírus na população canina (BÖHM et al., 2004; FERNANDES & COUTINHO, 2004).

A presença de vírus respiratórios em cães já foi descrita em diversos países (HARTMANN et al., 2007; ERLES et al., 2004; MOCHIZUKI et al., 2008; SCHULZ et al., 2014). Um estudo realizado no Reino Unido com cães de abrigos vacinados para cPIV, CAdV-2 e CDV, demonstrou a presença de cPIV e CaHV-1 em amostras da traqueia e pulmões (ERLES et al., 2004). Um estudo semelhante realizado na Alemanha, porém, comparando cães com doença respiratória aguda e cães saudáveis, de abrigos e de

propriedades privadas, demonstrou que a maior ocorrência de vírus respiratórios (cPIV e CaHV-2) foi em cães doentes e de abrigos (SCHULZ et al., 2014). Estes estudos demonstram a ocorrência de vírus respiratórios em cães de abrigos, e a maior ocorrência do cPIV, mesmo em animais vacinados. Contudo, os resultados obtidos não são relacionados com as condições ambientais observadas nos abrigos.

Relatos clínicos e/ou a identificação dos patógenos envolvidos em doença respiratória são escassos, sendo utilizada com maior frequência a sorologia para CDV, cPIV, CaHV-2 e CaHV-1 (MOCHIZUKI et al., 2008; BULUT et al. 2013). No Japão foram realizados estudos moleculares para a detecção de vírus respiratórios na secreção nasal de cães domésticos com sinais clínicos, demonstrando a presença de CaHV-2, cPIV e CDV (MOCHIZUKI et al., 2008). Um estudo sorológico realizado na Turquia em cães com sinais clínicos de infecção respiratória e cães de abrigos, demonstrou a presença de CaHV nas duas diferentes populações (BULUT et al., 2013). Contudo, com a sorologia não é possível diferenciar entre o CaHV-1 e CaHV-2, e assim como é observado com o CDV e cPIV, não há distinção entre anticorpos vacinais de infecciosos. A sorologia para o CaHV-1 também é descrita na literatura, sendo importante em países que não realizam a vacinação (RONSSE et al., 2005; DAHLOM et al., 2009 ; YESILBAG et al. 2012).

No Brasil, um estudo sorológico realizado com cães domésticos da cidade de Santa Maria (Rio Grande do Sul/RS) durante os anos de 2004 e 2005, relatou que 43% (353/817) dos animais foram positivos para o CaHV e 27,3% (223/817) para o CDV, demonstrando que os vírus investigados poderiam estar circulantes na população canina da cidade (DEZENGRINI et al., 2007). Contudo, somente a detecção do agente etiológico pode confirmar a presença destes vírus na população estudada, sendo importante para a adoção de medidas de controle e/ou para verificar a adequação de vacinas e protocolos de vacinação.

Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença do CDV, cPIV, CaHV-2 e CaHV-1 em secreções nasais de cães de abrigos com diferentes condições sanitárias e nutricionais, na tentativa de correlacionar a ocorrência de infecções virais com as condições epidemiológicas observadas; e investigar a presença de infecções virais respiratórias em cães com sinais clínicos de infecção respiratória aguda na cidade de Santa Maria, RS.

## **2. CAPÍTULO 1**

**Infections and coinfections by respiratory viruses in shelter dogs, RS, Brazil**

Francielle L. Monteiro, Juliana F. Cargnelutti, Mathias Martins, Deniz Anziliero, Magnólia  
M. Erhardt, Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores

(Artigo submetido à revista *Pesquisa Veterinária Brasileira* – 2015)



## Infections and coinfections of respiratory viruses in shelter dogs, RS, Brazil<sup>I</sup>

Francielle L. Monteiro<sup>II</sup>, Juliana F. Cargnelutti<sup>II</sup>, Mathias Martins<sup>II</sup>, Deniz Anziliero<sup>II,III</sup>,  
Magnólia M. Erhardt<sup>II</sup>, Rudi Weiblen<sup>II</sup> and Eduardo F. Flores<sup>II,\*</sup>

**ABSTRACT.-** Monteiro F.M., Cargnelutti J.F., Mortari A.P.F., Anziliero D., Erhardt M.M., Weiblen R. & Flores E.F. 2014. **[Infections and coinfections by respiratory viruses in shelter dogs, RS, Brazil.]** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Setor de Virologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Prédio 20, Sala 4200, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

The main viruses associated with canine infectious respiratory disease (CIRD) are canine distemper virus (CDV), canine parainfluenza virus type 2 (cPIV-2), canine adenovirus type 2 and canine herpesvirus 1 (CaHV-1). These infectious are especially important in places with high animal density and constant movement. Although these viruses are distributed worldwide, little information is available about them in Brazil. The objective of this study was to investigate the occurrence of respiratory viruses in dog shelters in Rio Grande do Sul state (RS), Brazil, trying to correlate their occurrence with the environmental conditions. For this, nasal secretions were collected from asymptomatic and sick animals from three shelters of RS (Cachoeira do Sul [shelters #1 and #2] and Passo Fundo [shelter #3]) and tested by PCR for each virus, followed by nucleotide sequencing of the amplicons. Samples of *shelters #1* and *#3* were obtained during the cold season. *Shelter #1* presented poor sanitary and nutrition conditions, high animal density and constant contact among dogs. In this shelter 78% (58/74) of the respiratory samples were positive for at least one virus. The single infections were caused by cPIV in 30% (22/74) of the samples and CAAdV-2 in 5% (4/74). Coinfections represented 23% (cPIV and CAAdV-2); 13% cPIV, CDV and CAAdV-2; 4% cPIV-2 and CDV; and 3% CDV and CAAdV-2. Shelters *Shelters #2* and *#3* presented satisfactory sanitary and nutrition conditions, with large outdoors exercise areas (*#2*) and animal separation by groups (*#3*). In *shelter #2*, 8% (5/35) of the samples were positive to cPIV and 6% to CaHV-1; in the *shelter #3*, 8% (7/77) samples were positive to CAAdV-2 and 1% to CDV.

<sup>I</sup> Recebido em .....

Aceito em .....

<sup>II</sup> Setor de Virologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 20, Sala 4200, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. \*Autor para correspondência: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com)

<sup>III</sup> Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade Meridional (IMED), R. Senador Pinheiro 304, Passo Fundo, RS 99070-220, Brasil.

The sequences obtained from the amplified products resulted in a 98 to 100% identity with sequences deposited in GenBank for the nucleoprotein gene of cPIV and CDV, E3 gene of CAdV-2 and glycoprotein B gene of CaHV-1. Our results demonstrate that respiratory viral infections, especially involving cPIV and/or CAdV-2 and/or CDV, and less frequently CaHV-1, are common in dog shelters in RS state, Brazil and their frequency is related to dog density, sanitary and nutrition conditions, and year season.

INDEX TERMS: canine distemper virus, canine parainfluenza virus, canine adenovirus type 2, canid herpesvirus 1.

**RESUMO.-** Os principais vírus associados com a doença respiratória infecciosa canina (*canine infectious respiratory disease - CIRI*) são o vírus da cinomose (*canine distemper virus - CDV*), vírus da parainfluenza canina tipo 2 (*canine parainfluenza virus - cPIV-2*), adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2 - CAdV-2*) e herpesvírus canino 1 (*canine herpesvirus 1 - CaHV-1*). Essas infecções são frequentes especialmente em locais com alta densidade populacional e constante fluxo de animais. Embora esses vírus apresentem distribuição mundial, existem poucos relatos sobre sua ocorrência no Brasil. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de vírus respiratórios em cães de três abrigos no estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, buscando-se associar a sua presença com as condições ambientais. Secreções nasais coletadas de cães assintomáticos e com sinais respiratórios de três abrigos do RS (dois em Cachoeira do Sul [#1 e #2] e um em Passo Fundo [#3]) foram submetidas à detecção de ácidos nucleicos virais por PCR seguido de sequenciamento dos amplicons. As amostras dos *abrigos #1* e *#3* foram coletadas em épocas de baixas temperaturas. O *abrigo #1* apresentava condições sanitárias e nutricionais precárias, alta densidade e constante contato entre os animais. Neste abrigo, 78% (58/74) das amostras foram positivas para, pelo menos, um dos vírus investigados. As infecções simples foram causadas pelo cPIV em 30% (22/74) das amostras e CAdV-2 em 5% (4/74). As coinfeções totalizaram 23% (17/74) para o cPIV e CAdV-2; 13% (10/74) para o cPIV, CDV e CAdV-2; 4% (3/74) para o cPIV e CDV; e 3% (2/74) para o CDV e CAdV-2. Os *abrigos #2* e *#3* eram higienizados corretamente e os cães recebiam alimentação adequada, sendo que no *abrigo #2* havia amplo espaço para se exercitarem, e no *abrigo #3* os animais eram separados em grupos e alojados em gaiolas. No *abrigo #2* foram detectadas 8% de amostras positivas para o cPIV e 6% para o CaHV-1; e no *abrigo #3*, 8% de amostras positivas para o CAdV-2 e 1% para o CDV. As sequências obtidas dos produtos amplificados resultaram em 98 a 100% de

identidade com sequências depositadas no GenBank para o gene da nucleoproteína do cPIV e CDV, gene da E3 do CAdV-2 e gene da glicoproteína B do CaHV-1. Esses resultados demonstram que as infecções virais respiratórias, principalmente envolvendo o cPIV e/ou CDV e/ou CAdV-2 e, e com menor frequência o CaHV-1, são comuns em cães de abrigos no RS, e sua frequência parece estar relacionada com a densidade animal, condições sanitárias e nutricionais, e com a estação do ano.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** vírus da cinomose canina, vírus da parainfluenza canina, adenovírus canino tipo 2, herpesvírus canino 1.

## INTRODUCTION

Canine infectious respiratory disease (CIRD) may be associated with single virus infections or with multifactorial etiology, being assigned to infectious agents that replicate sequentially or in synergism (Priestnall et al. 2014). The main viral agents involved in CIRD include canine distemper virus (CDV), canine parainfluenza 2 (cPIV-2); canine adenovirus type 2 (CAdV-2) and canine herpesvirus 1 (CaHV-1) (Erles et al. 2004).

In Brazil, CDV infection is endemic in dog populations and is associated with respiratory and/or multisystemic disease, causing thousands of deaths every year (Headley & Graça 2000, Amude et al. 2007). Due to its impact in animal health, canine distemper is one of the most important infectious diseases of dogs (Erles et al. 2004, Chvala et al. 2007). Similarly to CDV, CAdV-2 has a worldwide distribution and it is a major agent of canine infectious tracheobronchitis (CIT) or “kennel cough”, a disease characterized by restricted infection of the respiratory system (Decaro et al. 2008). cPIV-2 has a wide distribution in canine populations, with an estimated seroprevalence ranging from 30 to 70% (Baumgärtner 1985). cPIV-2 infection is related to high population density since the virus is highly transmissible and presents a fast dissemination among animals (Erles et al. 2004). Although veterinarians frequently diagnose these infections clinically in dogs, only a few published reports describe CAdV-2 and cPIV-2 infections in Brazil (Dezengrini et al. 2007, Hartmann et al. 2007).

CaHV-1 has a worldwide distribution and it is associated with respiratory and reproductive disease (Evermann et al. 2011). Like other *alphaherpesviruses*, CaHV-1 establishes latent infections in nerve ganglia and can periodically reactivate the infection, mainly due to stressful conditions, immunosuppression and concomitant disease (Ledbetter et al. 2009). It is estimated that 30 to 100% of domestic dogs have antibodies to CaHV-1

(Franco et al. 2012). Only a few reports describe the occurrence of CaHV-1 infections in Brazil (Oliveira et al. 2009, Cargnelutti et al. 2015).

The transmission of respiratory viruses occurs by direct or indirect contact among animals, mainly through contaminated nasal secretions and aerosols (Priestnall et al. 2014). Then, viral dissemination is facilitated in areas with high animal density and intense animal movement. CIRDC may affect dogs of both genders and ages, but puppies under 90 days-old are more susceptible, as well as immunosuppressed dogs, animals without history of vaccination or due to failures in vaccine or maternal immunity (Fernandes & Coutinho 2004). The disease presents a seasonal pattern with higher incidence in cold months (Buonavoglia & Martella 2007).

The clinical manifestations of CIRDC vary according to the agents involved in each case, and may be nearly subclinical, accompanied by mild respiratory signs, nasal discharge, dyspnea, fever and dry cough and, sometimes, associated with choking and vomiting; or even more severe, with interstitial pneumonia or bronchopneumonia (Thrusfield et al. 1991). Concomitant infection by one or more viruses, associated with secondary bacterial infection may worsen the clinical course. On the other hand, infection of adult dogs may be frequently asymptomatic (Buonavoglia & Martella 2007).

The diagnosis of CIRDC is largely based on the epidemiology, clinical signs and response to therapy. However, the etiologic diagnosis requires the identification of the agent or its products (proteins, nucleic acids) (Amude et al. 2007). Vaccination is largely used to prevent or control respiratory infections of dogs and helps to minimize the clinical disease, yet the current vaccines are not always effective (Fernandes & Coutinho 2004).

In Brazil, in spite of the wide distribution of these infections and the informal reports by veterinarians, very few reports describe viral respiratory disease in dogs (Gebara et al. 2004, Negrão et al. 2007, Oliveira et al. 2009). In addition, there are little information about these infections occurring in locals with high density and constant animal movement like dog shelters. The identification of the more prevalent respiratory viruses of dogs from different epidemiological conditions is essential to determine efficient control and prevention measures.

Then, the objective of this study was to investigate respiratory viral infections in dogs in shelters located in Rio Grande do Sul state, Brazil. For this, three shelters presenting diverse sanitary and nutrition conditions were included in attempts to correlate the occurrence of viral infections with the epidemiologic conditions. The viruses were detected in nasal secretions by polymerase chain reaction (PCR), focusing on the main agents involved in this

condition (CDV, cPIV-2, CAdV-2 and CaHV-1), with subsequent phylogeny of the identified viruses.

## MATERIAL AND METHODS

Dogs from three shelters located in Rio Grande do Sul state (RS), Brazil, were included in this study. Two shelters are located in Cachoeira do Sul (30° 02' 21" S and 52° 53' 38" W), and one in Passo Fundo (28° 15' 46" S and 52° 24' 24" W), distant approximately 200 and 300km from Porto Alegre (RS state capital), respectively. The distance between both shelters in Cachoeira do Sul is 7.5km, and both are distant approximately 270km from the Passo Fundo shelter.

Figure 1 illustrates the environmental conditions observed in these shelters. *Shelter #1* (Cachoeira do Sul) hosts street dogs and cats of both genders, of all ages and, mainly, crossbred animals. The animal population in the shelter in the sampling date was 150 dogs and 30 cats. The young dogs (six months up to two years-old) and adults (more than two years-old) were maintained in individual cages/small barns held by leashes in an open space, and most animals had direct and indirect contact among them. Small sized, middle and large dogs had individual cages/houses shelters with the same area (approximately 1m<sup>2</sup>). Puppies were maintained in collective cages, indoors, without direct contact with adult animals. *Shelter #1* was visited in the cold season, when the temperatures ranged of 5 to 10°C (winter). Upon the visit, several animals presented nasal discharge, indicating respiratory infection. Sanitary and nutritional conditions were precarious, and the local was not cleaned up recently. The animals did not receive good quality food and were not fed adequately.

*Shelter #2* (Cachoeira do Sul) hosts street dogs of both genders, independent of age and mainly crossbred animals. In the day of the visit, the number of animals was 70. During the day, the animals stayed outdoors in fenced areas or held by leashes, grouped according the gender and age. During the night, the animals were allocated indoors, in collective cages, with approximately 10 animals/cage. The dogs had a wide area to run and exercise during the day, and had contact among them. *Shelter #2* was visited when the environmental temperatures ranged of 15 to 20°C (fall). Sanitary and nutritional conditions were fair to good and the animals were fed once a day and the cages were cleaned three times a week.

*Shelter #3* (Passo Fundo) hosts street dogs and cats, of both genders, of varied ages and mainly crossbred animals. At the visit, 180 dogs and 20 cats were present in the shelter. The dogs were allocated according to gender and age in collective fenced barns which had at least one dog-house per animal. The animals had constant direct contact with other animals

from the same cage/barn. The individual area was, in general, 3m<sup>2</sup>/animal. The shelter was visited when the ambient temperatures ranged of 5 to 10°C (winter). Sanitary and nutritional conditions were good, the cages were cleaned once a day, and the animals had clean water *ad libitum* and they were fed three times a day.

Nasal swabs of 74, 35 and 77 dogs of *shelters* #1, #2 and #3, respectively, were collected from animals with and without respiratory signs. After sample collection, the swabs were maintained in RNAlater solution (Life Technologies, Carlsbad, CA), and the samples remained in dry ice during transport to the laboratory, when they were stored at -80°C. All proceedings involving animal manipulation were performed by supervision of a Veterinary and according to recommendations of Brazilian Committee of Animal Experimentation (Comitê Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, law #6.638, May 8, 1979). This research was approved by institutional Ethics Committee and Animal Welfare (UFMS, Comitê de Ética e Experimentação Animal: approval number 080/2014).

RNA and DNA extraction from nasal swabs were performed using RTP DNA/RNA virus extraction kit (Invitex, Berlin, DE) according to manufacturer's instructions. After RNA extraction, complementary DNA (cDNA) was synthesized using enzyme Super Script III reverse transcriptase kit (Life Technologies, Carlsbad, CA). PCR reactions were initially standardized to optimize the concentration of each reagent. Viruses obtained from a commercial vaccine (Imuno-Vet<sup>®</sup>) were used as controls for CDV, cPIV and CAdV-2. For CaHV-1, nucleic acid extracted from the liver of a puppy naturally infected with CaHV-1 was used as control (Oliveira et al., 2009). Ultrapure water was used as negative control in all reactions. The primers used in all reactions are described in Table 1. All reactions were performed using total volume of 25µl, with 2µl of total DNA (100 to 200ng), according PCR conditions described to each virus. Primers to cPIV-2 were obtained in Clone Manager 7 program (<http://www.scied.com>) and the sequences are shown in Table 1. PCR reaction to cPIV was performed following the conditions: one step at 95°C for 7 min, followed by 35 cycles of denaturation (95°C, 45sec), primer annealing (50°C, 1min) and extension (72°C, 45sec), and a final extension of 7min at 72°C. PCR products were resolved in a 1.5% agarose gel stained by Gel Red<sup>®</sup> (Biotium, Hayward, CA, USA) and visualized under UV light after electrophoresis (60V, 40min).

For nucleotide sequencing, 90µL of each PCR product were purified by PureLink<sup>®</sup> Quick Gel Extraction and PCR purification Combo Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. The samples were sequenced in quadruplicates in an automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, Foster City, CA). The obtained sequences were analyzed by Staden program (Staden, 1996) for consensus sequences achievement. Sequence alignment was performed using the program BioEdit Sequence Alignment Editor Software suite, version 7.0.5.3 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). The sequences identities were analyzed in Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences amplified from the four viruses was performed in MEGA 5.0 software, using Neighbor-Joining method, with bootstrap of 1000 replicates, and the evolutionary distance was established using Kimura-2 parameter method (Tamura et al. 2011). Molecular analysis and/or phylogenetic trees were constructed using sequences obtained from GenBank and partial sequences of amplified samples from this work: CDV nucleoprotein gene (amplified samples from *shelter #1*: 1.9, 1.18 and 1.42; *shelter #3*: sample 3.5), cPIV-2 nucleoprotein gene (amplified samples from *shelter #1*: 1.35, 1.39, 1.47, 1.76 and 1.85, and *shelter #2*: sample 2.23), CA $\Delta$ V-2 E3 gene (amplified samples from *shelter #1*: 1.4, 1.6, 1.11 and 1.18; and *shelter #3*: 3.55 and 3.70), and CaHV-1 glycoprotein B gene (amplified samples from *shelter #2*: 2.25 and 2.23).

## RESULTS AND DISCUSSION

The present study investigated the presence of the main respiratory viruses of dogs in three shelters in Rio Grande do Sul state, Brazil. For this, nasal secretions were collected from symptomatic and asymptomatic animals and tested by PCR for each agent. Considering the previous serological studies on canine respiratory viruses in Brazil (Dezengrini et al. 2007, Hartmann et al. 2007), the major difference of this investigation was the direct detection and identification of the viral agents involved in CIRDC, in single or mixed infections, and their phylogenetic analyses.

The obtained results showed the occurrence of infections by the main canine respiratory viruses in these shelters, with different frequencies and combinations of single and mixed infections. In *shelter #1*, 78% of the 74 samples were positive for at least one virus, being cPIV the most frequent agent detected (70% of the samples). This virus was detected in single (30%) or in mixed infections, associated with CA $\Delta$ V-2 (23%) and CDV (4%), or both (13%). CDV and CA $\Delta$ V-2 were found in a high percentage of animals, especially in coinfections (Table 2). In *shelters #2* and *#3*, unlike observed in *shelter #1*, only a small percentage of samples were positive for virus, and only in single infections. In *shelter #2*, cPIV was detected in 8% of the samples and CaHV-1 was detected in 6%. In *shelter #3*, 8% of the samples were positive to CA $\Delta$ V-2 and 1% to CDV (Table 2). The different sanitary and

nutrition conditions, dog crowding/density and the year season/ambient temperature and humidity in which the samples were collected may explain the significant differences in the percentage of positive samples among the three shelters.

*Shelter #1* had precarious nutritional and sanitary condition, poor infrastructure and poor food quality (Figure 1A). In *shelter #2* the animals had a wide outdoors area to play and exercise, but dogs of different ages had direct contact among them (Figure 1B). Figure 1C shows *shelter #3*, with individual dog-houses and cages with low population density and good sanitary condition (approximately six dogs/cage). Factors associated to animal overcrowding, like as excessive noise, poor air quality and diet, besides bad kennel cleaning may cause stress, favoring dissemination of infectious agents (Möstl et al. 2013, Pesavento & Murphy 2014). Animal stress results in excessive release of endogenous cortisol that interferes in the immune response allowing dissemination of infectious agents among immunosuppressed animals (Griffin 1989). Thus, increased vulnerability to many infectious diseases may ensue (Griffin 1989), including respiratory disease (Priestnall et al. 2009). Thus, the poor sanitary and nutrition conditions of *shelter #1* may have possibly favored the high rate of animals shedding virus in nasal secretions.

In this shelter, CDV, cPIV-2 and CAAdV-2 were detected in single or mixed infections, corresponding to 78% of positive dogs. cPIV was detected in 70% of the samples, wherein 30% in single infections and 40% associated with CAAdV-2 and/or CDV. cPIV-2 is considered the major virus involved in respiratory disease in dogs (Uelank 1990, Frisk et al. 1999, Erles et al. 2004, Mochizuki et al. 2008, Schulz et al. 2014), with estimated seroprevalence of 30 to 70% (Baumgärtner 1985). cPIV infection has been especially reported in conditions of high animal density since this virus is highly transmissible among dogs (Erles et al. 2004). cPIV infection produces pathology in tracheal epithelium (Hartmann et al. 2007), favoring secondary infections by other pathogens, as CAAdV-2, that also replicates in the respiratory system (Decaro et al. 2008).

In shelter #1, CDV was detected only associated with CAAdV-2 and/or with cPIV-2, corresponding to 20% of the positive samples. CDV replication occurs in epithelial cells and macrophages of the upper respiratory system, pharynx and tonsils, following by lymph node infection and systemic dissemination that can evolve to multisystem disease and immunosuppression (Kapil et al. 2008). For this reason, bacterial secondary infections are often detected in dogs with distemper, in addition to coinfection by other viruses, such as CAAdV-2 and CaHV-1 (Shirota et al. 1980, Chvala et al. 2007, Headley et al. 2014). Thus, the



immunosuppression caused by CDV infection may help in explaining its detection frequently associated with other viruses.

CAdV-2 detection in 44% of samples from *shelter #1* may have been influenced by the high cPIV-2 and CDV infections in the kennel, since cPIV-2 promotes primary lesions in the tracheal epithelium (Hartmann et al. 2007) and CDV induces immunosuppression (Kapil et al. 2008), favoring secondary viral infection. In addition, adenoviruses are highly resistant in environmental conditions and remain viable in the environment for a long time, favoring dissemination among animals (Decaro et al. 2008). In fact, high prevalence of CAdV in dog populations has been reported in shelters without history of vaccination (Taguchi et al. 2011, Bulut et al. 2013).

An investigation of respiratory viruses in dogs in Germany analyzed 58 samples of shelter animals with and without respiratory signs, and detected 22.4% (13/58) of positive to cPIV-2, being one positive to CAdV-2 and cPIV-2 (Schulz et al. 2014). A similar study carried in Germany examined 68 nasal swabs of domestic dogs (Mochizuki et al. 2008), showing that 7.4% (5/68) of samples were positive to cPIV, 2.9% (2/68) to CAdV-2 and 1.5% (1/68) to CDV. Regardless the different frequencies, these studies have reported cPIV-2 as the most frequent respiratory virus of dogs, followed by CAdV-2 and CDV.

In despite of a few reports of direct diagnosis of respiratory viruses of dogs, some serological studies have been performed in Brazil (Dezengrini et al. 2007, Hartmann et al. 2007). In southern Brazil, a serological investigation of 817 domestic dogs without vaccination history showed 43% of animals seropositive to CAdV and 27.3% to CDV (Dezengrini et al. 2007). A similar study was conducted in a population of 173 dogs of shelters, also from RS state, in which antibodies to cPIV-2 and CDV were detected in 51.4% and 4.1-9.3% of the samples, respectively (Hartmann et al. 2007). These studies showed that respiratory viruses circulate among domestic and shelter dogs in southern Brazil, in varied combinations and prevalence, probably reflecting environmental and epidemiological differences among regions and dog populations.

In *shelters #2* and *#3*, the respiratory viruses were detected only in single infections, with 14% of infections caused by cPIV-2 or CaHV-1 (*shelter #2*), and 9% by CDV or CAdV-2 (*shelter #3*). CaHV-1 was detected in samples collected only from dogs of *shelter #2*, corresponding to 6% of collected samples. Interestingly, CaHV-1 was detected in a shelter with good sanitary and structural conditions, and when the environmental temperatures were mild (15 to 20°C). Although CaHV-1 may cause respiratory disease in dogs, the infection has been associated with other clinical outcomes, e.g. reproductive disease (Erles & Brownlie

2005), but also in dog populations without reproductive disease (Dahlbom et al. 2009). In Finland, a higher frequency of CaHV-1 infection was observed among shelter dogs with history of reproductive disease (approximately 100%) than in a dog shelter without reproductive failure (65%) (Dahlbom et al. 2009).

Due to the ability of CaHV-1 to remain latent in the host, its diagnosis in dog populations should preferentially be performed by serological testing (Ronsse et al. 2002, Nöthling et al. 2008, Babaei et al. 2010, Yesilbag et al. 2012). In this sense, we detected positive serology for CaHV-1 in 7 out of 8 dogs in *shelter #1* (not shown). A two year longitudinal investigation in a shelter in the United States, involving 211 necropsied dogs, showed CaHV-1 involvement in 12.8% and 9.6% of trachea and lung samples, respectively, reinforcing the involvement of CaHV-1 in respiratory disease in dogs (Erles et al. 2004).

After virus detection by PCR, amplicons of some positive samples were submitted to nucleotide sequencing and analysis. Comparison of nine cPIV-2 sequences from *shelter #1* and one from *shelter #2* with sequences deposited in GenBank resulted in 100% identity in the nucleoprotein gene. The limited number of base pairs generated from the consensus precluded the construction of a phylogenetic tree.

A phylogenetic tree was constructed based on conserved gene nucleoprotein using three CDV sequences from *shelter #1*, one sample from *shelter #3*, and some sequences obtained from GenBank (Figure 2). All analyzed samples grouped together with the CDV sequences deposited in GenBank. The sequences of *shelter #1* and *shelter #3* grouped in separate clusters, indicating divergence and, likely, different origins of these viruses. These sequences also grouped separately from N gene sequences obtained from other countries and sequences obtained from the brain of dogs collected between 2000 and 2004 in Brazil (AU738624 and DQ005128) (Castilho et al. 2007). Taken together these results show a certain genetic variability of the N gene of CDV circulating in Brazil.

A phylogenetic tree based on conserved gene E3 protein of CAdV-2 was also constructed, using four sequences from *shelter #1*, two samples from *shelter #3*, and some sequences obtained from Genbank (Figure 3). Again, all samples grouped with the CAdV-2 sequences deposited in GenBank on a separate cluster of CAdV-1 sequences. The molecular and phylogenetic analysis based on the E3 protein has been widely used and is able to discriminate CAdV-1 from CAdV-2 (Hu et al. 2001, Erles et al. 2004, Balboni et al. 2013). Thus, these data indicates that CAdV-1 circulating in these shelters are genetically stable, as indicated by the high conservation of the E3 gene sequence.

The samples of CaHV-1 detected in *shelter #2* were compared with samples of Genbank, and presented 100% of nucleotide identity based on glycoprotein B gene. The molecular analysis of other CaHV-1 glycoprotein B also resulted in high nucleotide identity with CaHV-1 sequences (Erles et al. 2004).

## CONCLUSION

The results obtained in this research showed that respiratory virus infections (cPIV, CDV, CAdV-2 and CaHV-1) are common in dog shelters in RS. The frequency and dissemination of these viral infections seem to be related to high population density, poor sanitary and nutritional conditions, and/or with season/weather. These results also indicate the need of control/prevention measures, like vaccination and good environmental conditions, to minimize these infections in shelter dogs. In special, cPIV-2 infection seems to play a predominant role in winter respiratory infection in dog shelters and deserves attention regarding to preventive measures, especially vaccination, since many canine vaccines do not contain this agent in their formulations.

**Acknowledgements.-** We thank to Mariana Balbinotti Corradi and Raquel Durand Coelho by collaboration during sample collections. F.L. Monteiro, J.F. Cargnelutti, M. Martins, E.F. Flores e R. Weiblen are research fellows from CNPq.

## REFERENCES

- Amude A.M., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2007. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sci.* 82:416-422.
- Babaei H., Akhtardanesh B., Ghanbarpour R. & Namjoo A. 2010. Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman city South-east of Iran. *Transbound Emerg. Dis.* 57:348-351.
- Balboni A., Verin R., Morandi F., Poli A., Prospero S. & Battilani M. 2013. Molecular epidemiology of canine adenovirus type 1 and type 2 in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in Italy. *Vet. Microbiol.* 162:551-557.
- Baumgärtner W.K. 1985. Canine parainfluenza virus, p. 77-83. In: Richard G., Steven Krakowka, James R. Blakeslee & Jr. Olsen, *Comparative Pathobiology of Viral Diseases*. Vol.2 ed. Boca Raton: CRC.

- Bulut O., Yapici O., Avci O., Simsek A., Atli K., Irmak D., Yavru S., Hasirciogiu S., Kale M. & Mamak N. 2013. The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *Sci. World J.* 2013: 6 pages.
- Buonavoglia C. & Martella V. 2007. Canine respiratory viruses. *Vet. Res.* 30:355-373.
- Cargnelutti J.F., Masuda E.K., Neuls M.G., Weiblen R. & Flores, E.F. 2015. Outbreaks of canid herpesvirus 1 in puppies from southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* In press.
- Castilho J.G., Brandão P.E., Carnielli Jr. P., Oliveira R.N., Macedo C.I., Peixoto Z.M.P., Carrieri M.L. & 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.
- Chvala S., Benetka V., Möstl K., Zeugswetter F., Spargser J. & Weissenböck H. 2007. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and mycoplasma cynos infection in a dog with pneumonia. *Vet. Pathol.* 44:508-512.
- Dahlbom M., Johnsson M., Myllys V., Taponen J. & Andersson M. 2009. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and brucella canis in finnish breeding kennels with and without reproductive problems. *Reprod. Domest. Anim.* 44:128-131.
- Decaro N., Martella V. & Buonavoglia C. 2008. Canine adenoviruses and herpesviruses. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 38:799-814.
- Dezengrini R., Weiblen R. & Flores, E.F. 2007. Seroprevalence of parvovirus, adenovirus, coronavirus and canine distemper virus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc. Rural* 37:183-189.
- Erles K. & Brownlie J. 2005. Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kenneled dog populations. *Arch. Virol.* 150:1493-1504.
- Erles K., Dubovi E.J., Brooks H.W. & Brownlie J. 2004. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 42:4524-4529.
- Evermann J.F., Ledbetter E.C. & Maes R.K.M. 2011. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 41:1097-1120.
- Fernandes S.C. & Coutinho S.D.A. 2004. Canine infectious tracheobronchitis – review. *Rev. Inst. Cienc. Saúde* 22:279-285.
- Franco A.C., Roehle P.M. & Varela A.P.M. 2012. Herpesviridae, p. 558-559. In: Flores E.F. (Org.), *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas*. 2th ed. Editora UFSM, Santa Maria.

- Frisk A.L., König M., Moritz A. & Baumgärtner 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.
- Gebara C.M.S., Wosiacki S.R., Negrão F.J., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2004. Histopathological lesions in the central nervous system of dogs with encephalitis and molecular diagnosis of canine distemper virus infection. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56:168-174.
- Griffin J.F.T. 1989. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 20:263-312.
- Hartmann T.L.S., Batista H.B.C.R., Dezen D., Spilki F.R., Franco A.C. & Roehle P.M. 2007. Neutralizing antibodies to distemper and parainfluenza viruses in dogs in shelter kennels in the municipalities of Novo Hamburgo and Porto Alegre, RS, Brazil. *Cienc. Rural* 37:1178-1181.
- Headley S.A. & Graça D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. 2000. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37:136-140.
- Headley S.A., Rodnar L., Silva A.P., Alfieri A.F., Gomes L.A., Okano W. & Alfieri A.A. 2014. Concomitant canine herpesvirus-1, canine distemper virus, canine parvovirus and canine adenovirus infections. *J. Comp. Pathol.* 150:101.
- Hu R.L., Huang G., Qiu W., Zhong Z.H., Xia Z.H. & Yin Z. 2001. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commun.* 25:77-84.
- Kapil S., Allison R.W., Johnston L., Murray B.L., Holland S., Meinkoth J. & Johnson B. 2008. Canine distemper virus strains circulating among North American dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 15:707-712.
- Ledbetter E.C., Kim S.G., Dubovi E.J. & Bicalho R.C. 2009. Experimental reactivation of latent canine herpesvirus-1 and induction of recurrent ocular disease in adult dogs. *Vet. Microbiol.* 138:98-105.
- Mochizuki M., Yachi A., Ohshima T., Ohuchi A. & Ishida T. 2008. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 563-569.
- Möstl K., Egberink H., Addie D., Frymust T., Boucraut-Baralon C., Truyen U., Hartmann K., Lutz H., Gruffydd-Jones T., Radford A.D., Lloret A., Pennisi M.G., Hosie M.S., Marsilio F., Thiry E., Belák S. & Horzinek M.C. 2013. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. *J. Feline Med. Surg.* 15:456-554.

- Negrão F.J., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2007. Evaluation of the urine and leucocytes as biological samples for ante mortem detection of canine distemper virus by RT-PCR assay in naturally infected dogs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 59:253-257.
- Nöthling J.O., Hüsey D., Steckler D. & Ackermann M. 2008. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology* 69:276-282.
- Oliveira E.C., Sonne L., Bezerra Júnior P.S., Teixeira E.M., Dezengrini R., Pavarini S.P., Flores E.F. & Driemeier D. 2009. Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus. *Pesq. Vet. Bras.* 29:637-642.
- Pesavento P.A. & Murphy B.G. 2014. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. *Vet. Pathol.* 51:278-491.
- Priestnall S.L., Mitchell J.A., Brooks H.W., Brownlie J. & Erles K. 2009. Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines and assessment of ciliary function in canine tracheal epithelium during infection with canine respiratory coronavirus (CRCoV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127:38-46.
- Priestnall S.L., Mitchell J.A., Walker C.A., Erles K. & Brownlie J. 2014. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Vet. Pathol.* 51:492-504.
- Rima B.K., Gatherer D., Young D.F., Norsted H., Randall R.E. & Davison A.J. 2014. Stability of the parainfluenza virus 5 genome revealed by deep sequencing of strains isolated from different hosts and following passage in cell culture. *J. Virol. Ap.* 88:3826-3836.
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Guiot A.L., Arberlé C., Nauwynck H.J. & Poulet H. 2002. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod. Domest. Anim.* 37:299-304.
- Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aëberle C., Brunet S. & Poulet H. 2005. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. *Theriogenology* 64:61-74.
- Schulz B.S., Kurz S., Weber K., Balzer H.J. & Hartmann K. 2014. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet. J.* 201:365-369.
- Shirota K., Azetaka M. & Fujiwara K. 1980. A case of canine respiratory adenovirus infection associated with distemper. *Jpn. J. Vet. Sci.* 42:265-270.
- Staden R. 1996. The staden sequence analysis package. *Mol. Biotechnol.* 5:233-241.

- Taguchi M., Namikawa T., Maruo T., Orito K., Lynch J. & Sahara H. 2011. Antibody titers for canine parvovirus type 2, canine distemper virus and canine adenovirus type 1 in adult household dogs. *Can. V. J.* 52:983-986.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 10:2731-2739.
- Thrusfield M.V., Aitken C.G.G. & Muirhead R.H. 1991. A field investigation of kennel cough incubation period and clinical signs. *J. Small Anim. Pract.* 32:215-220.
- Uelank K. 1990. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. *Vet. Rec.* 126:481-483.
- Wang F., Yan X., Chai X, Zhang H., Zhao J., Yongjun W. & Wu W. 2011. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in China. *Viol. J.* 8:85-93.
- Yesilbag K., Yalçın E., Tuncer P. & Yilmaz Z. 2012. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. *Res. Vet. Sci.* 92:36-39.



**Fig.1.** Illustrative conditions of the shelters included in this study. A – *Shelter #1*. B – *Shelter #2*. C – *Shelter #3*.



**Table 1.** Primers used for detection of canine respiratory viruses by PCR in dog samples from shelters in Rio Grande do Sul state.

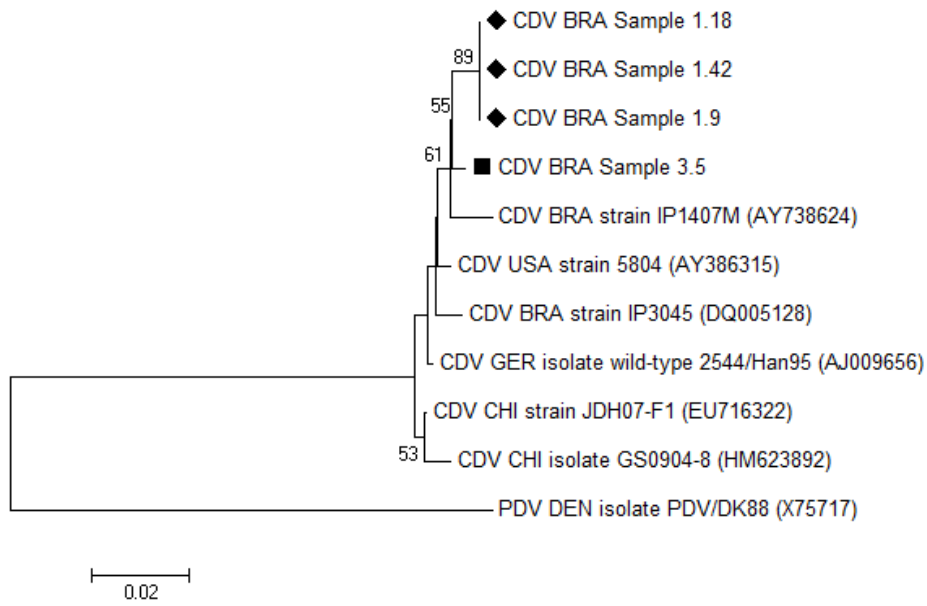
Viruses	Amplified gene	Primers (5'-3')	Amplicon length	Reference
CDV	Nucleoprotein	TTCTGAGGCAGATGAGTTCTTC CTTGATGCTATTTCTGACACT	829pb	Wang et al. 2011
cPIV	Nucleoprotein	GAGGCTCGACGAATAATC GTTCCGGCTTGAGTTAGACC	532pb	This reference
CAdV-2	E3	CGCGCTGAACATTACTACCTTGTC CCTAGAGCACTTCGTGTCCGCTT	1030pb	Hu et al. 2001
CaHV-1	Glycoprotein B	CCTAAACCTACTTCGGATGA GGCTTTAAATGAACTTCTCTGG	450pb	Ronsse et al. 2005

CDV: canine distemper virus, cPIV: canine parainfluenza virus, CAdV-2: canine adenovirus type 2 and CaHV-1: canid herpesvirus 1.

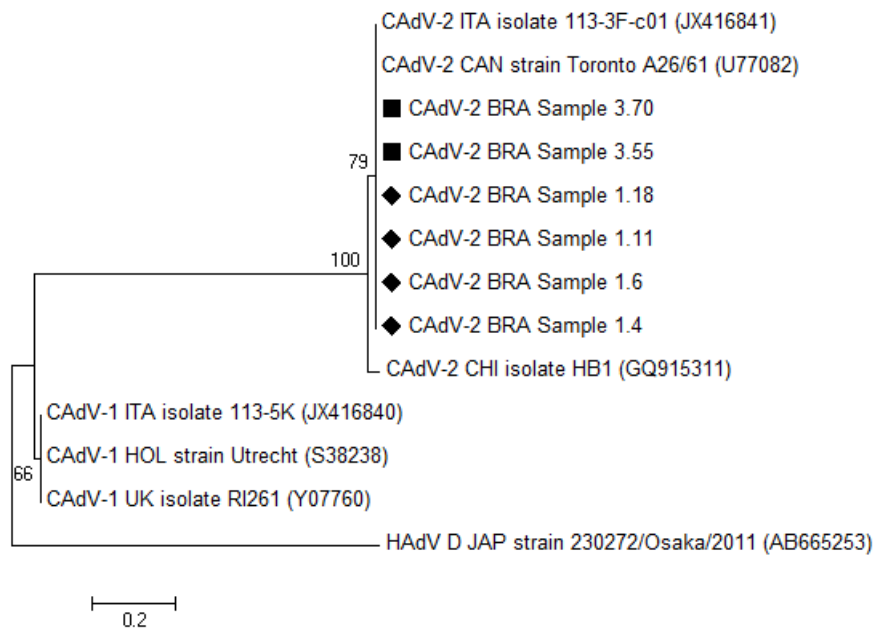
**Table 2.** Infections and coinfections by respiratory viruses in dog shelters in Rio Grande do Sul state.

Shelter	+/total (%)	Single infection - n (%)				Coinfection - n (%)			
		cPIV-2	CAdV-2	CaHV-1	CDV	CDV CAdV-2	cPIV-2 CAdV-2	cPIV-2 CDV	cPIV-2 CAdV-2 CDV
#1	58/74 (78)	22 (30)	4 (5)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	2 (3)	17 (23)	3 (4)	10 (13)
#2	5/35 (14)	3 (8)	<i>nd</i>	2 (6)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>
#3	7/77 (9)	<i>nd</i>	6 (8)	<i>nd</i>	1 (1)	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>	<i>nd</i>

*nd*: not detected.



**Fig.2.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of nucleoprotein gene (N) of canine distemper virus (CDV), being included the out-group of phocine distemper virus (PDV). The tree was constructed using the maximum likelihood method with 1,000 bootstrap replicates based on Kimura-2 parameter model and implemented by MEGA 5.0. Values >50% are shown.



**Fig.3.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of E3 protein gene (N) of canine adenovirus type 2 (CAdV-2), being included the out-group of human adenovirus D (HAdV D). The tree was constructed using the maximum likelihood method with 1,000 bootstrap replicates based on Kimura-2 parameter model and implemented by MEGA 5.0. Values >50% are shown.

### **3. CAPÍTULO 2**

#### **Vírus respiratórios em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil**

Francielle Liz Monteiro, Juliana Felipetto Cargnelutti, Ana Paula Gnocato Mortari, Rudi Weiblen, Eduardo Furtado Flores

(Nota a ser submetida à revista *Ciência Rural* – 2015)

**Vírus respiratórios em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil****Respiratory viruses in dogs from Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil****Francielle Liz Monteiro<sup>I</sup>, Juliana Felipetto Cargnelutti<sup>I</sup>, Ana Paula Gnocato Mortari<sup>I</sup>,****Rudi Weiblen<sup>I</sup>, Eduardo Furtado Flores<sup>I,\*</sup>****- NOTA -****RESUMO**

A Doença Respiratória Infecciosa Canina (*canine infectious respiratory disease - CIR*D) é uma das principais síndromes clínicas de cães e possui etiologia multifatorial. Este trabalho investigou a presença de vírus associados à CIR D em cães com sinais respiratórios em Santa Maria, RS. Amostras de secreções nasais de vinte e cinco (25) cães com doença respiratória foram encaminhados a clínicas veterinárias foram submetidas à pesquisa de ácidos nucleicos virais por PCR. Pesquisou-se a presença do vírus da parainfluenza canina (*canine parainfluenza virus - cPIV*), vírus da cinomose canina (*canine distemper virus - CDV*), adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2 - CAdV-2*) e herpesvírus canino tipo 1 (*canid herpesvirus 1 - CaHV-1*). Das 25 amostras testadas, 10 (40%) foram positivas para um dos vírus pesquisados, sendo 28% (7/25) para o cPIV-2, e 4% (1/25) para cada um dos outros vírus. O sequenciamento nucleotídico dos *amplicons* revelou alta identidade das amostras obtidas de Santa Maria com sequências parciais do gene da nucleoproteína (N) do CDV e cPIV, gene da proteína E3 do CAdV-2 e gene da glicoproteína B (gB) do CaHV-1, obtidas do GenBank. Assim, os resultados demonstram a presença do cPIV, CDV, CAdV-2 e CaHV-1 em infecções respiratórias de cães domésticos no município de Santa Maria, durante

---

<sup>I</sup> Setor de Virologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Prédio 20, Sala 4200, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: [eduardofurtadoflores@gmail.com](mailto:eduardofurtadoflores@gmail.com) \* Autor para correspondência.

o inverno do ano de 2014. A elevada frequência do cPIV e a ocorrência de CaHV-1 indicam a necessidade da reformulação das vacinas virais caninas.

**Palavras-chave:** vírus da cinomose canina, adenovírus canino tipo 2, vírus da parainfluenza canina, herpesvírus canino.

## ABSTRACT

Canine infectious respiratory disease (CIRD) is a major clinical syndrome of dogs and has a multifactorial etiology. This study investigated the presence of viruses associated with CIRD in dogs with respiratory signs in Santa Maria, RS, Brazil. Twenty-five (25) samples of nasal secretions of dogs with respiratory disease submitted to veterinary clinics were investigated for the presence of canine parainfluenza virus (cPIV), canine distemper virus (CDV), canine adenovirus type 2 (CA<sub>AdV</sub>-2), and canine herpesvirus (CaHV-1) by PCR. Of the 25 samples, 10 (40%) were positive for virus, being 28% (7/25) for cPIV, and 4% (1/25) to each of the other viruses. Nucleotide sequencing of the amplicons revealed high identities with sequences of the nucleoprotein gene (N) of CDV and cPIV, E3 protein gene of CA<sub>AdV</sub>-2 and the glycoprotein B (gB) of CaHV-1, obtained from GenBank. Thus, the results demonstrate the presence of cPIV, CDV, CA<sub>AdV</sub>-2 and CaHV-1 in respiratory infections of domestic dogs in Santa Maria, during the winter of 2014. The high frequency of cPIV and the occurrence of CaHV-1 indicate the need for reformulation of canine viral vaccines.

**Keywords:** canine distemper virus, canine adenovirus type 2, canine parainfluenza virus, canid herpesvirus.

A Doença Respiratória Infecciosa Canina (*canine infectious respiratory disease* - CIRD) é uma enfermidade multifatorial, possuindo vários agentes virais em sua etiologia: o vírus da cinomose (*canine distemper virus* - CDV), vírus da parainfluenza canina (*canine*

*parainfluenza virus* - cPIV), adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2* - CAdV-2) e herpesvírus canino tipo 1 (*canid herpesvirus 1* - CaHV-1) (ERLES et al., 2004). A CIRD ocorre principalmente em épocas frias, devido às baixas temperaturas e à baixa umidade do ar (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007), e acomete principalmente cães jovens, animais imunossuprimidos e filhotes com falhas na imunidade materna (FERNANDES & COUTINHO, 2004).

As manifestações clínicas da CIRD variam de acordo com os agentes envolvidos, mas geralmente é observado febre, corrimento nasal, dispneia e tosse seca, podendo cursar de forma subclínica em cães adultos (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). A vacinação tem reduzido a ocorrência de algumas infecções respiratórias em cães. No entanto, a persistência dos vírus no ambiente e em animais portadores, a presença de variantes e a ocorrência de falhas vacinais, são fatores que favorecem a circulação dos vírus na população canina (BÖHM et al., 2004).

No Rio Grande do Sul, relatos sorológicos tem demonstrado a circulação dos vírus respiratórios em cães (DEZENGRINI et al., 2007; HARTMANN et al., 2007). No entanto, relatos clínicos e/ou identificação dos patógenos envolvidos são escassos. Nesse sentido, a identificação dos agentes causadores de doença respiratória em cães é importante para a adoção de medidas de controle e/ou para verificar a adequação das vacinas e protocolos de vacinação. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar a presença do CDV, cPIV, CAdV-2 e CaHV-1 em secreções nasais de cães com sinais respiratórios na cidade de Santa Maria, Rio Grande do Sul (RS).

As coletas foram realizadas no período de inverno do ano de 2014, com amostras de 25 cães domésticos – incluindo cães jovens e adultos - que apresentavam sinais de infecção respiratória aguda e foram encaminhados às Clínicas Veterinárias de Santa Maria. Em geral, os animais apresentavam corrimento nasal, tosse, espirros e dispneia. Suabes nasais foram



coletados pelo Médico Veterinário responsável e encaminhados em solução de RNAlater (Life Technologies, Carlsbad, CA) ao Setor de Virologia da Universidade Federal de Santa Maria. Algumas amostras oriundas de outras cidades na região central do RS (Itaara e Porto Alegre) também foram analisadas, para comparar com as amostras obtidas de Santa Maria.

Ácidos nucléicos virais foram extraídos das secreções nasais com o kit RTP DNA/RNA Virus (Invitex, Berlim, DE). Para a detecção dos vírus RNA, foi sintetizado um DNA complementar (cDNA) utilizando a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies, Carlsbad, CA). Os ácidos nucléicos extraídos foram submetidos a PCR ou RT-PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores e condições publicadas anteriormente (CDV – WANG et al., 2011; cPIV – MONTEIRO et al., submetido; CAdV-2 – HU et al., 2001; CaHV-1 – RONSSE et al., 2005). Como controles positivos foram utilizados ácidos nucléicos extraídos de vacina comercial para o CDV e CAdV-2 (Imuno-Vet<sup>®</sup>) e cPIV-2 (POLY 10<sup>®</sup>), e de hepatócitos de um cão naturalmente infectado pelo CaHV-1 (OLIVEIRA et al., 2009). Os produtos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Biotium, Hayward, CA).

Para o sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados com o kit PureLink PCR Purification (Life Technologies, Carlsbad, CA). A reação foi realizada em quadruplicata em um sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA), utilizando 50-100ng do DNA amplificado e 5 $\mu$ M do primer direto ou reverso. A análise das sequências e a obtenção da sequência consenso foram realizadas no programa Staden Package (STADEN, 1996), alinhadas no software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) e comparadas pelo BLAST com sequências depositadas no GenBank ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov)).

A análise filogenética foi realizada no programa MEGA 5.0 utilizando o método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas, sendo que as distâncias evolucionárias

foram computadas utilizando o método *p-distance* (TAMURA et al., 2011). Para a construção das árvores foram utilizadas sequências parciais do gene da nucleoproteína do CDV e gene da proteína E3 do CAdV-2, obtidas das amostras de suabes nasais de cães de Santa Maria e de outras cidades do RS, e de sequências depositadas no Genbank. Para o cPIV, não foi possível construir uma árvore filogenética devido ao número reduzido de nucleotídeos obtidos após o consenso da quadruplicata das amostras. E, para o CaHV-1, foi dispensada a árvore filogenética devido à alta homologia observada entre as sequências.

Das 25 amostras de secreção nasal obtidas de cães com sinais respiratórios, 10 (40%) foram positivas para um dos vírus pesquisados, sendo 28% (7/25) para o cPIV e 4% (1/25) para cada um dos outros vírus pesquisados (CAdV-2, CDV e CaHV-1).

O cPIV tem sido descrito como o agente mais frequente em doença respiratória de cães, principalmente por ser altamente transmissível e de rápida disseminação entre os animais (ERLES et al., 2004; MOCHIZUKI et al., 2008; SCHULZ et al. 2014). Curiosamente, grande parte das vacinas para cães, sobretudo as mono-, bi-, tri- e tetravalentes não possuem este agente em sua formulação.

Com relação ao CAdV-2, um estudo sorológico realizado com cães domésticos da cidade de Santa Maria entre 2004 e 2005, relatou que 43% (353/817) dos animais eram sorologicamente positivos para este vírus (DEDENGRINI et al., 2008). Alta soroprevalência para o CAdV também tem sido encontrada em outros países (BULUT et al. 2013; WRIGHT et al. 2013), embora a sorologia não possa distinguir entre CAdV-1 e CAdV-2 (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Por outro lado, estudos etiológicos geralmente detectam uma menor prevalência do CAdV-2 (ERLES et al. 2004; MOCHIZUKI et al. 2008; SCHULZ et al. 2014).

Com relação ao CDV, foram detectadas 4% (1/25) de amostras positivas. Assim como observado com o CAdV-2, o CDV apresenta elevada soroprevalência na população canina

(DEZENGRINI et al., 2008; CASTANHEIRA et al., 2014; MCREE et al., 2014). Entretanto, alguns estudos de detecção viral em animais com doença respiratória descrevem poucas ou nenhuma amostra positiva para o CDV (MOCHIZUKI et al., 2008, SCHULZ et al., 2014).

O CaHV-1 foi detectado em 4% (1/25) das amostras investigadas, demonstrando a sua presença, mesmo em índices baixos, em infecções respiratórias de cães na região estudada. Estudos tem demonstrado a importância deste vírus na região sul do Brasil, sobretudo associado com infecção perinatal de cães de canis (CARGNELUTTI et al., 2015). Esses achados reforçam a necessidade de se incluir este vírus em formulações vacinais para cães no país.

As amostras positivas para o cPIV apresentaram 98 a 100% de homologia com as sequências parciais do gene da nucleoproteína do cPIV obtidas no GenBank, verificando-se uma alta conservação/baixa variabilidade do gene estudado. Da mesma forma, a amostra positiva para o CaHV-1 apresentou 99 a 100% de homologia com sequências parciais do gene da glicoproteína B do CaHV-1 obtidas no GenBank. Por outro lado, a amostra positiva para o CDV agrupou-se em cluster separado das amostras de outras regiões do Brasil e até mesmo da cidade de Porto Alegre, confirmando a alta variabilidade genética do CDV (Figura 1).

A amostra positiva para o CAdV-2 foi comparada com sequências parciais do gene da proteína E3 do CAdV-1 e CAdV-2 obtidas do Brasil, além de amostras obtidas de outras cidades do RS, demonstrando a alta homologia de nucleotídeos nesse gene (Figura 2).

Em resumo, os resultados demonstram a presença do cPIV, CDV, CAdV-2 e CaHV-1 em infecções respiratórias de cães domésticos no município de Santa Maria, RS, durante o inverno do ano de 2014. A elevada frequência do cPIV, em particular, e a ocorrência do CaHV-1 indicam a necessidade da reformulação das vacinas virais caninas, muitas delas sem antígenos do cPIV e nenhuma delas contendo o CaHV-1.

## AGRADECIMENTOS

Às clínicas veterinárias da cidade de Santa Maria, Porto Alegre e Itaara que colaboraram enviando amostras para o diagnóstico do Setor de Virologia. Francielle L. Monteiro, Juliana F. Cargnelutti, Ana Paula G. Mortari, Rudi Weiblen e Eduardo F. Flores são bolsistas do CNPq.

## REFERÊNCIAS

- BÖHM, M. et al. Serum antibody titers to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. **Veterinary Record**, v.154, p.457-463, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15119729>>. Acesso em: 18 out. 2014. doi: 10.1136/vr.154.15.457.
- BULUT, O. et al. The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. **The Scientific World Journal**, 6 pages, 2013. Disponível em: <[www.hindawi.com/journals/tswj/2013/587024](http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/587024)>. Acesso em: 14 nov. 2014. doi: 10.1155/2013/587024.
- BUONAVOGLIA, C. & MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Veterinary Research**, v.30, p.355-373, 2007. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296161](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17296161)>. Acesso em: 19 out. 2014. doi: 10.1051/vetres:2006058.
- CARGNELUTTI, J.F. et al. Outbreaks of canid herpesvirus 1 in puppies from southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2015. In press.
- CASTANHEIRA, P. et al. Molecular and serological surveillance of canine enteric viruses in stray dogs from Vila do Maio, Cape Verde. **BMC Veterinary Research**, v.10, 7 pages, 2014. Disponível em: <[www.biomedcentral.com/1746-6148/10/91](http://www.biomedcentral.com/1746-6148/10/91)>. Acesso em: 20 out. 2014. doi: 10.1186/1746-6148-10-91.

DEZENGRINI, R. et al. Seroprevalence of parvovirus, adenovirus, coronavirus and canine distemper virus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural** v.37, p.183-189, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000100029](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000100029)>.

Acesso em: 10 set. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782007000100029.

ERLES, K. et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.4524-4529, 2004. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472304](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15472304)>. Acesso em: 5 out. 2014. doi: 10.1128/JCM.42.10.4524-4529.2004.

FERNANDES, S.C. & COUTINHO, S.D.A. Canine infectious tracheobronchitis – review. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.22, p.279-285, 2004. Disponível em: <[http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2004/04\\_out\\_dez/V22\\_N4\\_2004\\_p279-286.pdf](http://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2004/04_out_dez/V22_N4_2004_p279-286.pdf)>. Acesso em: 10 set. 2014.

HARTMANN, T.L.S. et al. Neutralizing antibodies to distemper and parainfluenza viruses in dogs in shelter kennels in the municipalities of Novo Hamburgo and Porto Alegre, RS, Brazil. **Ciência Rural** v.37, p.1178-1181, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000400045](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000400045)>.

Acesso em: 10 set. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782007000400045.

HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, v.25, p.77-84, 2001. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214675)>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1023/A:1006417203856.

MCREE, A. et al. Serological detection of infection with canine distemper virus, canine parvovirus and canine adenovirus in communal dogs from Zimbabwe. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.85, 2 pages, 2014. Disponível:

<[www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/view/1110/1475](http://www.jsava.co.za/index.php/jsava/article/view/1110/1475)>. Acesso em: 22 out. 2014. doi: 10.4102/jsava.v85i1.1110.

MOCHIZUKI, M. et al. Etiologic study of upper respiratory Infections of household dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.70, p.563-569, 2008. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628596](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18628596)>. Acesso em: 21 out. 2014. doi: 10.1292/jvms.70.563.

MONTEIRO, F.L. et al. Infections and coinfections of respiratory viruses in dogs kept in shelters. **Submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2015.

OLIVEIRA, E.C. et al. Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.637-642, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000800007&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2009000800007&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1590/S0100-736X2009000800007.

RONSEE, V. et al. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, v.64, p.61-74, 2005. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935843](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15935843)>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.11.016.

SCHULZ, B.S. et al. Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infectious. **The Veterinary Journal**, v.201, p.365-369, 2014. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980809)>. Acesso em: 5 nov. 2014. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.04.019.

STADEN, R. The staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnolog**, v.5, p.233-241, 1996. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837029)>. Acesso em: 9 out. 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** v.10,

p.2731-2739, 2011. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353)>. Acesso em: 9 out. 2013. doi: 10.1093/molbev/msr121.

WANG, F. et al. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in China. **Virology Journal**, v.8, p.85-93, 2011. Disponível em: <[www.virologyj.com/content/8/1/85](http://www.virologyj.com/content/8/1/85)>. Acesso em: 20 maio 2013. doi: 10.1186/1743-422X-8-85.

WRIGHT, N. et al. High prevalence of antibodies against canine adenovirus (CAV) type 2 in domestic dog populations in South Africa precludes the use of CAV-based recombinant rabies. **Vaccine**, v.31, p.4177-4182, 2013. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867013](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23867013)>. Acesso em: 1 nov. 2014. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.06.089.

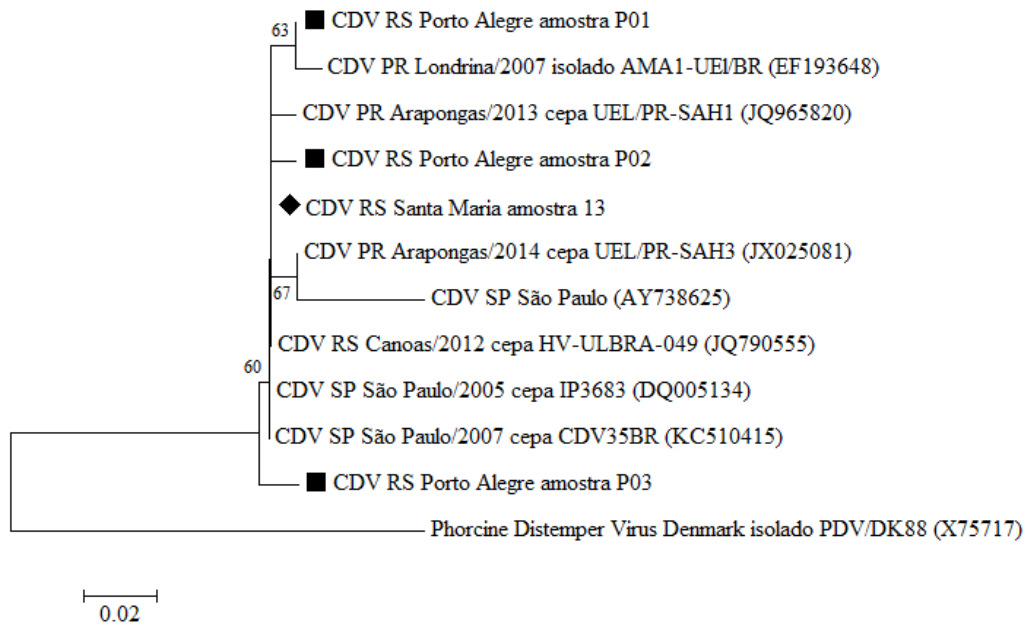


Figura 1 - Árvore filogenética baseada no gene da nucleoproteína (N) do vírus da cinomose canina (*canine distemper virus* - CDV). A árvore foi construída no programa MEGA 5.0 utilizando o método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas. Valores >50% são mostrados.



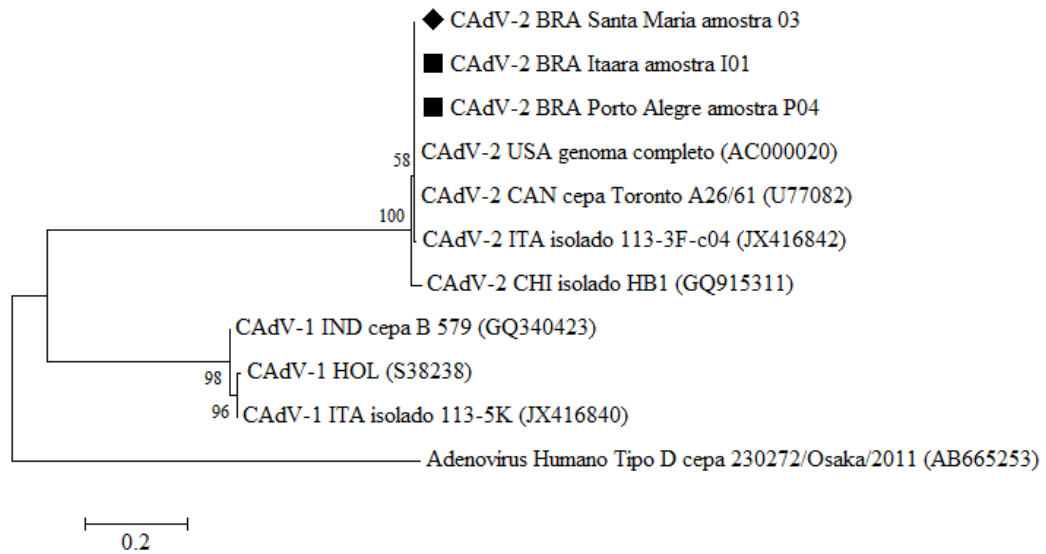


Figura 2 - Árvore filogenética baseada no gene da proteína E3 (N) do adenovírus canino tipo 2 (*canine adenovirus type 2* - CAAdV-2). A árvore foi construída no programa MEGA 5.0 utilizando o método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 replicatas. Valores >50% são mostrados.

## 4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na presente dissertação permitem concluir que:

- Infecções e coinfeções pelos principais vírus respiratórios associados à CIRDC (CDV, cPIV-2, CAdV-2 e CaHV-1) são frequentes em cães de abrigos do RS;
- A frequência dessas infecções parece estar relacionada com a densidade e fluxo de animais, condições sanitárias e nutricionais, bem como com a estação do ano, sendo mais frequentes no inverno;
- O cPIV-2, CDV, CAdV-2 e CaHV-1 foram detectados em cães com doença respiratória em Santa Maria (RS) no período estudado (inverno do ano de 2014);
- O cPIV-2 é o vírus respiratório de maior frequência tanto em cães de abrigo quanto em cães domésticos de Santa Maria.

## 5. REFERÊNCIAS

- AMUDE, A.M.; ALFIERI, A.A. & ALFIERI, A.F. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, London, v. 82, p. 416-422, June 2007.
- ANDREWES, C.H.; PEREIRA, H.G.; PORTERFIELD, J.S. **Andrewes' Viruses of Vertebrates**. London: Baillière Tindall, 1989, p. 95-120.
- APPEL, M.J.G. & SUMMERS, B.A. Canine distemper: current status. In: CARMICHAEL, L.E. **Recent advances in canine infectious diseases**. Ithaca: International Veterinary Information Service, 1999, p. 6.
- ARNS, C.W. et al. Paramyxoviridae. In: FLORES, E.F. (Ed.) **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 761-793.
- BAUMGÄRTNER, W.K. Canine parainfluenza virus. In: RICHARD, G. et al. **Comparative Pathobiology of Viral Diseases**. Boca Raton: CRC., 1985, p. 77-83.
- BAUMGÄRTNER, W.K. et al. Acute encephalitis and hydrocephalus in dogs caused by canine parainfluenza virus. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 19, p. 79-92, January 1982.
- BINN, L.N. et al. Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 126, p. 140-145, October 1967.
- BÖHM, M. et al. Serum antibody titers to canine parvovirus, adenovirus and distemper virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. **Veterinary Record**, London, v.154, p. 457-463, April 2004.
- BULUT, O. The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. **The Scientific World Journal**, New York, 6 pages, September 2013.
- BUONAVOGLIA, C. & MARTELLA, V. Canine respiratory viruses. **Veterinary Research**, Paris, v. 38, p. 355-373, March-April 2007.
- CARMICHAEL, L.E.; SQUIRE, R.A. & KROOK, L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 26, p. 803-814, July 1965.
- CASTILHO, J.G. et al. Molecular analysis of the N gene of canine distemper virus in dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 654-659, June 2007.

CAUDELL, D. et al. Diagnosis of infectious canine hepatitis virus (CAV-1) infection in puppies with encephalopathy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, p. 58-61, January 2005.

CHVALA, S. et al. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and mycoplasma cynos infection in a dog with pneumonia. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 44, p. 508-512, July 2007.

DAHLBOM, M. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and brucella canis in finnish breeding kennels with and without reproductive problems. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, p. 128-131, February 2009.

DECARO, N. et al. Canine adenovirus and herpesvirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Oxford, v. 38, p. 799-814, July 2008.

DEZENGRINI, R. et al. Seroprevalence of parvovirus, adenovirus, coronavirus and canine distemper virus infections in dogs of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 183-189, January-February 2007.

DIALO, A. Morbillivirus group: genome organization and protein. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 23, p. 155-163, July 1990.

DITCHFIELD, J. et al. Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"). **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, p. 238-247, August 1962.

EDIMBORO, C.H.; WARD, M.P. & GLICKMAN, L.T. A placebo-controlled trial of two intranasal vaccines to prevent tracheobronchitis (kennel cough) in dogs entering a humane shelters. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 62, p. 89-99, February 2004.

EK-KOMMONEN, C. et al. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. **Veterinary Record**, London, v. 141, p. 380-383, October 1997.

ERLES, K. et al. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p. 4524-4529, October 2004.

EVERMANN, J.F.; LINCOLN, J.D. & MCKIERNAN, A.J. Isolation of a paramyxovirus from the cerebrospinal fluid of a dog with posterior paresis. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 177, p. 1131-1134, December 1980.

EVERMANN J.F.; LEDBETTER, E.C. & MAES, R.K.M. Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Oxford, v. 41, p. 1097-1120, November 2011.

FAIRCHILD, G.A. & COMEN, D. Serologic study of a canine adenovirus (Toronto A 26/61) infection in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 30, p. 923-928, August 1969.

FERNANDES, S.C; COUTINHO, S.D.A. Canine infectious tracheobronchitis – review. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 22, p. 279-285, October-December 2004.

FLORES, E.F. & CARGNELUTTI, J.F. Diagnóstico laboratorial de infecções víricas. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 344-345.

FRANCO, A.C. et al. Herpesviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012, p. 505-567.

FRISK A.L. et al. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 3634-3643, November 1999.

GALOSI, C.M. Herpesvirus canino 1: agente etiológico y enfermedad. **Analecta Veterinaria**, Buenos Aires, v. 27, p. 5-17, 2007.

GREENE C.E. & APPEL, M.J. Canine Distemper. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and the cat**. Philadelphia: Saunders, 2006, p. 226-239.

HASHIMOTO, A. et al. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 43, p. 844-850, May 1982.

HARTMANN, T.L.S. et al. Neutralizing antibodies to distemper and parainfluenza viruses in dogs in shelter kennels in the municipalities of Novo Hamburgo and Porto Alegre, RS, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, p. 1178-1181, July-August 2007.

HEADLEY, S.A. et al. Concomitant canine herpesvirus-1, canine distemper virus, canine parvovirus and canine adenovirus infections. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 150, p. 101, January 2014.

HU, R.L. et al. Detection and differentiation of CAV-1 na CAV-2 by polymerase chain reaction. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v. 25, p. 77-84, January 2001.

KAPIL, S. et al. Canine Distemper Virus strains circulating among North American dogs. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, p. 707-712, April 2008.

LAINDLAW, P.P. & DUNKIN, F.W. Studies in dog, distemper III. The nature of the virus. **Journal of Comparative Pathology**, Liverpool, v. 39, p. 222-230, March 1926.

LEISEWITZ, A.L. et al. Canine Distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of the literature: review article. **Journal of the South African Veterinary Association**, Pretoria, v. 71, p. 127-136, September 2001.

LEDBETTER, E.C. et al. Experimental reactivation of latente canine herpesvirus-1 and induction of recorrente ocular disease in adultos dogs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 138, p. 98-105, July 2009.

LOVE, D.N. & HUXTABLE, C.R.R. Naturally-occurring neonatal canine herpesvirus infection. **Veterinary Record**, London, v. 99, p. 501-503, December 1976.

MACARTNEY, L. Isolation of a novel paramyxoviruses from a dog with enteric disease. **Veterinary Record**, London, v. 117, p. 205-207, November 1985.

MOCHIZUKI M. et al. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 70, p. 563-569, June 2008.

MOCHIZUKI, M. et al. Etiologic study of upper respiratory Infections of household dogs. **The Journal of Medical Veterinary Science**, Tokyo, v. 70, p. 563-569, June 2008.

MORAES, M.P.; COSTA, P.R. dos S. Adenoviridae. In: FLORES, E.F. **Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas**, 2012, p. 483-501.

MORRISON, M.D. et al. Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 873-878, April 1997.

MÖSTL, K. et al. Prevention of infectious diseases in cat shelters: ABCD guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 15, p. 456-554, July 2013.

NEGRÃO, F.J. et al. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, p. 253-257, February 2007.

OLIVEIRA, E.C. et al. Clinic and pathological findings in dogs naturally infected with canine herpesvirus. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, Rio de Janeiro, v. 29, p. 637-642, August 2009.

PESAVENTO, P.A. & MURPLY, B.G. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 51, p. 278-491, November 2014.

PRIESTNALL, S.L. et al. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 51, p. 492-504, November 2014.

RONSSSE, V. et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1. **Theriogenology**, Stoneham, v. 61, p. 619-636, February 2004.

RONSSSE, V. Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies. **Theriogenology**, New York, v. 64, p. 61-74, July 2005.

SCHULZ, B.S et al. Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract Infections. **Veterinary Journal**, London, v. 201, p. 365-369, September 2014.

SHIROTA, K.; AZETAKA, M. & FUJIWARA, K. A case of canine respiratory adenovirus infection associated with distemper. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 42, p. 265-270, April 1980.

SWANGO, L.J. Moléstias virais caninas. In: ETTINGER, J.E. & FIELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, p. 573-588, 1997.

THRUSFIELD, M.V.; AITKEN, M.V. & MUIRHEAD, R.H. A field investigation of kennel cough incubation period and clinical signs. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 32, p. 215-220, April 1991.

UELANK, K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. **Veterinary Record**, London, v. 126, p. 481-483, May 1990.

YAMAMOTO, T. & MARUSYK, R.G. Morphological studies of a canine adenovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 2, p. 191-194, 1968.

YESILBAH, K. et al. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 92, p. 36-39, November 2012.