

Detección del virus Distemper canino por RT-PCR en tiempo real y caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata mediante el análisis de los genes de la hemaglutinina y la proteína de fusión



Lic. Nicolás Sarute

Tesis de Maestría PEDECIBA Biología

Subárea Genética

Orientadora: Dra. Yanina Panzera

Co-Orientador: Dr. Ruben Pérez

Sección Genética Evolutiva



Agradecimientos

A la Sección Genética Evolutiva por permitirme realizar mis estudios de posgrado, especialmente a mis orientadores Yanina y Ruben.

A los chicos/as del laboratorio, compañeros de trabajo y amigos de la vida.

A Lourdes por facilitarnos las muestras y colaborar con nuestro estudio.

A Martín por su inagotable energía, apoyo y palabras de aliento.

A las personas que en algún momento transitaron por el proyecto CDV, y que aún siguen estando presentes.

A la familia y amigos.

A la Agencia Nacional de Investigación (ANII), Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Red AMSUD-Pasteur y Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por apoyar el proyecto a través de becas para realizar estudios en el país y en el exterior, y para difundir nuestros resultados.

Gracias.

Abreviaturas y definiciones	I
Publicaciones	II
Resumen	III
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Virus Distemper canino	1
1.1.1 Clasificación taxonómica	1
1.1.2 Estructura, genoma y proteínas virales	1
1.1.2.1 Estructura viral	1
1.1.2.2 Genoma viral	2
1.1.2.3 Proteínas virales	3
1.1.2.3.1 Proteína de nucleocápside (N)	3
1.1.2.3.2 Proteínas codificadas por el gen P/V/C: fosfoproteína P y proteínas V y C	3
1.1.2.3.3 Proteína de matriz (M)	4
1.1.2.3.4 Proteína de fusión (F)	4
1.1.2.3.5 Proteína hemaglutinina (H)	5
1.1.2.3.6 Proteína <i>large</i> (L)	5-6
1.1.3 Ciclo replicativo de CDV	6
1.1.3.1 Unión y fusión virus-célula	6
1.1.3.2 Transcripción y replicación del genoma viral	6
1.1.3.3 Formación del complejo ribonucleoproteico (RNP) y brotación	7
1.1.3.4 Propagación entre células huésped	7-8
1.2 Distemper: patogénesis, sintomatología clínica, epidemiología, prevención y control	8
1.2.1 Patogénesis	8
1.2.2 Sintomatología Clínica	9-10
1.2.3 Epidemiología	11
1.2.4 Prevención y control de la enfermedad	11-12
1.3 Detección de CDV en muestras clínicas	13
1.3.1 Ensayos serológicos	14
1.3.2 Técnicas moleculares	14
1.3.2.1 RT-PCR tiempo final	14-15
1.3.2.2 RT-PCR en tiempo real	15-16
1.4 Caracterización genética de CDV	16
1.4.1 Hemaglutinina	17-19
1.4.2 Péptido señal de la proteína de fusión	19-20
1.5 Antecedentes del grupo de trabajo	20-21
1.6 Hipótesis de trabajo	22
1.7 Objetivos	22

2. MATERIALES y MÉTODOS

2.1 Muestras	23
2.2 Extracción del genoma viral	23-26
2.3 Ensayos de retrotranscripción y PCR	26
2.3.1 Retrotranscripción	26-27
2.3.2 PCR en tiempo real	27
2.3.3 PCR tiempo final	29
2.3.3.1 Amplificación de la secuencia codificante del gen H	29
2.3.3.2 Amplificación de la región codificante del Fsp	29
2.4 Electroforesis	30
2.5 Purificación de los fragmentos amplificados por RT-PCR	31
2.6 Clonación de los amplicones del gen H	31-33
2.7 Secuenciación	33
2.8 Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	33
2.8.1 Diseño de cebadores y sondas	33-34
2.8.2 Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas	34
2.8.3 Análisis filogenéticos	34
2.8.3.1 Hemaglutinina	35
2.8.3.1.1 Análisis de la secuencia completa	35
2.8.3.1.2 Análisis de una secuencia parcial (134 aa)	35
2.8.3.2 Péptido señal de la proteína de fusión	35
2.8.4 Identificación de sitios de glicosilación	35
2.8.5 Estudio de presiones selectivas	36

3. RESULTADOS

3.1 Detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real	40
3.2 Caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata	43
3.2.1 Hemaglutinina	43
3.2.1.1 Amplificación por RT-PCR tiempo final	43
3.2.1.2 Edición y análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas	44
3.2.1.3 Estudios comparativos	44-45
3.2.1.4 Análisis filogenéticos	53
3.2.1.4.1 Análisis de la secuencia completa de la hemaglutinina	53
3.2.1.4.2 Análisis de secuencias parciales (134 aminoácidos)	55
3.2.1.5 Comparación con la cepa vacunal OP	57
3.2.1.6 Identificación de sitios potenciales de glicosilación	57
3.2.1.7 Estudio de presiones selectivas	58
3.2.2 Péptido señal de la proteína de fusión	59
3.2.2.1 Amplificación por RT-PCR tiempo final	59

3.2.2.2 Estudios comparativos	60
3.2.2.3 Análisis filogenético	62-63
3.2.2.4 Comparación con la cepa vacunal OP	65
3.2.2.5 Estudio de presiones selectivas	66
4. DISCUSIÓN	67-78
4.1 Conclusiones y perspectivas	78-80
Referencias bibliográficas	81-91

Abreviaturas y definiciones

aa: aminoácido/s

Buffer: solución química que mantiene constante su pH

°C: grados centígrados

CDV: virus Distemper canino

Cebadores: oligonucleótidos iniciadores

CI: control interno

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAasas: enzimas que degradan el DNA

DNA ligasa: enzima que forma enlaces covalentes entre el extremo 5' de una cadena polinucleotídica y el extremo 3' de otra cadena polinucleotídica

dNTPs: deoxinucleótidos

EDTA: ácido etilendiamino tetra-acético

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay. Ensayo inmunoenzimático por adsorción

F: proteína de fusión

H: hemaglutinina

IF: inmunofluorescencia

IgM: inmunoglobulina de tipo M

Kb: kilobase

l: litro

L: *large* (proteína)

LCR: líquido cefalorraquídeo

M: matriz (proteína)

mAbs: anticuerpos monoclonales

MgCl₂: cloruro de magnesio

μl: microlitros

μM: micromolar

mg: miligramos

ml: mililitros

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

MV: Measles virus. Virus Sarampión

N: nucleoproteína

nm: nanómetros

nt: nucleótidos

ORF: Open Reading Frame. Marco abierto de lectura

pb: pares de bases

P: fosfoproteína

PBS: phosphate buffered saline. Solución salina de fosfatos

PCR: Polymerase Chain Reaction. Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDV: virus Distemper de fócidos

Pellet: precipitado luego de la centrifugación

pH: logaritmo de la inversa de la concentración de protones

PI: post infección

pMol: picomoles

RE: retículo endoplasmático

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

RNA: ácido ribonucleico

RNasa: nucleasa que cataliza la hidrólisis de RNA

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Retro-Transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa

SDS: dodecyl sulfato de sodio. Detergente de acción desnaturizante

seg: segundos

SLAM: Signaling lymphocytic activation molecule (CD150). Molécula activadora de la señalización del linfocito

SNC: sistema nervioso central

UTR: Untranslated region. Región no traducida

UV: luz Ultravioleta

Vero: células epiteliales de riñón de mono verde africano

Vero-SLAM: células Vero que expresan por transfección la molécula activadora de la señalización del linfocito (CD150-SLAM)

vol: volumen

VVA: vacunas a virus vivo atenuado

Publicaciones

“Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay”. Sarute, N., Pérez, R., Francia, L., Hernández, M., Bedó, G., Bonilla, B., Guasco, S., Cardeillac, A., Panzera, Y. (2011). *Veterinaria* (Montevideo), 47 (182): 9-15.

“Evidence of two co-circulating genetic lineages of *Canine Distemper Virus* in South America”. Panzera, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernandez, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J., Pérez, R. (2011). *Virus Res.* 163, 401-404.

Resumen

El virus Distemper canino (CDV) es un virus envuelto del género *Morbillivirus* perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*; éste presenta un genoma de RNA no segmentado, cadena simple, polaridad negativa y 15.7 kilobases. CDV es el agente etiológico de una severa enfermedad infecciosa, denominada Distemper o Carré, que afecta a todas las familias de carnívoros terrestres.

Distemper es una de las principales enfermedades infecciosas de canes domésticos y se caracteriza por presentar un amplio rango de síntomas clínicos asociados a lesiones en el aparato respiratorio, digestivo y/o el sistema nervioso central. La enfermedad se controla a través de vacunas con virus vivos atenuados; sin embargo, recientemente se han registrado numerosos brotes infecciosos en nuestra región y alrededor del mundo, incluso en poblaciones de canes correctamente vacunados. Aunque se desconocen las causas, dichos brotes podrían explicarse por la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia, la emergencia de nuevas cepas capaces de evadir la respuesta inmune, y/o fallas en los planes de vacunación.

Uruguay no parece estar exento de esta problemática, registrándose brotes de la enfermedad en canes vacunados. El desarrollo de metodologías de diagnóstico y caracterización en nuestro laboratorio basadas en RT-PCR tiempo final, y posterior secuenciación de los amplicones, nos permitió constatar que la infección de los canes se debía a virus de campo y no a la reversión de la cepa vacunal. Debido a ello, resulta fundamental implementar en el país planes de vigilancia sanitaria basados en la rápida detección del genoma viral y su posterior caracterización.

En este sentido, durante esta tesis desarrollamos por primera vez en Uruguay un método de diagnóstico basado en RT-PCR en tiempo real con química TaqMan, el cual brinda resultados confiables, con elevada especificidad y en menor tiempo.

A su vez, se realizó la caracterización genética de aislamientos de campo del Río de la Plata mediante el análisis del gen de la hemaglutinina (H) y de la región codificante del péptido señal (Fsp) de la proteína de fusión (F). Estas regiones genómicas presentan una elevada variabilidad genética lo cual permite establecer relaciones evolutivas entre las cepas circulantes. Mediante RT-PCR se amplificó la secuencia codificante del gen H y la región Fsp de aislamientos de campo uruguayos y argentinos, constituyendo

el primer estudio de caracterización basado en estas regiones genómicas en Sudamérica.

El análisis de las secuencias obtenidas de la hemaglutinina reveló la existencia de una elevada variabilidad genética entre los aislamientos de Sudamérica, los cuales se agrupan en dos linajes co-circulantes en el continente con distinta distribución y prevalencia. Uno de ellos corresponde a un linaje ya caracterizado, Europa 1 (EU1), por tanto proponemos denominar a este linaje como Europa 1/Sudamérica 1 (EU1/SA1), mientras que el otro representa un linaje exclusivo de nuestro continente descrito por primera vez, al cual denominamos Sudamérica 2 (SA2). El linaje EU1/SA1 sería el resultado del intercambio de animales entre ambos continentes favoreciendo la transmisión del virus, mientras que el linaje SA2 se habría originado en la fauna silvestre de Sudamérica y se transmitió a los canes domésticos.

El análisis de la región Fsp de los aislamientos sudamericanos reveló las mismas relaciones evolutivas observadas en el análisis de la hemaglutinina, registrándose elevados valores de variabilidad genética. Estos resultados sustentan su utilidad como marcador para estudios de caracterización genética y evolución de CDV, por lo cual proponemos un nuevo criterio para definir linajes genéticos de CDV en base a la variabilidad de Fsp.

La comparación de los aislamientos sudamericanos con la cepa vacunal Onderstepoort (OP), utilizada comúnmente en nuestro país, mostró elevados niveles de variabilidad tanto a nivel de la hemaglutinina, como de Fsp, confirmando que los casos de infección por CDV fueron causados por virus de campo, y no por la reversión de la cepa vacunal.

INTRODUCCIÓN

1.1 Virus Distemper canino

1.1.1 Clasificación Taxonómica

El virus Distemper canino (CDV) es un virus envuelto del género *Morbillivirus* perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Los *Morbillivirus* presentan genoma de RNA no segmentado, cadena simple, polaridad negativa y aproximadamente 15.7 kb (Lamb & Parks, 2007).

1.1.2 Estructura, genoma y proteínas virales

1.1.2.1 Estructura viral

CDV es un virus pleomórfico, con un diámetro aproximado entre 150-300 nm (Zipperle et al., 2010). El RNA genómico se encuentra empaquetado por la proteína de nucleocápside (N) y es replicado por el complejo de la polimerasa viral formado por la proteína *large* (L) y su cofactor, la fosfoproteína (P). Las proteínas N, P y L, junto al RNA viral forman el complejo ribonucleoproteico (RNP), el cual dirige la síntesis secuencial de mRNA a partir de los genes virales, o bien la replicación de los antígenomas (RNAs virales de polaridad positiva). La envoltura lipídica contiene dos proteínas integrales de membrana, la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H), y una proteína asociada a la membrana que interactúa con el complejo RNP, la proteína de matriz (M) (Figura 1) (von Messling et al., 2001).

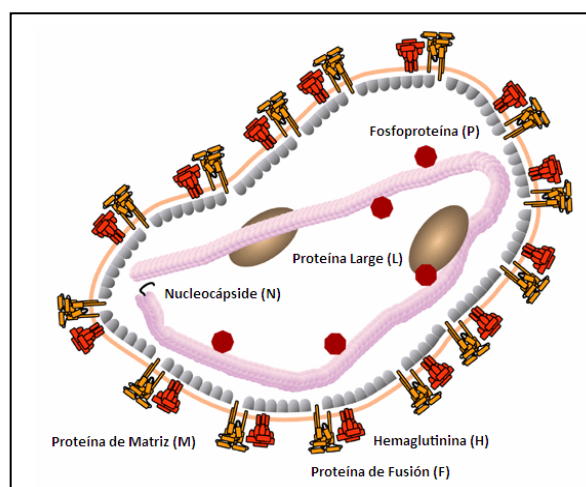


Figura 1. Representación esquemática de un *Morbillivirus*. Tomado de la página web

www.expertreviews.org.

1.1.2.2 Genoma viral

El genoma de CDV presenta seis genes llamados N, P/V/C, M, F, H y L, que codifican las seis proteínas estructurales del virión. Cada gen codifica una única proteína, excepto el gen P/V/C que codifica la fosfoproteína P y dos proteínas no estructurales denominadas C y V (Figura 2).

En los extremos del RNA genómico existen regiones UTR no codificantes, denominadas *leader* 3' y *trailer* 5', que son esenciales para la replicación y transcripción de los genes virales (Lamb & Parks, 2007). Entre genes adyacentes existe un triplete intergénico consenso (GAA) que no se transcribe y que separa a los sitios de poliadenilación de los sitios de inicio de la transcripción (Liermann et al., 1998).

Los genes son transcritos por el complejo RNP a partir de un promotor simple mediante un mecanismo denominado *start-stop*. Este mecanismo implica que la transcripción se inicia en el primer gen del extremo 3' (gen N) y se detiene en cada región intergénica, debido a que la polimerasa viral se escinde del RNA molde, lo cual puede determinar la interrupción del proceso. Por tanto, este mecanismo conduce a un gradiente transcripcional que se mantiene durante la infección; de tal modo que los genes próximos al extremo 3' del genoma se transcriben más que aquellos cercanos al extremo 5' del genoma (Anderson & von Messling, 2008).

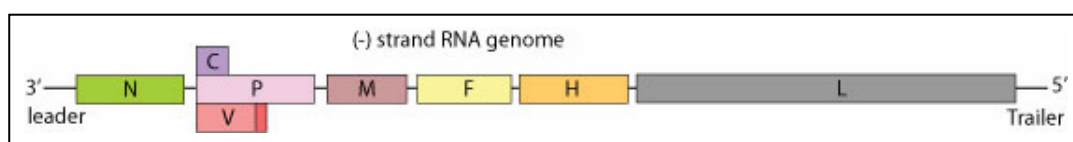


Figura 2. Representación esquemática del genoma de CDV. Imagen tomada del sitio web <http://expasy.org/viralzone>.

1.1.2.3 Proteínas virales

1.1.2.3.1 Proteína de nucleocápside (N)

La proteína de nucleocápside es codificada por el gen N y presenta 525 aminoácidos (aa). La nucleocápside es una proteína de unión al RNA que se autoensambla sobre el genoma viral y el RNA antisentido para formar, junto a las proteínas P y L, el complejo RNP (Figura 1) (Lamb & Parks, 2007).

1.1.2.3.2 Proteínas codificadas por el gen P/V/C: fosfoproteína P y proteínas V y C

La fosfoproteína P está constituida por 507 aa y es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación y forma parte activa del complejo RNP (Figura 1) (Lamb & Parks, 2007).

La proteína C es traducida a partir del mismo mRNA que P, pero presenta un codón de inicio alternativo situado 22 nucleótidos corriente abajo del codón iniciador de la proteína P. Esto produce un corrimiento en el marco abierto de lectura (ORF) generando un codón stop prematuro, lo cual determina que la proteína C tenga una extensión de 174 aa (Bellini et al., 1985).

Por otra parte, la proteína V consta de 299 aa y es traducida a partir del mismo codón de inicio que la proteína P, sin embargo, mediante un proceso de edición del RNA mensajero (mRNA) se añade una guanina que determina un corrimiento en el marco de lectura y la formación de un codón stop prematuro. Ambas proteínas presentan la misma secuencia aminoacídica en los primeros 231 aa, pero los 68 aa del extremo carboxi-terminal de la proteína V difieren de los presentes en la proteína P (Cattaneo et al., 1989).

Se ha sugerido que las proteínas accesorias V y C están involucradas en la evasión de la respuesta inmune mediada por el Interferón- β (Lamb & Parks, 2007).

1.1.2.3.3 Proteína de matriz (M)

La proteína de matriz es codificada por el gen M y está constituida por 335 aa. Esta proteína se posiciona debajo de la envoltura lipídica, e interactúa con el núcleo RNP, la bicapa lipídica y con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas de membrana H y F (Figura 1). Debido a las interacciones que establece, presenta un papel fundamental en la morfología y el ensamblaje del virión (Lamb & Parks, 2007).

1.1.2.3.4 Proteína de fusión (F)

La proteína de fusión es una glicoproteína transmembrana tipo I de 662 aa que participa en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedero (Lamb & Parks, 2007). La proteína F es codificada por el gen F bajo la forma de un precursor inactivo denominado pre-F0; el procesamiento de la proteína implica el reconocimiento del péptido señal (Fsp) por una molécula específica y el subsecuente

transporte hacia el retículo endoplásmico (RE), donde el precursor pre-F0 es procesado co-traduccionalmente (von Messling & Cattaneo, 2002). El procesamiento ocurre entre los aminoácidos 135-136 por la acción de una peptidasa celular (SPase), generando al Fsp de 135 aa y al precursor inmaduro F0 de 527 aa. El precursor F0 es glicosilado y clivado por una furina celular que actúa en el compartimiento del Golgi, formando las subunidades F1 y F2. Estas subunidades forman un heterodímero que constituye la forma activa de la proteína F (Plattet et al., 2007). A nivel de la envoltura, la proteína forma un trímero que interactúa con la hemaglutinina durante el proceso de fusión virus-célula (Figura 3) (von Messling et al., 2004).

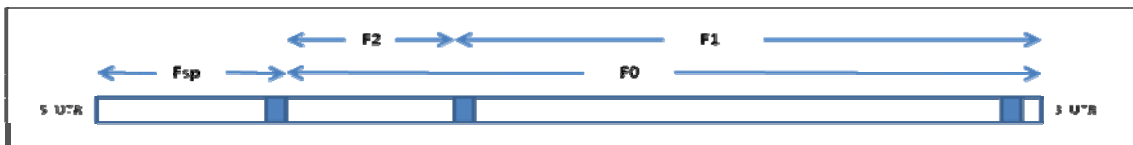


Figura 3. Esquema del gen F con las regiones que codifican para las subunidades de la proteína F.

Modificado de Von Messling & Cattaneo (2002).

1.1.2.3.5 Proteína hemaglutinina (H)

La hemaglutinina presenta 607 aa y es codificada por el gen H; dicha proteína es una glicoproteína transmembrana tipo II que media la unión de los viriones a los receptores celulares, y posee la capacidad de promover la fusión virus-célula (Lamb & Parks, 2007). La proteína H presenta un dominio citoplasmático corto en su extremo amino-terminal, un dominio hidrofóbico transmembrana con funciones de localización y anclaje a la membrana, y un ectodominio carboxilo-terminal (Zipperle et al., 2010). Dicha proteína forma un tetrámero a nivel de la envoltura que interactúa físicamente con la proteína F (Figura 4) (von Messling et al., 2004).

Estudios *in vitro* mostraron que la proteína H es el determinante principal del tropismo celular (Stern et al., 1995). Es probable que no solo el tropismo de CDV, sino también la fusogenicidad en células Vero se mantenga fundamentalmente por acción de la proteína H (von Messling et al., 2001).

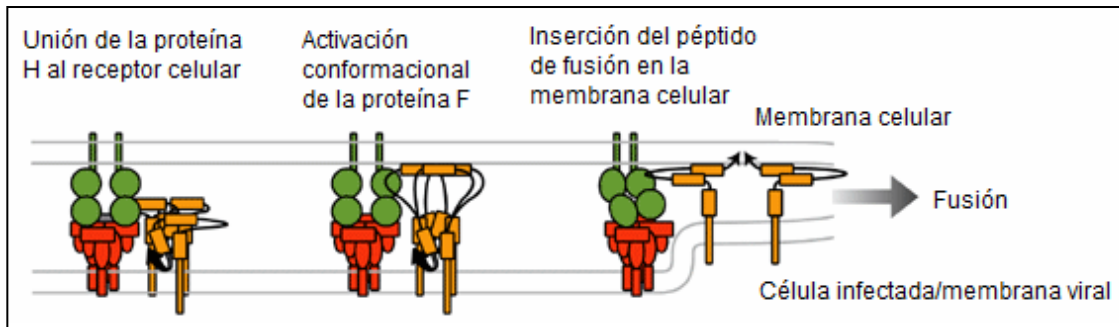


Figura 4. Representación del mecanismo de fusión virus-célula mediado por la hemaglutinina y la proteína de fusión. Modificado de Expert Reviews in Molecular Medicine. Cambridge University Press (2002).

1.1.2.3.6 Proteína *large* (L)

La proteína *large* codificada por el gen L, consta de 2184 aa y es la subunidad fundamental del complejo de la RNA polimerasa por su rol catalítico en la síntesis del RNA viral. La proteína L interactúa con la fosfoproteína P para formar el complejo de la polimerasa activo y es constituyente integral de la nucleocápside del virión (Figura 1) (Lamb y Parks, 2007).

1.1.3 Ciclo replicativo de CDV

1.1.3.1 Unión y fusión virus-célula

La fusión de la envoltura lipídica viral con la membrana plasmática de la célula hospedero ocurre a pH neutro, permitiendo el ingreso del complejo RNP a la célula. La actividad de fusión se realiza mediante la acción concertada de las glicoproteínas de membrana H y F (Stern et al., 1995; Von Messling et al., 2001; Zipperle et al., 2010). El proceso de fusión comienza por la unión de la hemaglutinina al receptor celular SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) presente en linfocitos B y T activados, timocitos inmaduros y células dendríticas. Luego de la unión, la proteína H induce cambios conformacionales sobre la proteína F que favorecen su actividad fusogénica, desencadenando la fusión de la membrana celular y la envoltura viral (Sawatsky & von Messling, 2010). Dicho proceso ocurre por la acción específica del péptido de fusión, localizado en la subunidad F1, sobre la membrana celular del hospedero (Figura 4) (Von Messling et al., 2004).

1.1.3.2 Transcripción y replicación del genoma viral

Tras el ingreso del complejo RNP en el citoplasma ocurre la transcripción del genoma viral. La síntesis del mRNA comienza en el extremo 3' del genoma y los genes son transcritos en mensajeros que codificarán para las proteínas virales. Una vez ocurrida la transcripción, la polimerasa viral comienza la síntesis de los antígenomas que serán utilizados como molde para la producción de nuevos RNA genómicos. Los genomas virales neosintetizados son encapsidados y transportados hacia la membrana plasmática para formar nuevas partículas virales (Figura 5) (Lamb & Parks, 2007).

1.1.3.3 Formación del complejo ribonucleoproteico (RNP) y brotación

El RNA genómico encapsidado por las proteínas N, P y L forma el complejo RNP. Dicho complejo se asocia con la proteína M localizada en la membrana plasmática, donde yacen las glicoproteínas H y F previamente exportadas. Las partículas virales neosintetizadas son liberadas mediante brotación de la membrana celular y poseen la capacidad de infectar nuevas células susceptibles (Figura 5) (Lamb & Parks, 2007).

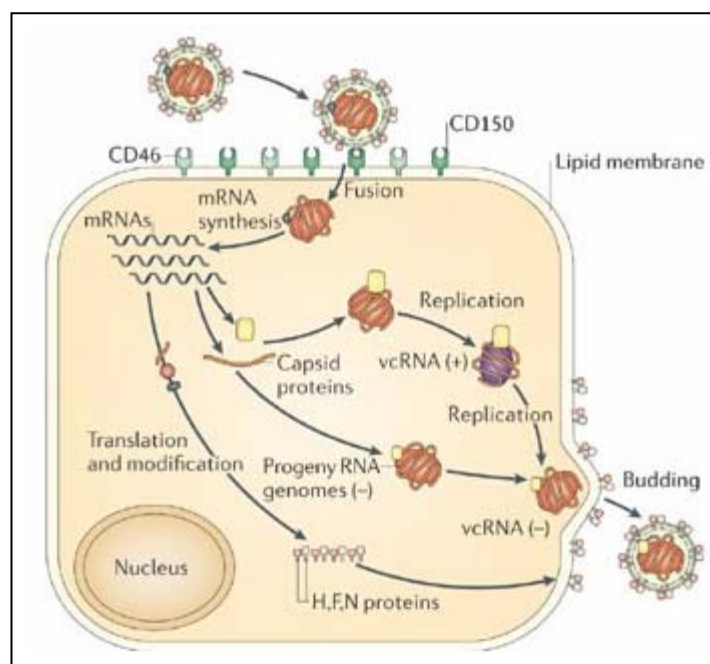


Figura 5. Representación del ciclo de vida de un *Morbillivirus* en la célula del hospedero. Tomado de Moss & Griffin (2006).

1.1.3.4 Propagación entre células del hospedero

Mediante la formación de células multinucleadas (sincitios), el virus se propaga entre las células del hospedero. Los sincitios son el resultado de la fusión de células infectadas que expresan las glicoproteínas virales en su superficie, con células susceptibles que presentan el receptor SLAM (Stern et al., 1995). La proteína H es el determinante principal de la fusogenicidad, por tanto el grado y la eficiencia de la fusión célula-célula se debe principalmente a esta proteína (Von Messling et al., 2001).

1.2 Distemper: patogénesis, sintomatología clínica, epidemiología, prevención y control

1.2.1 Patogénesis

El modo principal de transmisión del virus es a través de aerosoles de secreciones respiratorias. El virus ingresa a través del tracto respiratorio y, dentro de las primeras 24 horas, se disemina vía macrófagos desde los ganglios linfáticos locales hacia las amígdalas y los nódulos linfáticos bronquiales. La replicación viral ocurre en estos órganos entre 2-4 días post-infección (PI). Dentro de los 4-6 días PI, el virus prolifera en los órganos linfoides, y se disemina vía sanguínea a los tejidos epiteliales y al sistema nervioso central (SNC) entre 8-9 días PI (Appel & Summers, 1999).

La patogénesis entre los 9 y 14 días depende de la respuesta inmune humoral y celular del hospedero. Animales con títulos adecuados de anticuerpos y de citotoxicidad celular pueden eliminar al virus de la mayoría de los tejidos sin que se evidencien síntomas clínicos, mientras que animales con una respuesta inmune inadecuada sufren la diseminación del virus a diversos tejidos. En términos generales, la diseminación viral puede determinar infección por un período de 60-90 días (Figura 6) (Deem et al., 2000).

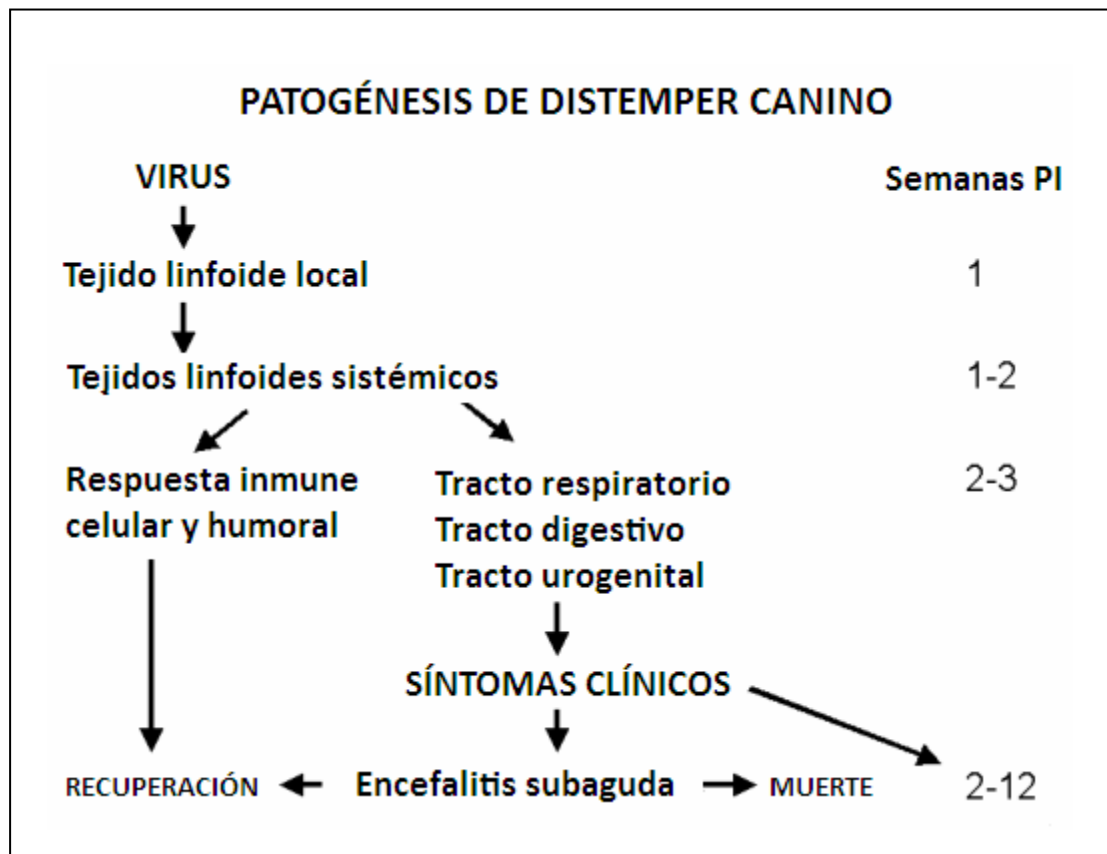


Figura 6. Esquema de la patogénesis de Distemper. PI: post infección. Modificado de Appel & Summers (1999).

1.2.2 Sintomatología Clínica

La sintomatología clínica asociada a la enfermedad depende de la virulencia de la estirpe viral, y de la edad, estado inmune y sanitario del animal. En especies susceptibles, los sistemas respiratorios, gastrointestinal y el SNC son los más comprometidos. Hasta el 70% de las infecciones en canes domésticos son subclínicas, manifestándose la enfermedad de forma leve con ocurrencia de languidez, anorexia, fiebre e infección del tracto respiratorio superior. Sin embargo, la forma aguda de la enfermedad presenta una elevada mortalidad con ocurrencia de síntomas clínicos asociados al sistema respiratorio y gastrointestinal, incluyendo conjuntivitis, descargas óculo-nasales (Figura 7A), neumonía, diarrea (muchas veces hemorrágica) y deshidratación severa (Deem et al., 2000). Los animales infectados eliminan al virus en todas las excreciones corporales, independientemente de los síntomas clínicos que presenten (Frolich et al., 2000).

La primera viremia ocurre entre los días 4-6 PI y produce la infección de los tejidos linfáticos con aparición de fiebre y el comienzo de la linfopenia. La segunda viremia se acompaña de pirexia y determina la infección de las células epiteliales de todos los tejidos del cuerpo. Esta viremia se acompaña por la aparición de sarpullidos e hiperqueratosis, y determina el comienzo de la fase sintomática (Figura 7B y 7C). Dependiendo de la cepa viral, puede ocurrir encefalomiелitis aguda en asociación o inmediatamente después de la manifestación sistémica (von Messling et al., 2003); dentro de las numerosas manifestaciones neurológicas asociadas a la infección (rigidez cervical, convulsiones, síntomas vestibulares y cerebrales y ataxia sensorial), la mioclonía es el único síntoma neurológico sugestivo de Distemper (Deem et al., 2000). La inmunosupresión severa y duradera asociada a la infección por CDV, potencia la susceptibilidad individual a infecciones secundarias, lo cual contribuye a las elevadas tasas de mortalidad de la enfermedad. El ingreso del virus a los linfocitos mediada por la interacción con el receptor SLAM, es considerado un posible determinante de la inmunosupresión; de hecho, la expresión del SLAM en diversos tipos celulares se asocia con la diseminación de la infección a través del sistema linfático (von Messling et al., 2005).

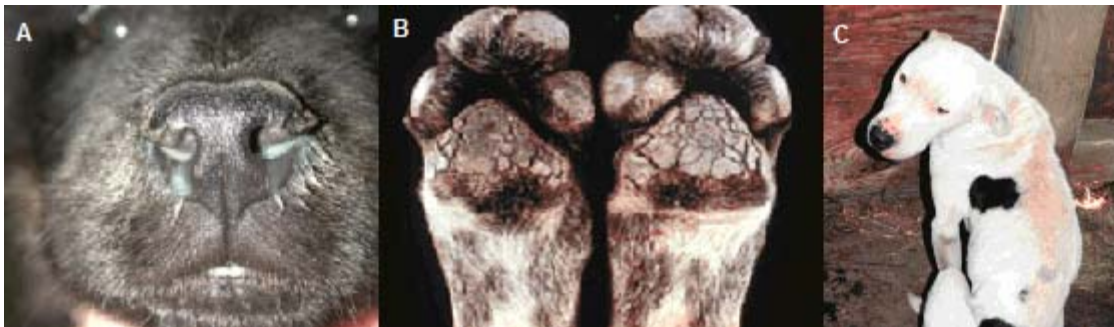


Figura 7. Manifestaciones clínicas secundarias características de infección por CDV. A - descarga óculo-nasal; B - hiperqueratosis plantar; C - sarpullido. Tomado del sitio web www.adoptagdl.com

1.2.3 Epidemiología

CDV representa una importante amenaza para carnívoros domésticos y silvestres en todo el mundo. En cánidos domésticos, Distemper es una de las enfermedades virales de mayor incidencia con elevadas tasas de mortalidad (Appel & Summers, 1999), y en las últimas décadas se han reportado infecciones en todas las familias de carnívoros

terrestres: *Canidae*, *Felidae*, *Hyaenidae*, *Mustelidae*, *Procyonidae*, *Ursidae*, y *Viverridae* (Deem et al., 2000; Frolich et al., 2000).

En algunas regiones geográficas los carnívoros silvestres representan el reservorio del virus en la naturaleza, posibilitando su transmisión a canes domésticos. En Norteamérica se han registrado epidemias regulares de Distemper en mapaches (*Procyon lotor*), y en Japón se han registrado brotes de la enfermedad en civetas (*Paguma larvata*), los cuales tienen un rol fundamental en la transmisión de la enfermedad a canes y a otras especies silvestres susceptibles (Hashimoto et al., 2001; Lednicky et al., 2004). Alternativamente, en diversas regiones de África donde no se implementan planes de vacunación adecuados, los canes son el reservorio del virus, los cuales lo transmiten a la fauna silvestre (Deem et al., 2000).

1.2.4 Prevención y control de la enfermedad

La vacunación es la principal estrategia para controlar a la enfermedad en canes domésticos. Las vacunas con virus vivos atenuados (VVA) estimulan la respuesta inmune humoral y celular e inducen memoria inmunológica. El desarrollo y la utilización de estas vacunas desde la década del 50, ha contribuido a una drástica reducción en la incidencia de Distemper en canes domésticos. Sin embargo, recientemente se han observado brotes de la enfermedad en poblaciones inmunizadas de canes de diversas regiones geográficas (Gemma et al. 1996, Bolt et al., 1997, Ek-Kommonen et al. 1997, Keawcharoen et al. 2005, Lan et al. 2006, Calderón et al. 2007). Aunque no se han determinado las causas, dichos brotes podrían explicarse por la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia (Appel, 1987), o por la emergencia de nuevas cepas lo suficientemente variables como para evadir la respuesta inmune generada por las vacunas (Pardo et al., 2005). Los casos en poblaciones vacunadas también podrían explicarse por fallas en la administración de las vacunas, o bien por el estado sanitario e inmunológico del animal (Figura 8) (Rikula, 2008).

Las vacunas utilizadas en nuestro país están principalmente formuladas con la cepa Onderstepoort (OP), la cual fue atenuada por numerosos pasajes en líneas celulares y huevos embrionados (Haig, 1956). Dicha cepa data de un brote de la enfermedad de la década del 30 ocurrido en zorros de Norte América. Se estableció que las cepas

circulantes en la actualidad presentan elevados valores de divergencia respecto a esta cepa vacunal (Martella et al., 2006).

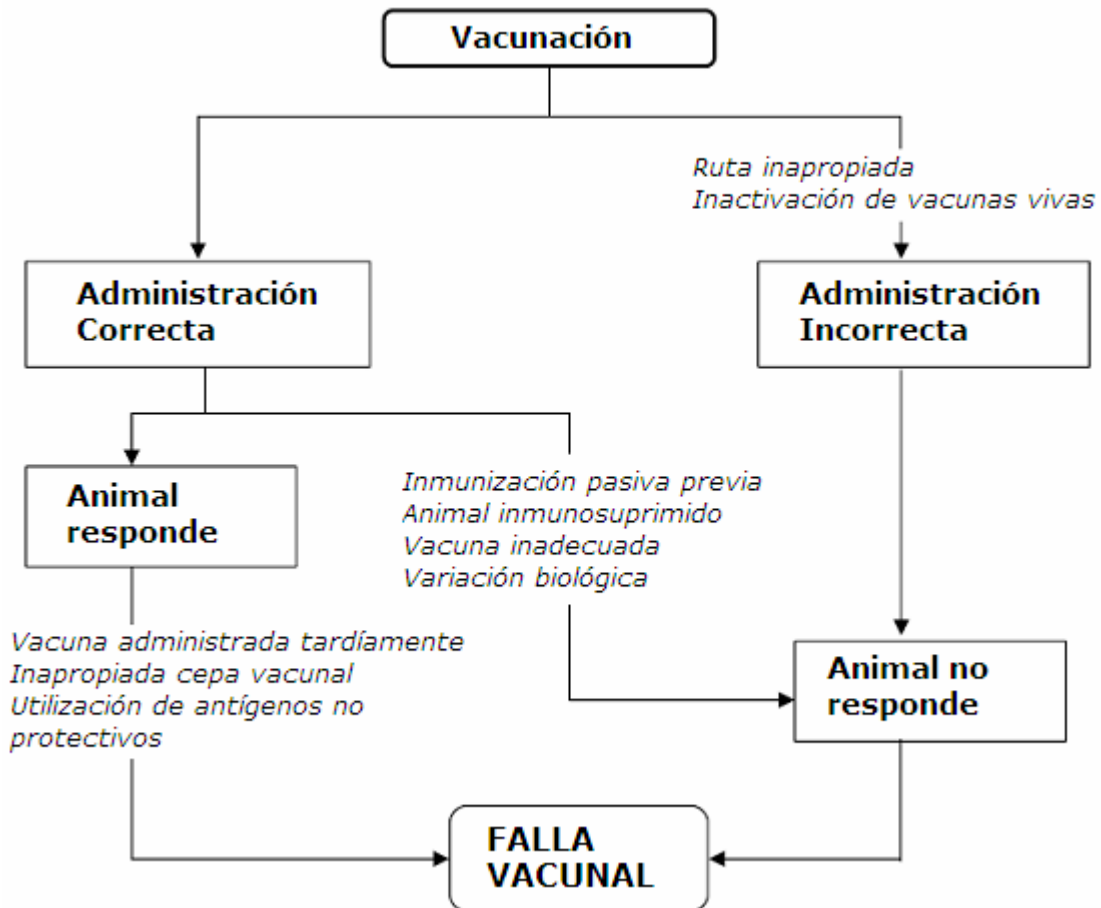


Figura 8. Razones generales de fallas asociadas a la vacunación. Modificado de Rikula (2008).

1.3 Detección de CDV en muestras clínicas

Los síntomas clínicos asociados a la infección por CDV son similares a los producidos por otros agentes virales, como el virus parainfluenza canino, adenovirus canino tipo 2 o coronavirus respiratorio canino, provocando frecuentemente confusión en el diagnóstico clínico (Demeter et al., 2007). Por tanto, se han desarrollado diversas metodologías de diagnóstico complementario, entre las que se incluyen las técnicas serológicas como ensayos de inmunohistoquímica y ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), y las técnicas moleculares como el ensayo de RT-PCR (Retro-Transcripción – Reacción en Cadena de la Poliermasa).

1.3.1 Ensayos serológicos

El diagnóstico serológico se realiza mediante la detección de anticuerpos del tipo IgM anti-CDV (Blixenkrone-Moller et al., 1991). Actualmente se acepta que existe un único serotipo de CDV, observándose que aislamientos con diferentes propiedades biológicas pueden reaccionar de igual modo en ensayos con anticuerpos monoclonales (mAbs) (Appel & Summers, 1999). La técnica ELISA se emplea para detectar estos anticuerpos, y determinar el inicio o el desarrollo reciente de la infección en animales con síntomas clínicos presuntivos de Distemper. Sin embargo, animales con infección aguda pueden perecer sin presentar títulos mensurables de anticuerpos, o animales con infecciones subclínicas pueden presentar títulos de IgM semejantes a los de animales vacunados (Appel & Summers, 1999).

El ensayo de inmunohistoquímica se utiliza para detectar antígenos virales y/o cuerpos de inclusión en células bronquiales, nódulos linfáticos, vejiga urinaria, o bien en tejidos del SNC. Esta técnica ofrece resultados confiables únicamente en aquellos casos donde se registra una marcada viremia, además puede realizarse exclusivamente en muestras tomadas *post-mortem* (Frisk et al., 1999).

1.3.2 Técnicas moleculares

1.3.2.1 RT-PCR tiempo final

En las últimas décadas se han desarrollado metodologías moleculares basadas en RT-PCR, las cuales permiten realizar un diagnóstico *ante-mortem* preciso en casos presuntivos de infección por CDV (Stern et al., 1995; Frisk et al., 1999). En los estudios diagnósticos, los blancos de amplificación son genes o regiones genómicas que presentan un alto grado de conservación entre los aislamientos, como ser N, P y M (Frisk et al., 1999; Kim et al., 2001; Goller et al., 2009; Si et al., 2010). Frisk et al. (1999) desarrollaron un método muy eficaz de detección del genoma de CDV basado en la amplificación de un fragmento conservado de 287 pb del gen N, el cual fue utilizado posteriormente por diversos autores (Gebara et al., 2004; Elia et al., 2006; Saito et al., 2006; Calderón et al., 2007; Sarute et al., 2011).

Si bien la RT-PCR en tiempo final se utiliza comúnmente en ensayos de diagnóstico molecular, presenta algunas limitaciones tales como el bajo rendimiento de la misma

en muestras con títulos virales discretos, y problemas de contaminación asociados a la manipulación del amplicón (Elia et al., 2006).

1.3.2.2 RT-PCR tiempo real

El desarrollo de la tecnología del RT-PCR en tiempo real constituye uno de los aportes más relevantes aplicado al diagnóstico viral (Mackay, 2007; Scagliarini et al., 2007). Mediante esta técnica, se han implementado metodologías diagnósticas más rápidas y específicas, capaces de detectar al agente viral incluso en muestras con cargas virales discretas. Además, presenta la ventaja de no requerir manipulación post-reacción evitando posibles problemas de contaminación (Mackay, 2007). La detección de un bajo número de copias de RNA viral es útil para la identificación de perros infectados que no presentan sintomatología (manifestación subclínica) pero que contribuyen activamente a la diseminación del virus (Scagliarini et al., 2007).

A la fecha, se cuenta con sólo tres estudios de detección del genoma de CDV por RT-PCR en tiempo real. En Sudamérica, existe un único estudio basado en la utilización del agente intercalante SYBR Green para la detección del genoma viral (Del Puerto et al., 2010). En Europa, Elia y cols (2006) desarrollaron un método de detección basado en la hibridación y amplificación de una región conservada del gen N mediante química TaqMan, mientras que Scagliarini y cols (2007) implementaron un método basado en la misma estrategia, amplificando una región conservada del gen P.

Los métodos basados en sondas de hidrólisis TaqMan son sistemas de detección específicos, debido a que permiten discriminar entre la secuencia de interés y posibles amplicones inespecíficos o dímeros de cebadores. Estas sondas presentan un fluoróforo unido al extremo 5', y una molécula *quencher* en el extremo 3' la cual absorbe la energía emitida por el fluoróforo si ambos se encuentran próximos físicamente. Cuando la *Taq* polimerasa comienza a polimerizar a partir de los cebadores y se encuentra con el extremo 5' de la sonda, lo degrada gracias a su actividad exonucleasa 3'-5'. Este proceso libera al fluoróforo y lo separa del *quencher*, lo cual ocasiona un incremento de la fluorescencia que es detectada por el equipo de PCR (Figura 9). El parámetro fundamental de la reacción es el ciclo umbral (Ct), definido como el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento

significativo de la fluorescencia respecto a la señal de base; este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas de DNA molde (Mackay, 2007).

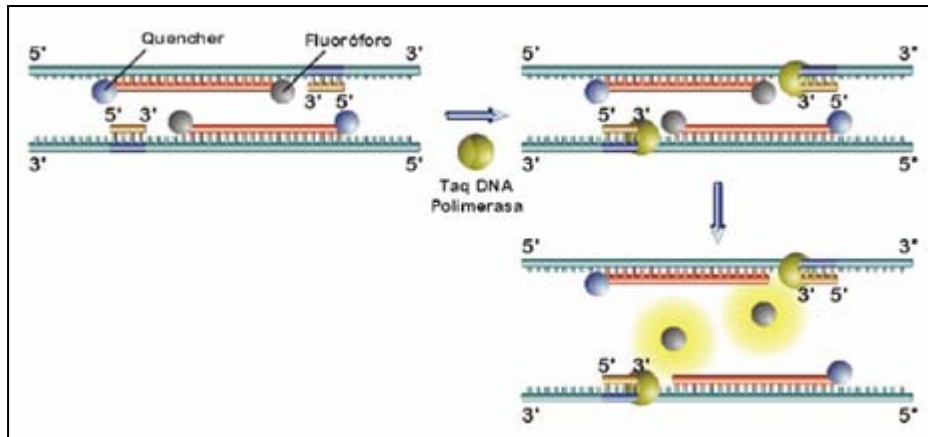


Figura 9. Representación esquemática de amplificación por PCR tiempo real mediante sondas TaqMan.

Tomado de Mackay, 2007.

1.4 Caracterización genética de CDV

La amplificación por RT-PCR tiempo final y posterior secuenciación de los amplicones permite conocer y comparar los aislamientos de campo, con el fin de establecer sus niveles de variabilidad genética respecto a aislamientos de diferentes regiones geográficas y las cepas vacunales. En los estudios de caracterización los blancos de amplificación son genes o regiones genómicas con altos niveles de variabilidad genética.

1.4.1 Hemaglutinina

El gen H es el más variable del genoma de los *Morbillivirus*. A nivel de su secuencia aminoacídica se detectan valores de divergencia del 8% entre aislamientos de campo, y de hasta el 11% respecto a las cepas vacunales (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006).

En base al análisis de la hemaglutinina se han descrito los linajes de CDV circulantes en el mundo. El criterio establece que dos aislamientos pertenecen a un mismo linaje si se agrupan dentro de un mismo clado en la filogenia y presentan una variación aminoacídica menor al 4%. Si los aislamientos se agrupan en clados distintos y presentan valores de divergencia mayores al 4%, pertenecen a linajes distintos (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006). Los linajes de CDV se distribuyen según un patrón de

distribución geográfica, salvo escasas excepciones (Martella et al., 2006). Hasta la fecha, se han identificado ocho linajes en el mundo: África, América-1 (correspondiente al linaje de las cepas vacunales), América-2, Asia-1, Asia-2, Europa-1, Europa-2 (*Europe wild-life*) y Europa-3 (*Arctic-like*) (Figura 10) (Mochizuki et al., 1999; Hashimoto et al., 2001; Lednicky et al. 2004; Martella et al., 2006; Demeter et al., 2007; An et al., 2008; Woma et al., 2009).

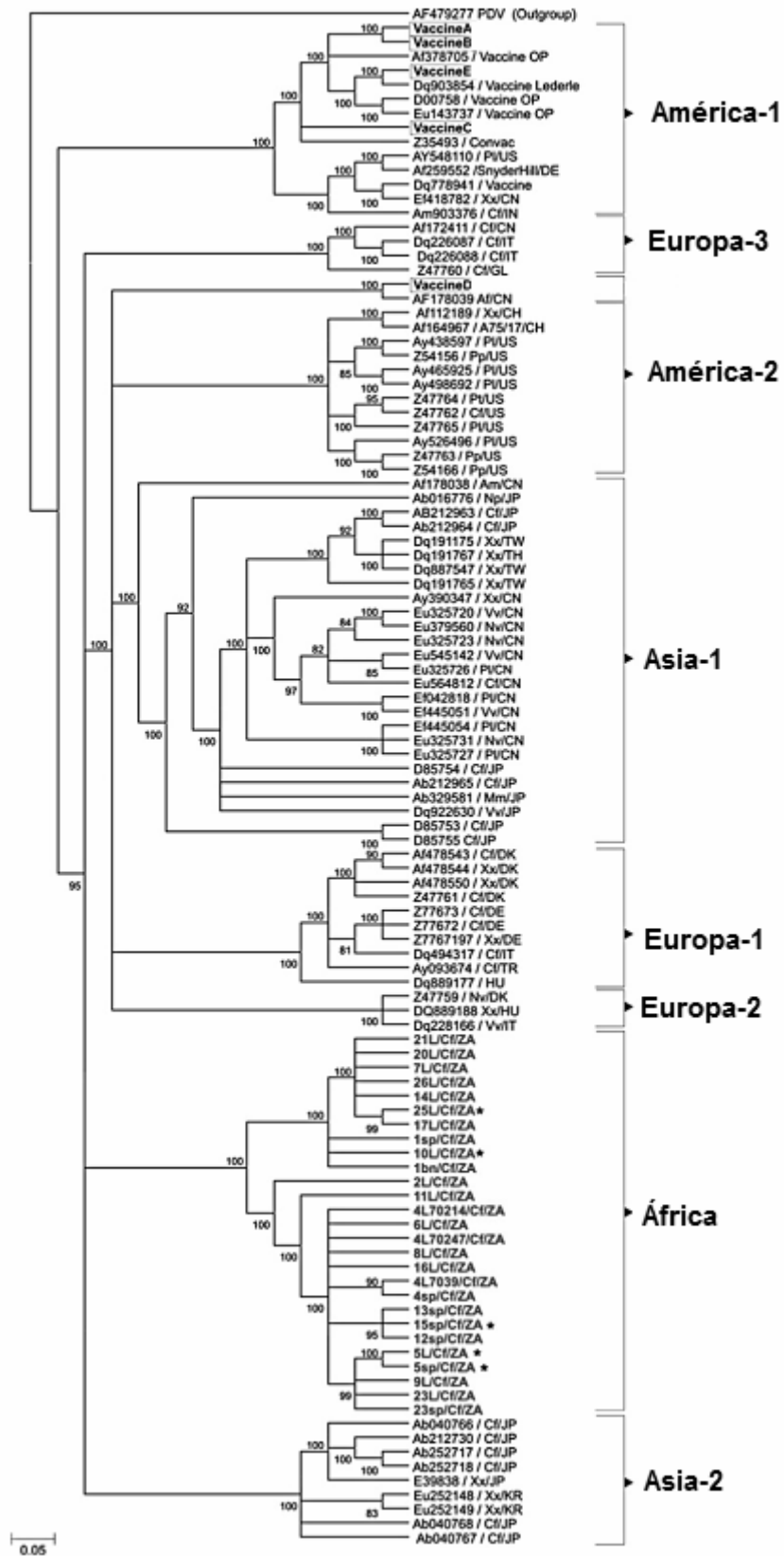


Figura 10. Cladograma en base a la secuencia nucleotídica completa del gen H (1824 pb) de aislamientos de CDV. Extraído de Woma et al., 2009.

La proteína H es el determinante principal del tropismo celular ya que interactúa con el receptor celular SLAM mediante aa de reconocimiento específicos (Seki et al., 2003). El modelado de su estructura permitió identificar que los residuos 530 y 549 están involucrados en la adsorción viral mediada por el receptor SLAM (Vongpunsawad et al. 2004; von Messling et al. 2005; McCarthy et al., 2007). El análisis de aislamientos de campo determinó que dichos residuos difieren entre cepas aisladas de hospederos domésticos y silvestres. En el residuo 530 se observan los aminoácidos glicina (G) y ácido glutámico (E) en la mayoría de los aislamientos de canes domésticos, mientras que las cepas aisladas de especies silvestres muestran los aa aspartato (D), asparagina (N) y arginina (R). A nivel del residuo 549, el aa tirosina (Y) es característico de aislamientos de canes, mientras que en aislamientos de silvestres se registra la sustitución por histidina (H), sugiriendo que la dispersión del virus a otros hospederos podría asociarse a cambios en estos sitios (McCarthy et al., 2007).

Las cadenas de N-glicanos presentes en la proteína H también podrían influir sobre las interacciones con el receptor SLAM y el ingreso del virus a la célula. Se demostró en otras glicoproteínas de *Paramyxovirus* que la N-glicosilación es fundamental para el correcto plegamiento, transporte y función de la proteína (von Messling et al., 2001). El posible rol de la N-glicosilación en la fisiología de la hemaglutinina de CDV se analizó recientemente mediante la construcción de variantes con la proteína deglicosilada. Los virus con proteína H deglicosilada mantenían su funcionalidad, aunque presentaban un fenotipo atenuado *in vivo*, demostrando que se requiere un mínimo de N-glicanos para la virulencia (Sawatsky & von Messling, 2010).

1.4.2 Péptido señal de la proteína de fusión

EL gen F es el segundo más variable dentro del genoma de CDV. A nivel de su secuencia aminoacídica, la proteína F varía en torno al 4% entre aislamientos de campo. Sin embargo, los primeros 135 aa correspondientes al Fsp varían hasta un 27% (von Messling & Cattaneo, 2002). La comparación entre aislamientos de campo y la cepa vacunal OP, mostró valores de variabilidad aminoacídica entre 30 y 49% (Plattet et al., 2007; Lee et al., 2008; Sultan et al., 2009). Los valores de variabilidad de la región Fsp son incluso superiores a los descritos para la hemaglutinina, comenzándose

a utilizar en estudios de caracterización y evolución de CDV (Lee et al., 2008; Sultan et al., 2009).

El Fsp no se encuentra en las partículas virales debido a que la maduración de la proteína F requiere su procesamiento proteolítico. Sin embargo, estaría involucrado indirectamente en la actividad la proteína F, limitando su expresión a nivel intracelular y en la superficie, con la consecuente reducción de los niveles de fusión célula-célula (Plattet et al., 2007). Esta región también contribuiría a la virulencia e incluso en la patogénesis viral (Von Messling & Cattaneo, 2002; Plattet et al., 2007). Se han analizado los efectos de la eliminación de aa del Fsp y su posible relación con la función de la proteína; la deleción de los primeros 60 aa determinó un incremento de la actividad de fusión de 15 órdenes, mientras que la reducción adicional del Fsp a 8 aa resultó en un incremento de 70 órdenes en la actividad de fusión, sustentando que el acortamiento del Fsp determina un incremento en la fusogenicidad viral (von Messling & Cattaneo, 2002). Sin embargo, estudios *in vivo* sugieren que el péptido señal no es esencial para la virulencia, ya que infecciones experimentales con virus carentes del Fsp, resultaron en el desarrollo de la enfermedad y la muerte de los animales (Anderson & von Messling, 2008).

1.5 Antecedentes del grupo de trabajo

En los últimos años se han registrado numerosos casos de Distemper en nuestro país, incluso en canes vacunados. Debido a ello, implementamos por primera vez en el país una metodología molecular de detección de CDV (Sarute et al., 2011); esta metodología se basa en la amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen N (Frisk et al., 1999). Su aplicación nos permitió constatar la presencia del genoma viral en el 86% de las muestras analizadas, de las cuales el 74% correspondieron a animales vacunados. El análisis de las secuencias de ocho aislamientos de campo mostró elevados valores de identidad nucleotídica (99.6 – 100 %) confirmando y extendiendo resultados previos sobre la conservación de esta región genómica y su utilidad en ensayos de diagnóstico molecular. La comparación de estas secuencias con la cepa vacunal OP, reveló numerosas variaciones nucleotídicas. Estas diferencias nos permitieron diseñar un método de RFLP para discriminar entre la cepa vacunal y los virus de campo. Los resultados obtenidos nos permitieron constatar que

la infección de los canes fue causada por un virus de campo y no debido a la reversión de la cepa vacunal (Sarute et al., 2011).

Con el objetivo de avanzar en la investigación nos propusimos desarrollar nuevas metodologías diagnósticas, así como relevar la variabilidad genética de las cepas circulantes en la región. Durante el presente trabajo de Tesis, desarrollamos un método de detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real, y caracterizamos aislamientos de CDV del Río de la Plata, mediante el análisis de las regiones más variables e informativas del genoma: la secuencia completa del gen H y la región Fsp.

1.6 Hipótesis de trabajo

- Los métodos moleculares permiten realizar un diagnóstico rápido y sensible de Distemper.
- El análisis del gen H y la región Fsp de aislamientos de nuestra región nos permitirá establecer el grado de variabilidad existente en las cepas circulantes.

1.7 Objetivos

Objetivo General

Detectar y caracterizar genéticamente aislamientos de campo de CDV del Río de la Plata.

Objetivos Específicos

- Desarrollar un sistema de diagnóstico basado en RT-PCR en tiempo real.
- Establecer la variabilidad genética de aislamientos uruguayos y argentinos mediante el análisis de la secuencia completa del gen de la hemaglutinina y la región Fsp del gen de la proteína de fusión.
- Inferir las relaciones evolutivas entre los aislamientos del Río de la Plata y cepas caracterizadas en otras regiones geográficas, mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de ambos marcadores.

2. MATERIALES y MÉTODOS

2.1 Muestras

Se analizaron muestras de orina, sangre y secreciones óculo-nasales de 30 canes con síntomas presuntivos de infección por CDV procedentes de Uruguay y Argentina (Tabla 1). La colecta del material biológico fue realizada por médicos veterinarios y el mismo se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento.

Las muestras uruguayas fueron colectadas en el período 2006-2010, mientras que las argentinas se colectaron durante 2003-2010. Estas últimas fueron procesadas y analizadas en el marco de una pasantía regional financiada por la red AMSUD-Pasteur en el Instituto Milstein (CONICET) de Buenos Aires.

Además, se utilizaron muestras provenientes de animales sin sintomatología clínica como controles negativos. Para estandarizar los ensayos de diagnóstico y caracterización molecular, se usaron muestras de vacunas comerciales de CDV (cepa Onderstepoort, Puppy DP Nobivac, Intervet, The Netherlands) y del Virus de la Bronquitis Infecciosa Aviar (IBV) (cepa Massachussets, Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA).

2.2 Extracción del genoma viral

La extracción del RNA viral se realizó mediante dos protocolos diferentes dependiendo del origen de la muestra. En ambos protocolos se adicionó a las muestras 0.5 µl de una solución de 1 mg de la vacuna de IBV diluida en 1ml de 1X PBS pH=8 que se utilizó como control interno (CI) en las reacciones de RT-PCR tiempo real.

Tabla 1. Muestras empleadas en el estudio. Se detalla la denominación, edad, procedencia, estado de vacunación y sintomatología de los animales. NV: no vacunado; V: vacunado; DS: desconocido; SN: sintomatología neurológica; GI: sintomatología gastrointestinal; SR: sintomatología respiratoria; Conj: conjuntivitis.

Muestra	Edad (meses)	Procedencia	Vacunación	Sintomatología Clínica				
				SN	GI	SR	Conj	Otros
CDV75	5	San José (Santa Lucía)	V	+	-	+	+	Leucopenia
CDV116	8	Montevideo	V	+	-	+	-	
CDV127	24	Canelones (Santa Rosa)	V	-	-	+	+	
CDV128	6	Canelones (Santa Rosa)	NV	-	-	+	+	
CDV 134	32	Colonia	V	+	-	-	-	
CDV139	12	San José (Santa Lucía)	V	-	-	+	+	Pirexia
CDV141	2	ND	V	+	-	+	+	
CDV 142	20	Montevideo	V	+	-	-	-	
CDV 143	18	Montevideo	DS	-	+	-	+	Pirexia
CDV 144	14	Montevideo	NV	-	+	+	+	Depresión
CDV 145	10	Montevideo	V	-	+	+	+	Depresión
CDV 146	6	Canelones (Santa Rosa)	NV	+	+	-	+	Pirexia
CDV 148	2	Tacuarembó	V	-	+	-	+	Pirexia
CDV 149	3	Montevideo	NV	+	-	-	-	
CDV 150	4	Tacuarembó	V	+	+	-	+	Depresión
CDV 162	12	DS	V	+	+	-	-	
CDV 164	36	DS	V	-	+	+	+	Pirexia
CDV 166	3	Rivera	V	-	+	-	-	
CDV 167	3	Montevideo	V	+	+	-	+	
CDV 168	2	Montevideo	NV	-	+	-	+	Depresión
CDV 169	3	DS	V	+	+	+	+	
CDV 170	3	DS	NV	-	-	+	-	Pirexia
CDV 172	2	Tacuarembó	V	-	+	+	-	Depresión
CDV 190	7	San José (Santa Lucía)	V	+	-	-	-	Pirexia
CDV 191	4	Montevideo	V	-	-	+	-	
CDV 0801	12	Rocha (Chuy)	V	+	-	-	-	
Arg-23	15	Bahía Blanca	V	+	-	-	+	
Arg-24	4	Bahía Blanca	V	+	+	+	+	Hiperquerat irosis
Arg-25	10	Buenos Aires (Capital Federal)	V	+	+	+	+	Pirexia, Hiperquerat irosis
Arg-26	48	Buenos Aires (Capital Federal)	V	+	+	+	+	Pirexia

1. En los casos de orina y liofilizado vacunal OP (un vial de la vacuna en 800 µl de 1X PBS pH=8), se utilizó el kit de extracción libre de células "QIAmp Viral RNA Mini Kit" (Qiagen) a partir de 140 µl de fluido, según el siguiente protocolo:

- Agregar 560 µl de *buffer* de lisis y 5.6 µl de RNA *carrier* a un tubo de 1.5 ml.
- Adicionar 140 µl de fluido. Mezclar con *vortex* por 15 s.
- Incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 min.

- Centrifugar por 15 s a 13.000 rpm.
- Adicionar 560 µl de etanol absoluto y mezclar con *vortex* por 15 s.
- Agregar 630 µl de la solución a una columna “QIAamp Mini column” y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Repetir el paso anterior.
- Adicionar 500 µl de *buffer* de lavado 1 y centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Colocar la columna en un nuevo tubo y descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de *buffer* de lavado 2 y centrifugar a 13.000 rpm por 3 min. Descartar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 1 min.
- Colocar la columna en un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 60 µl de *buffer* de elución. Incubar a TA por 1 min y centrifugar a 8000 rpm por 1 min.

2. En los casos de secreciones óculo-nasales y sangre periférica, la extracción se realizó mediante el reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) a partir de un homogeneizado de 200 µl de muestra y 1 ml de TRIzol, de acuerdo al siguiente protocolo:

- Mezclar con *vortex* e incubar a TA por 5 min.
- Adicionar 200 µl de cloroformo, mezclar por inversión e incubar a TA por 3 min.
- Centrifugar a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml y adicionar 500 µl de isopropanol. Mezclar por inversión.
- Incubar a TA por 10 min y centrifugar a 12.000 rpm por 20 min a 4 °C.
- Descartar el isopropanol. Adicionar 500 µl de etanol 70% y centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- Aspirar el etanol. Secar el *pellet* RNA a TA por 10 min.
- Adicionar 20-40 µl de agua libre de RNAsas precalentada a 50 °C.
- Incubar a TA por 5 min. Resuspender el *pellet* RNA.

2.3 Ensayos de retrotranscripción y PCR

2.3.1 Retrotranscripción

El DNA complementario (cDNA) se sintetizó mediante retrotranscripción con el kit “RevertAid M-M μ LV Reverse Transcriptase” (Fermentas), de acuerdo al siguiente protocolo:

- Colocar en un tubo 5 - 10 μ l de RNA y 15 - 20 pmol de cebador directo.
- Incubar la mezcla a 70 $^{\circ}$ C por 5 min, llevar a hielo por 2 min.
- Adicionar 4 μ l de *buffer* M-M μ LV, 2 μ l de dNTPs 10mM y 1 μ l de Ribolock RNAase inhibitor e incubar a 37 $^{\circ}$ C por 5 min.
- Agregar 1 μ l de RT RevertAid M-M μ LV Reverse Transcriptase.
- Incubar a 42 $^{\circ}$ C por 60 min y a 70 $^{\circ}$ C por 10 min.

Se utilizaron distintos cebadores de acuerdo al ensayo. En los ensayos diagnósticos mediante RT-PCR en tiempo real, el cDNA del gen N se generó a partir del cebador p1 (Tabla 2). Cuando se incorporó el uso de un control interno en los ensayos de diagnóstico, la reacción de RT se realizó con cebadores hexámicos universales (Integrated DNA Technologies) capaces de retrotranscribir en forma conjunta al genoma de CDV e IBV.

Para los estudios de caracterización, se generó el cDNA correspondiente a la secuencia completa del gen H a través de los cebadores FUP y FI7742 (Figura 11; Tabla 2), mientras que el de la región Fsp fue obtenido mediante el cebador F4784 (Tabla 2).

2.3.2 RT-PCR en tiempo real

El genoma de CDV se detectó mediante la amplificación de un fragmento de 101 pb con los cebadores F906-R1007 y la sonda TaqMan CDV-NR (Tabla 2).

Dicha sonda presenta en el extremo 5' a la molécula 6-carboxifluoresceína (FAM) como fluoróforo y a la tetrametilrodamina (TAMRA) como molécula *quencher* en el extremo 3'.

Mediante el juego de cebadores IBV F391-IBV R533 y la sonda IBV 5'UTR se amplificó y detectó un fragmento de 142 pb del genoma de IBV, utilizado como CI (Tabla 2). La sonda IBV 5'UTR presenta VIC como fluoróforo, y TAMRA como molécula *quencher*. El juego de cebadores y sonda fue gentilmente cedido por la Licenciada Ana Marandino.

Las condiciones de ciclado se detallan en la Tabla 3 (Protocolo 1). Los experimentos se realizaron en el equipo ABI-7500 (Applied Biosystems) de la Sección Genética Evolutiva mediante el software ABI-7500 versión 3.0.

Tabla 2. Cebadores y sondas TaqMan utilizados en las reacciones de RT-PCR tiempo final y PCR tiempo real. Se señala con asterisco el cebador p1 descrito por Frisk et al. (1999), y los cebadores IBV F391-R533 y la sonda IBV-5'UTR descritos por Callison et al. (2006).

Cebadores y sondas	Secuencia nucleotídica (5' - 3')	Posición en el genoma
gen N (CDV)		
p1*	ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT	769-789
F906	GCT AGT TTC ATC CTA ACT ATC A	906-926
R1007	CAT AAG GGA TTC AAT AGT TGT TA	984-1007
CDV-NR	FAM – AGA GCC GGA TAC ATA GTT TCT GCC A – TAMRA	939-958
gen F (CDV)		
F4784	CCA CGC ACT TGC CTG ATC TCA	4784-4805
F4854	TCC AGG ACA TAG CAA GCC AAC A	4854-4876
R5535	GGT TGA TTG GTT CGA GGA CTG AA	5512-5535
gen H (CDV)		
FUP	CAC TCA AGC AGC ATA CTA AGG TCG	6854-6878
F7061	GGC TCA GGT AGT CCA GCA ATG	7061-7083
FI7742	GCT ATC TCA GAC GGA GTG TAT GG	7742-7765
RI8094	GAG CGA CAG GTA TCA CCT CTT C	8072-8094
R8492	ACT GGT CTC CTC TAC TTG CTT TG	8469-8492
RE8969	GTC GGT AAG GGA TTT CTC ACC AC	8946-8969
IBV (CI)		
IBV F391*	GCT TTT GAG CCT AGC GTT	391-409
IBV R533*	GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G	511-533
IBV- 5'UTR*	VIC-CAC CAC CAG ACC TGT CAC CTC-TAMRA	444-465

2.3.3 PCR tiempo final

2.3.3.1 Amplificación de la secuencia codificante del gen H

La secuencia completa del gen H fue amplificada en dos fragmentos solapantes mediante PCR (Figura 11). Un fragmento de 1038 pb de la región 3' (fragmento HI) se amplificó utilizando los cebadores F7061-RI8094, y un fragmento de 1227 pb de la región 5' (fragmento HD) se obtuvo mediante el juego de cebadores FI7742-RE8969 (Tabla 2). Se diseñó también un cebador (R8492) que se utilizó junto al cebador FI7742 para amplificar un fragmento de 750 pb (Figura 11).

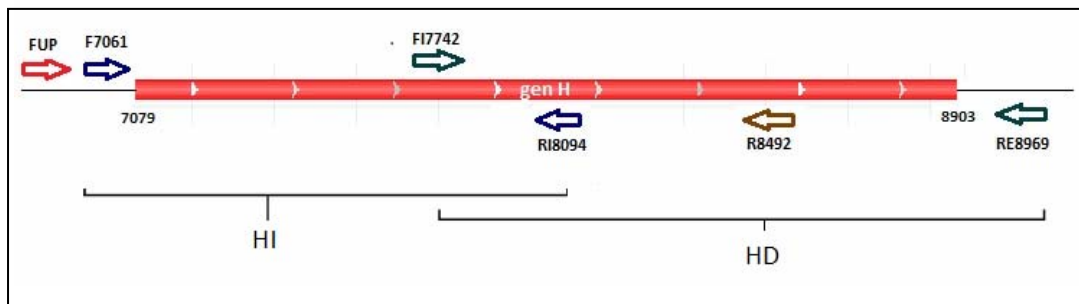


Figura 11. Representación del gen H y de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR. La secuencia de los cebadores se describe en la Tabla 2.

Las condiciones empleadas para la amplificación del gen H por PCR se detallan en la Tabla 3 (Protocolo 2). Las reacciones se realizaron en el termociclador con gradiente de temperatura "CG1/96" (Corbett Research).

2.3.3.2 Amplificación de la región codificante del Fsp

La amplificación de un fragmento de 681 pb del gen F, el cual incluye a la región Fsp (405 pb), se realizó con el juego de cebadores F4854 y R5535 (Tabla 2). La reacción de PCR se realizó con las condiciones detalladas en la Tabla 3 (Protocolo 3), en un termociclador con gradiente de temperatura "CG1/96" (Corbett Research).

Tabla 3. Protocolos estandarizados de PCR. Protocolo 1, amplificación del gen N. Protocolo 2, amplificación del gen H. Entre paréntesis se detalla la temperatura de hibridación empleada para amplificar al fragmento de 750 pb. Protocolo 3, amplificación de la región Fsp.

	Proceso	Temperatura	Tiempo	
Protocolo 1				
	Lectura pre-PCR	50°C	2 min	
	Desnaturalización	95 °C	30 seg	40 ciclos
	Hibridación-extensión	55°C	1 min	
	Lectura post-PCR	50°C	1 min	
Protocolo 2				
	Desn. Inicial	95°C	3 min	
	Desnaturalización	95 °C	30 seg	35 ciclos
	Hibridación	57°C (54°C)	45 seg	
	Extensión	72°C	1:30 min	
	Extensión final	72°C	10 min	
Protocolo 3				
	Desn. Inicial	95°C	3 min	
	Desnaturalización	95 °C	30 seg	30 ciclos
	Hibridación	58°C	45 seg	
	Extensión	72°C	1 min	
	Extensión final	72°C	5 min	

2.4 Electroforesis

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% durante una hora a 110 volts constantes. La corrida se realizó con *buffer* 1X TBE (Tris Base 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA pH 8.0, 2 mM), los geles fueron revelados por tinción con nitrato de plata (10 mg/ml).

2.5 Purificación de los fragmentos amplificados por RT-PCR

Todos los amplicones se purificaron con el kit "Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" (General Electric) según el siguiente protocolo:

- Adicionar 500 µl de *buffer* de captura a 20 - 100 µl de producto de PCR. Mezclar por inversión.
- Cargar la mezcla en una columna "GFX MicroSpin column". Centrifugar a 13.000 rpm por 30 s. Descartar el filtrado.
- Adicionar 500 µl de *buffer* de lavado a la columna. Centrifugar a 13.000 rpm por 30 s. Descartar el filtrado.
- Secar la columna centrifugando a 13.000 rpm por 30 s adicionales.
- Transferir la columna a un tubo de 1.5 ml, agregar 10 -50 µl de *buffer* de elución e incubar a TA por 1 min.
- Recuperar el DNA purificado centrifugando a 13.000 rpm por 1 min.
- Almacenar el DNA a -20 °C.

La concentración del DNA purificado fue medida con el espectrofotómetro NanoDrop 8000 (Thermo Scientific).

2.6 Clonación de los amplicones del gen H

EL DNA purificado de los fragmentos HI y HD del gen H fue clonado con el kit "GeneJet PCR Product Cloning kit" (Fermentas) utilizando células competentes de *E. Coli XL-1 Blue*. Los productos de PCR contienen una región de poli-A en el extremo 3', por tanto deben ser tratados con una enzima de *blunting* que genera extremos romos antes de ser clonados.

Reacción de *Blunting*

Mezclar

- *Buffer* reacción 2X 10 µl.
- Producto PCR 5 µl.
- Agua libre de DNAsas 2 µl.
- Enzima DNA Blunting 1 µl.
- Incubar la mezcla a 70 °C por 5 min, llevar a hielo por 10 s.

Reacción de Ligación

Adicionar

- Vector de clonación pJET1/Blunt (50ng/ μ l) 1 μ l.
- T4 DNA Ligasa (5U/ μ l) 1 μ l.
- Incubar la mezcla de ligación a TA por 20 min.

Transformación

- Precalentar placas de LB-agar ampicilina a 37° C.
- Transferir 5 μ l de la mezcla de ligación a un tubo e incubar por 2 min en hielo.
- Agregar 50 μ l de células competentes (*XL1 Blue*) e incubar por 15 min en hielo.
- Realizar shock térmico a 42° C por 45 s.
- Incubar en hielo por 1 min.
- Incubar la mezcla en agitador por 90 min.
- Plaquesear e incubar a 37° C toda la noche (ON).

La extracción del DNA plasmídico de las colonias se realizó mediante la técnica de minipreparaciones (Sambrook et al., 1989), descrita a continuación:

- Extraer una colonia de la placa LB-agar y crecerla en 3 ml de LB líquido con 1 μ l de ampicilina (50 μ g/ml).
- Incubar ON en agitador a 37° C.
- Transferir 1.5 ml del cultivo a un tubo y centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min, eliminar el sobrenadante. Agregar al tubo el volumen restante y centrifugar nuevamente, descartar todo el líquido.
- Resuspender el *pellet* en 300 μ l de solución P1 (50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA pH=8).
- Agregar 300 μ l de la solución P2 (200 mM NaOH; 1 % SDS). Mezclar por inversión.
- Añadir 300 μ l de solución P3 fría (3M NaAc pH=5.5). Mezclar por inversión e incubar por 15 min en hielo.
- Agitar por inversión y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min, recoger el sobrenadante.

- Adicionar 1 vol de fenol:cloroformo (1:1) y mezclar con *vortex*. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min.
- Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo.
- Lavar con cloroformo y centrifugar a 13.000 rpm durante 15 min. Transferir la fase superior a un nuevo tubo.
- Precipitar el ADN con 0.1 vol de acetato de sodio (NaAc) 3M y 3 vol de etanol absoluto frío. Incubar ON a -20° C.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 15 min.
- Lavar con etanol 70%, centrifugando a 13.000 rpm durante 15 min. Descartar el etanol. Secar el *pellet* a TA.
- Resuspender el *pellet* en 30 µl de H₂O miliQ y almacenar a -20 °C.

2.7 Secuenciación

Los plásmidos con inserto fueron secuenciados en ambas direcciones utilizando los cebadores del vector pJET, mientras que para el DNA purificado de la región Fsp se utilizaron los cebadores específicos F4854-R5535 (Tabla 2).

La secuenciación se realizó de forma automática en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) de la Unidad de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

2.8 Análisis bioinformático de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

2.8.1 Diseño de cebadores y sondas

Los cebadores F906-R1007 y la sonda CDV-NR utilizados en el diagnóstico, se diseñaron en base al alineamiento de secuencias del gen N de aislamientos uruguayos obtenidas en nuestro laboratorio con secuencias de aislamientos provenientes de diversas regiones geográficas (Sarute et al., 2011). Los cebadores y la sonda de IBV utilizados en el control interno fueron descritos por Callison et al. (2006).

Los cebadores capaces de amplificar al gen H y la región Fsp se diseñaron en base al alineamiento de secuencias disponibles en el Genbank (Tabla 4).

Los cebadores y sondas se analizaron con los programas “Beacon Designer 7.5” (Applied Biosystems) y “Oligo Analyzer 3.1” de Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com).

2.8.2 Edición y alineamiento de secuencias nucleotídicas

Las secuencias del gen H y de la región Fsp se ensamblaron y editaron con el programa Seqman (DNASTAR, Lasergene). Las secuencias obtenidas del gen H fueron depositadas en la base de datos del Genbank (Tabla 4). Estas secuencias se alinearon y compararon con tres secuencias de aislamientos uruguayos obtenidas previamente en nuestro laboratorio, con seis secuencias de cepas sudamericanas publicadas en el Genbank (dos argentinas y cuatro brasileras), y con 33 secuencias representativas de los ocho linajes, a través del método ClustalW del programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA 4.1) (Tabla 4).

Las secuencias del Fsp descritas en este trabajo fueron alineadas mediante ClustalW, con secuencias de aislamientos de Norteamérica, Asia y Europa (Tabla 4).

2.8.3 Análisis filogenéticos

Los cladogramas fueron inferidos a través del método Neighbor-Joining utilizando el modelo de distancia p aminoacídica del programa MEGA 4.1. El soporte estadístico de los nodos de la filogenia se obtuvo mediante análisis por bootstrap con 1000 seudoréplicas (Tamura et al., 2007).

2.8.3.1 Hemaglutinina

2.8.3.1.1 Análisis de la secuencia completa

Se analizaron 46 secuencias aminoacídicas deducidas del alineamiento de la secuencia codificante del gen H. De éstas, 33 corresponden a aislamientos representativos de los ocho linajes, mientras que las otras 13 pertenecen a los aislamientos sudamericanos, cuatro de ellos caracterizados en esta Tesis (Tabla 4).

2.8.3.1.2 Análisis de una secuencia parcial (134 aa)

Se analizaron un total de 38 secuencias (completas y parciales) del gen H descritas a la fecha en Sudamérica, incluyéndose la secuencia completa de 13 aislamientos sudamericanos, la secuencia parcial (134 aa) de dos aislamientos de Uruguay, 22 argentinos (Calderón et al., 2007) y un aislamiento de un zorro perro (*Cerdocyon thous*) de Argentina (Ferreyra et al., 2009). El análisis se realizó en base a un fragmento solapante de 402 pb (134 aa) presente en todos las cepas

sudamericanas analizadas. También se incluyeron en el estudio las 33 cepas representativas de los ocho linajes analizadas para la secuencia completa de la hemaglutinina (Tabla 4).

2.8.3.2 Péptido señal de la proteína de fusión

El análisis del Fsp incluyó 26 secuencias, de las cuales 11 correspondieron a los aislamientos caracterizados en el presente trabajo, y las otras 15 a aislamientos de diversas regiones geográficas (Tabla 4).

2.8.4 Identificación de sitios de glicosilación

La identificación de sitios potenciales de glicosilación de las secuencias aminoacídicas de la hemaglutinina de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP, se realizó con el programa MEGA 4.1. Estos sitios presentan la secuencia N-X-S/T, donde N corresponde a Arginina, X a cualquier aa excepto Prolina, S a Serina y T a Triptófano.

2.8.5 Estudio de presiones selectivas

Mediante el algoritmo “Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC)” del sitio web DataMonkey (www.datamonkey.org) se analizaron las secuencias aminoacídicas de la hemaglutinina descritas en este trabajo, junto a las 198 secuencias no redundantes disponibles en el Genbank. También se analizaron las 11 secuencias de la región Fsp de Uruguay y Argentina, junto con las 47 secuencias no redundantes de esta región publicadas en la base de datos.

El algoritmo SLAC es un método de conteo basado en verosimilitud para identificar presiones selectivas en cada codón del alineamiento. El método infiere el número de cambios sinónimos (S) y no sinónimos (NS) por codón, y establece si los NS por sitio no sinónimo (dN) son significativamente diferentes de los S por sitio sinónimo (dS); el nivel de significancia empleado en los análisis (α) fue del 0,25.

Tabla 4. Secuencias nucleotídicas utilizadas en los análisis bioinformáticos y filogenéticos. EU1: Europa-1, EU2: Europa-2, EU3: Europa-3, NA1: Norteamérica-1, NA2: Norteamérica-2, OG: grupo externo, SA1: Sudamérica-1; SA2: Sudamérica-2, Vac: cepa vacunal, ZA: África. Los grupos SA1 y SA2 fueron descritos en esta Tesis en base al análisis de la hemaglutinina y el Fsp de aislamientos del Río de la Plata.

Aislamiento	Nº acceso Genbank	País	Secuencia	Linaje/Grupo
Arg1	AM422846	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg2	AM422847	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg3	AM422848	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg4	AM422849	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg5	AM422850	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg6	AM422851	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg7	AM422852	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg8	AM422853	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg9	AM422854	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg10	AM422855	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg11	AM422856	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg12	AM422857	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg13	AM422858	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg14	AM422859	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg15	AM422860	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg16	AM422861	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg17	AM422862	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg18	AM422863	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg19	AM422864	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg20	AM422865	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg21	AM422866	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg22	AM422867	Argentina	871pb gen H	SA2
Arg23	FJ392652	Argentina	gen H	SA1
Arg24	FJ392653	Argentina	gen H	SA2
Arg25	-	Argentina	gen H	SA2
Arg26	-	Argentina	gen H	SA2
ArgFox	EU624414	Argentina	871pb gen H	SA2
CDV75	-	Uruguay	1269 pb gen H	SA1
CDV102	JN215473	Uruguay	gen H	SA1
CDV109	JN215474	Uruguay	gen H	SA1
CDV111	JN215475	Uruguay	gen H	SA1
CDV116	-	Uruguay	1269 pb gen H	SA1
CDV128	JN215476	Uruguay	gen H	SA1
CDV141	JN215477	Uruguay	gen H	SA1
BR1	EU098102	Brasil	gen H	SA1
BR2	EU098103	Brasil	gen H	SA1
BR3	EU098104	Brasil	gen H	SA1
BR4	EU098105	Brasil	gen H	SA1

5804	AY386315	Alemania	genoma completo	EU1
	DQ494319	Italia	genoma completo	EU1
	AF478543	Dinamarca	gen H	EU1
	AY093764	Turquía	gen H	EU1
	DQ494319	Italia	gen H	EU1
	DQ228166	Italia	gen H	EU2
	DQ889187	Hungría	gen H	EU2
	DQ889189	Hungría	gen H	EU2
	AF172411	China	gen H	EU3
	DQ226088	Italia	gen H	EU3
	DQ889186	Hungría	gen H	EU3
	AF164967	Estados Unidos	gen H	NA1
	Z47765	Estados Unidos	gen H	NA1
	Z54166	Estados Unidos	gen H	NA1
	AF112189	Estados Unidos	gen H	NA1
	AY526496	Estados Unidos	gen H	NA1
	AY542312	Estados Unidos	genoma completo	NA2
	AY445077	Estados Unidos	genoma completo	NA2
Onderstepoort (Vac)	AF378705	Estados Unidos	genoma completo	NA2
	AY548111	Estados Unidos	gen H	NA2
	DQ191765	Taiwan	gen H	Asia 1
	DQ887547	Taiwan	gen H	Asia 1
	D85754	Japón	gen H	Asia 1
	AB212964	Japón	gen H	Asia 1
	AB212729	Japón	gen H	Asia 2
	AB252717	Japón	gen H	Asia 2
	FJ461693	Sudáfrica	gen H	África
	FJ461694	Sudáfrica	gen H	África
	FJ461696	Sudáfrica	gen H	África
	FJ461713	Sudáfrica	gen H	África
	FJ461721	Sudáfrica	gen H	África
virus Distemper de fócidos (PDV)	AF479277	Dinamarca	genoma completo	OG
Arg23	-	Argentina	Fsp	SA1
Arg24	-	Argentina	Fsp	SA2
Arg25	-	Argentina	Fsp	SA2
Arg26	-	Argentina	Fsp	SA2
CDV75	-	Uruguay	Fsp	SA1
CDV102	-	Uruguay	Fsp	SA1
CDV111	-	Uruguay	Fsp	SA1
CDV116	-	Uruguay	Fsp	SA1
CDV127	-	Uruguay	Fsp	SA1

CDV128	-	Uruguay	Fsp	SA1
CDV141	-	Uruguay	Fsp	SA1
CN-1	EF596903	China	gen F	Asia
CN-2	EF445055	China	gen F	Asia
Tw-1	FJ694842	Taiwan	gen F	Asia
Tw-2	FJ694848	Taiwan	gen F	Asia
Tw-3	EU192008	Taiwan	gen F	Asia
Tw-4	EU192199	Taiwan	gen F	Asia
Jp	AB512286	Japón	gen F	Asia
US-1	AY443350	Estados Unidos	gen F	NA
US-2	AY395984	Estados Unidos	gen F	NA
CDV3	EU263644	China	gen F	Vac
Snyder Hill	GU138403	Canadá	genoma completo	Vac
virus del Sarampión (MV)	U03760	Estados Unidos	genoma completo	OG

3. RESULTADOS

3.1 Detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real

La detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real se estandarizó con cDNA de muestras positivas diagnosticadas por RT-PCR en tiempo final, y cDNA de la cepa Onderstepoort (OP) de una vacuna comercial disponible en nuestro país (Puppy DP, Novibac, Intervet). La cepa vacunal OP fue posteriormente utilizada como control positivo de los ensayos diagnósticos. Posteriormente, se instrumentó el uso de un control interno (CI) (lío-filizado vacunal de IBV) en las reacciones de RT-PCR en tiempo real.

Se analizaron 26 muestras de canes provenientes de Uruguay con sintomatología clínica asociada a Distemper, detectando al genoma viral en 19 de las muestras analizadas (73%). En estas muestras y en la correspondiente a la cepa OP se registró incremento de fluorescencia para las sondas de CDV y el CI. En las siete muestras negativas (27%) sólo se detectó incremento de fluorescencia para la sonda del CI. El ciclo umbral (Ct) se ubicó entre los ciclos 32 y 35 para el cDNA de CDV, mientras que el Ct para el CI se encontró en el ciclo 36 (Figura 12).

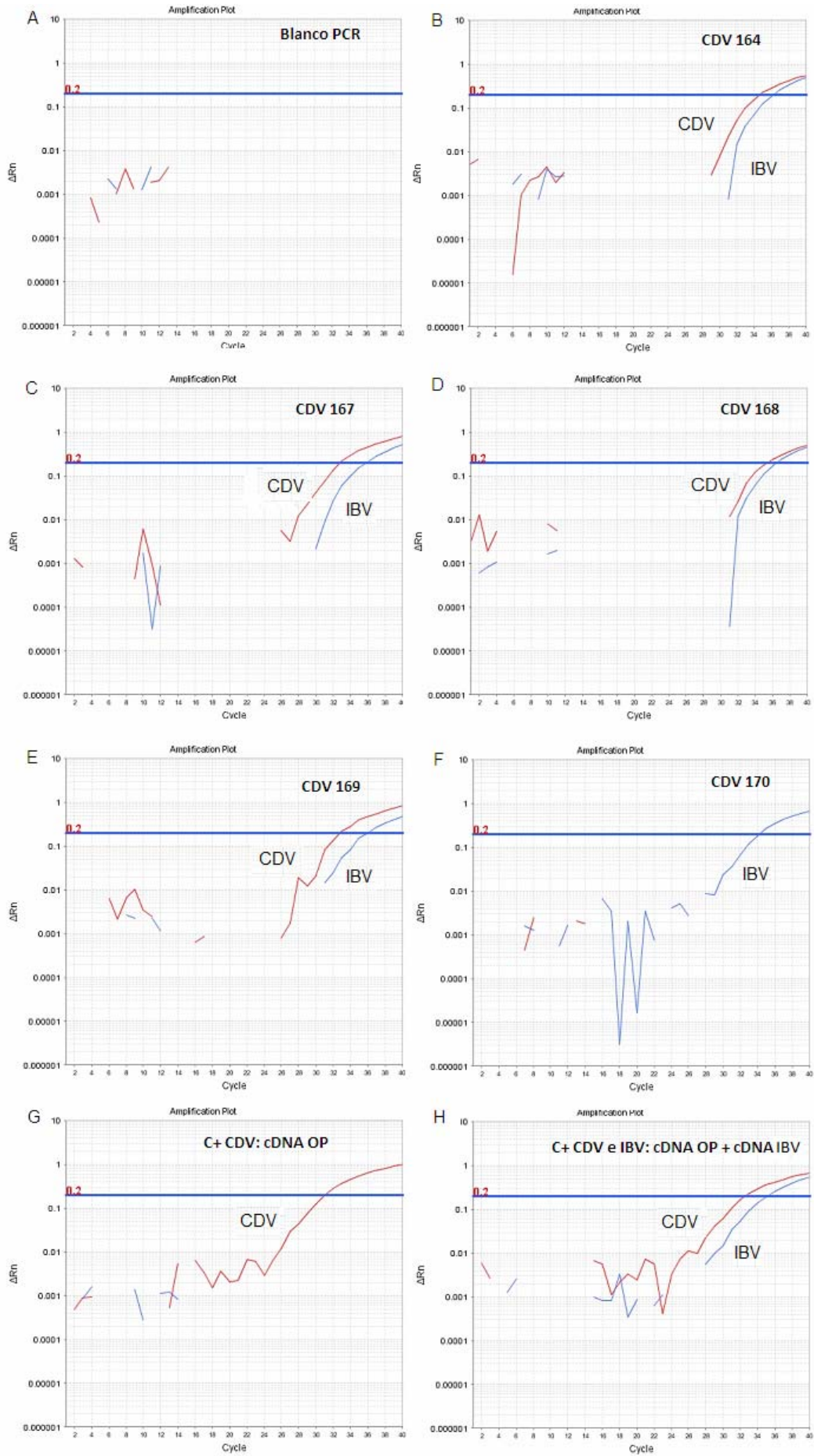


Figura 12. Gráficos de amplificación del ensayo de RT-PCR en tiempo real de cinco muestras de CDV utilizando cDNA de IBV como control interno. La curva roja corresponde a la sonda de CDV y la azul a la sonda de IBV. A. Blanco PCR: no se observa la curva de amplificación para ninguna de las sondas. B. CDV 164: muestra positiva, se aprecia la curva de amplificación para ambas sondas. C. CDV 167: muestra positiva, se aprecia la curva de amplificación para ambas sondas. D. CDV 168: muestra positiva, se aprecia la curva de amplificación para ambas sondas. E. CDV 169: muestra positiva, se aprecia la curva de amplificación para ambas sondas. F. CDV 170: muestra negativa, se aprecia la curva de amplificación solamente para la sonda de IBV utilizada como CI. G. Control positivo CDV: cDNA OP, se aprecia la curva de amplificación para la sonda de CDV. H. Control positivo CDV y CI: cDNA OP + cDNA IBV, se aprecia la curva de amplificación para ambas sondas.

De las 19 muestras diagnosticadas como positivas, 14 (74%) correspondieron a animales vacunados, cuatro (21%) a animales que no fueron vacunados y una muestra (5%) correspondía a un animal sin información respecto al estado de vacunación (Figura 13). En los siete casos negativos, cuatro (57%) correspondieron a animales vacunados y las tres restantes (43%) a animales sin plan de vacunación.

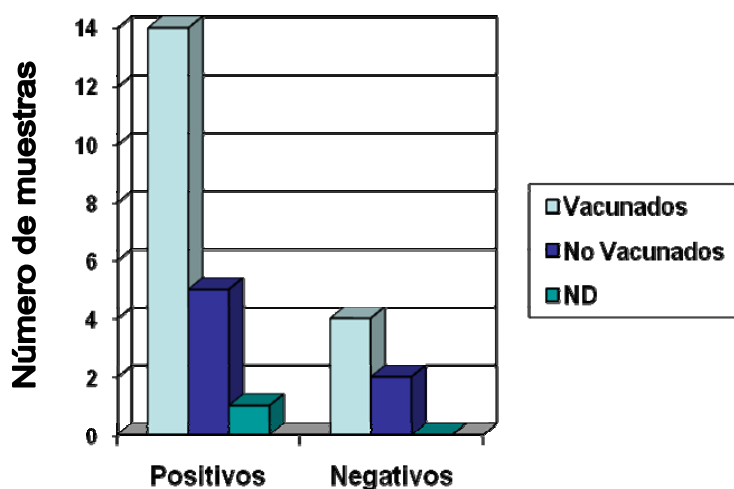


Figura 13. Número de animales diagnosticados por RT-PCR en tiempo real, discriminados por positivos y negativos para el ensayo. ND: No determinado.

Se analizó la distribución de los casos positivos según clases etarias, al grupo de animales entre tres y seis meses correspondió el porcentaje más elevado de casos (45%). Los animales entre siete y 12 meses, y entre 13 y 36 meses representaron el 20% de los casos, mientras que los menores a tres meses fueron el 10% de los casos.

También se analizó una muestra de un animal sin información sobre la edad (ND), el cual representó el 5% de los casos (Figura 14).

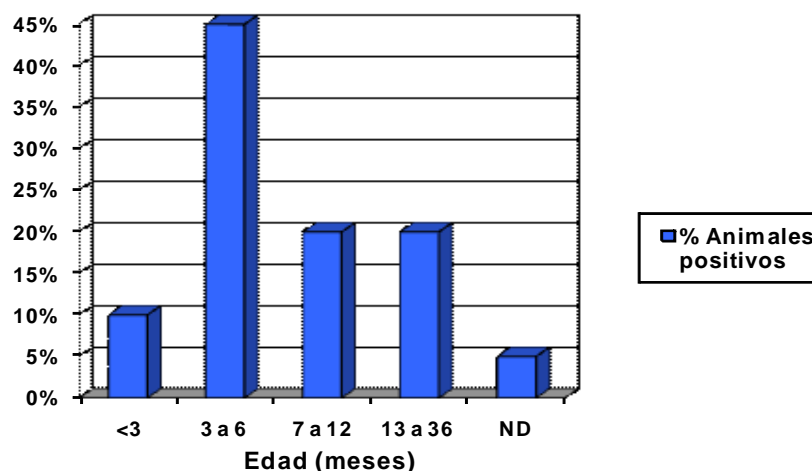


Figura 14. Discriminación de casos positivos por franjas etarias. ND: no determinado.

3.2 Caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata

3.2.1 Hemaglutinina

3.2.1.1 Amplificación por RT-PCR tiempo final

En todas las muestras uruguayas diagnosticadas como positivas por RT-PCR en tiempo real, se realizó la reacción de RT-PCR para amplificar al gen H completo. Se obtuvieron amplicones de los fragmentos HI y HD (Figura 11, 15A) en dos aislamientos (CDV128 y CDV141). En otros dos aislamientos uruguayos (CDV75 y CDV116) se obtuvo el fragmento HI, y una región de 750 pb con los cebadores FI7742-R8492 (Figura 11, 15B). Se analizaron también ocho muestras argentinas diagnosticadas como positivas por RT-PCR tiempo final, obteniéndose amplicones de los fragmentos HI y HD en solo dos muestras (Arg25 y Arg26).

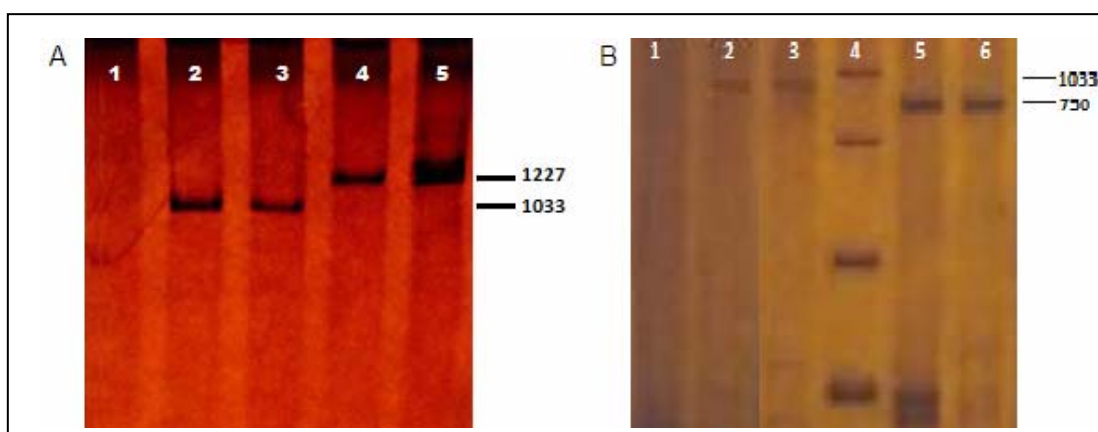


Figura 15. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de productos de PCR del gen H de muestras de campo y de la cepa OP (control +).

- A. Carril 1: blanco PCR, Carril 2: CDV128 fragmento HI, Carril 3: cepa OP (C+) fragmento HI, Carril 4: CDV128 fragmento HD, Carril 5: cepa OP (C+) fragmento HD.
- B. Carril 1: blanco PCR, Carril 2: CDV75 fragmento HI, Carril 3: cepa OP (C+) fragmento HI, Carril 4: marcador de peso molecular (1200pb, 850pb, 450pb, 200pb), Carril 5: CDV75 fragmento FI7742-RI8492, Carril 6: cepa OP (C+) fragmento FI7742-RI8492.

3.2.1.2 Edición y análisis de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Mediante el ensamblaje de los fragmentos HI y HD se obtuvo la secuencia completa del gen H de dos aislamientos uruguayos (CDV128 y CDV141) y dos argentinos (Arg25 y Arg26). El gen H presentó un ORF de 1824 pb que codifica para una proteína de 607 aa (Figura 16, 17). En el caso de otros dos aislamientos uruguayos (CDV75 y CDV116), las secuencias ensambladas tuvieron una extensión de 1269 pb, los cuales codifican para 423 aa de la proteína (Figura 16, 17).

3.2.1.3 Estudios comparativos

Los estudios se realizaron con las cinco secuencias completas del gen H de aislamientos de campo uruguayos descritas a la fecha: las dos obtenidas en este trabajo y otras tres descritas previamente por nuestro grupo (CDV102, CDV109, CDV111) (Tabla 4). Las secuencias se alinearon y compararon, observándose 23 sitios nucleotídicos variables y 11 cambios aminoacídicos (Figura 16, 17). Estos aislamientos presentaron una divergencia aminoacídica entre 0 – 1.5% (Tabla 5A). Se observaron valores de divergencia similares en el análisis de las secuencias parciales de 1269 pb (resultados no mostrados).

En cuanto a los aislamientos argentinos, los análisis se realizaron con las dos secuencias obtenidas en esta Tesis (Arg25 y Arg26), y otras dos publicadas en el Genbank (Arg23 y Arg24) (Tabla 4). Estas secuencias se alinearon y compararon, mostrando una mayor divergencia que la observada entre los aislamientos de Uruguay, con 94 sitios nucleotídicos variables y 31 cambios a nivel aminoacídico (Figura 16, 17). La divergencia aminoacídica de estos aislamientos se ubicó entre 0.3 – 5.1% (Tabla 5A). Con el objetivo de estudiar todas las secuencias del gen H descritas hasta la fecha en Sudamérica, se analizaron además las secuencias de cuatro aislamientos de campo de

Brasil publicadas en el Genbank (Tabla 4). Las secuencias brasileras presentaron valores de divergencia aminoacídica entre 1.0 – 3.5% (Tabla 4, 5A).

La comparación de las secuencias sudamericanas reveló que todos los aislamientos uruguayos, brasileros y un argentino (Arg23) presentaron una elevada identidad, con valores de divergencia entre 0 - 3,5% (Tabla 5A). El resto de los aislamientos sudamericanos, todos argentinos (Arg24, Arg25 y Arg26), presentaron valores de divergencia con respecto a los primeros de hasta 5.3% (Tabla 5A). Sin embargo, entre estos tres aislamientos presentaban una elevada identidad, con valores entre 0,3 – 1,8% (Tabla 5A).

AF378705_cepa_OP1-1812 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 GAATCAAGTGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATGTCAGATTATAGATAGAGATGTCTCAITGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1021/1-1821 GAATCAAGTGGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATCCAGATTATAGATAAAGATGTCTTAC TGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1091/1-1821 GAATCAAGTGGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATCCAGATTATAGATAAAGATGTCTTAC TGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1111/1-1821 GAATCAAGTGGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATCCAGATTATAGATAAAGATGTCTTAC TGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1281/1-1821 GAATCAAGTGGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATCCAGATTATAGATAAAGATGTCTTAC TGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1411/1-1821 GAATCAAGTGGGAAATGGTTATTTACCTATTCCAACATCCAGATTATAGATAAAGATGTCTTAC TGAGTCCAAATAGTGGTGTGGCTTACACAGAGTTTATAGATATGTCAATAGCAACGTT
 CDV1561/1-1269

AF378705_cepa_OP1-1812 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690
 ATGACCATATC AEG AAG T S ATCATGCG G AT T G T T T T A T T A T G T T A T G A C C C A A T C C G G A C G A T T T C T T A T A C G A C C C A A T T T A G T G G T G T T G C C T A C A C A G A A T T T T A G A T A T G T C A T A G C A A C A T
 CDV1021/1-1821 ATGATATATATCCCGGGGGCGGATCATGCAATTTGTTATATATGTTATATGTTATATGATCCCAATCCGGAGCATTTCTTATACGTACCCAAAGGGTAGACCCTGATTTCCATAAGGATTA
 CDV1091/1-1821 ATGATATATATCCCGGGGGCGGATCATGCAATTTGTTATATATGTTATATGTTATATGATCCCAATCCGGAGCATTTCTTATACGTACCCAAAGGGTAGACCCTGATTTCCATAAGGATTA
 CDV1111/1-1821 ATGATATATATCCCGGGGGCGGATCATGCAATTTGTTATATGTTATATGTTATATGATCCCAATCCGGAGCATTTCTTATACGTACCCAAAGGGTAGACCCTGATTTCCATAAGGATTA
 CDV1281/1-1821 ATGATATATATCCCGGGGGCGGATCATGCAATTTGTTATATGTTATATGTTATATGATCCCAATCCGGAGCATTTCTTATACGTACCCAAAGGGTAGACCCTGATTTCCATAAGGATTA
 CDV1411/1-1821 ATGATATATATCCCGGGGGCGGATCATGCAATTTGTTATATGTTATATGTTATATGATCCCAATCCGGAGCATTTCTTATACGTACCCAAAGGGTAGACCCTGATTTCCATAAGGATTA
 CDV1561/1-1269

AF378705_cepa_OP1-1812 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810
 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACAAATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACAGATTTCGAGGGCTGACATGCGCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1021/1-1821 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACGATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACCAATTTGAGGGCAGACATCACCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1091/1-1821 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACGATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACCAATTTGAGGGCAGACATCACCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1111/1-1821 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACGATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACCAATTTGAGGGCAGACATCACCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1281/1-1821 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACGATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACCAATTTGAGGGCAGACATCACCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1411/1-1821 ATGTTTTTGTGTGGGGATGACGATTTGTTGGTGTGTCACCCAATTTTACCAATTTGAGGGCAGACATCACCAACTCTACACCGAGTGTGAGGAATTTAGTCCCGTATAAGATTCTCAATGTAACCGTTC
 CDV1561/1-1269

AF378705_cepa_OP1-1812 AAACCT
 CDV1021/1-1821 AAACCT
 CDV1091/1-1821 AAACCT
 CDV1111/1-1821 AAACCT
 CDV1281/1-1821 AAACCT
 CDV1411/1-1821 AAACCT
 CDV1561/1-1269 AAACCT
 AF378705_cepa_OP1-1812 AAACCT
 CDV1021/1-1821 AAACCT
 CDV1091/1-1821 AAACCT
 CDV1111/1-1821 AAACCT
 CDV1281/1-1821 AAACCT
 CDV1411/1-1821 AAACCT
 CDV1561/1-1269 AAACCT
 AF378705_cepa_OP1-1812 AAACCT
 CDV1021/1-1821 AAACCT
 CDV1091/1-1821 AAACCT
 CDV1111/1-1821 AAACCT
 CDV1281/1-1821 AAACCT
 CDV1411/1-1821 AAACCT
 CDV1561/1-1269 AAACCT

Figura 16. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la hemaglutinina de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP. Se incluyeron las secuencias correspondientes a siete aislamientos uruguayos, tres obtenidas previamente en nuestro laboratorio (CDV102, CDV109, CDV111), y otras cuatro en este trabajo de Tesis (CDV128, CDV141, CDV75 y CDV116). También se analizaron cuatro secuencias de aislamientos argentinos, dos de ellas descritas previamente por Calderón (2008) (Arg23 y Arg24) y otras dos obtenidas en este trabajo (Arg25 y Arg26).

Resultados

AE378705_cepa_OP1-604
CDV10201-607
CDV10921-607
CDV11111-607
CDV12821-607
CDV14111-607
CDV15111-607
CDV16111-423
Ang341-607
Ang351-607
Ang361-607

AE378705_cepa_OP1-604
CDV10201-607
CDV10921-607
CDV11111-607
CDV12821-607
CDV14111-607
CDV15111-607
CDV16111-423
Ang341-607
Ang351-607
Ang361-607

AE378705_cepa_OP1-604
CDV10201-607
CDV10921-607
CDV11111-607
CDV12821-607
CDV14111-607
CDV15111-607
CDV16111-423
Ang341-607
Ang351-607
Ang361-607

AE378705_cepa_OP1-604
CDV10201-607
CDV10921-607
CDV11111-607
CDV12821-607
CDV14111-607
CDV15111-607
CDV16111-423
Ang341-607
Ang351-607
Ang361-607

AE378705_cepa_OP1-604
CDV10201-607
CDV10921-607
CDV11111-607
CDV12821-607
CDV14111-607
CDV15111-607
CDV16111-423
Ang341-607
Ang351-607
Ang361-607

Figura 17. Alineamiento de las secuencias amioacídicas de la hemaglutinina de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP. Se incluyeron las secuencias correspondientes a siete aislamientos uruguayos, tres obtenidas previamente en nuestro laboratorio (CDV102, CDV109, CDV111), y otras cuatro en este trabajo de Tesis (CDV128, CDV141, CDV75 y CDV116). También se analizaron cuatro secuencias de aislamientos argentinos, dos de ellas descritas previamente por Calderón (2008) (Arg23 y Arg24) y otras dos obtenidas en este trabajo (Arg25 y Arg26). Se destacan en recuadro los sitios potenciales de N-glicosilación, y los residuos 530 y 549 ubicados en la zona de unión al receptor SLAM.

A

	CDV102	CDV109	CDV111	CDV128	CDV141	BR1	BR2	BR3	BR4	Arg23	Arg24	Arg25
CDV102												
CDV109	0.008											
CDV111	0	0.008										
CDV128	0.007	0.015	0.007									
CDV141	0	0.008	0	0.007								
BR1	0.025	0.03	0.025	0.031	0.025							
BR2	0.026	0.03	0.026	0.033	0.026	0.035						
BR3	0.022	0.026	0.022	0.028	0.022	0.03	0.012					
BR4	0.022	0.025	0.022	0.028	0.022	0.023	0.015	0.01				
Arg23	0.026	0.031	0.026	0.033	0.026	0.031	0.033	0.028	0.028			
Arg24	0.045	0.05	0.045	0.051	0.045	0.051	0.046	0.041	0.04	0.051		
Arg25	0.046	0.05	0.045	0.051	0.045	0.051	0.045	0.041	0.04	0.048	0.017	
Arg26	0.046	0.051	0.046	0.053	0.046	0.053	0.046	0.043	0.041	0.05	0.018	0.003

B

	SA1	SA2	EU1	EU2	EU3	Asia1	Asia2	NA1	NA2	ZA
SA1										
SA2	0.047									
EU1	0.025	0.044								
EU2	0.046	0.054	0.044							
EU3	0.062	0.071	0.062	0.061						
Asia1	0.055	0.065	0.049	0.054	0.068					
Asia2	0.07	0.076	0.065	0.068	0.073	0.069				
NA1	0.052	0.062	0.048	0.05	0.059	0.06	0.073			
NA2	0.078	0.088	0.082	0.081	0.085	0.087	0.098	0.087		
ZA	0.054	0.059	0.051	0.05	0.057	0.059	0.065	0.058	0.083	
Vac	0.083	0.095	0.086	0.084	0.088	0.095	0.099	0.092	0.045	0.09

Tabla 5. Análisis de distancia aminoacídica de la hemaglutinina.

A. Análisis de los aislamientos de Uruguay, Brasil y Argentina. Se señala en recuadro los valores de divergencia superiores al 4%.

B. Porcentaje promedio de diferencias aminoacídicas entre los ocho linajes de CDV y los grupos sudamericanos. Se recuadran los valores de divergencia de los clados SA1 y SA2 respecto a los ocho linajes de CDV. Los valores son superiores al 4% excepto para el linaje EU1, donde es del 2.5%. SA1: Sudamérica-1, EU1: Europa-1, SA2: Sudamérica-2, EU2: Europa-2, EU3: Europa-3, NA1: Norteamérica-1, ZA: África, NA2: Norteamérica-2, Vac: cepa Onderstepoort.

3.2.1.4 Análisis filogenéticos

3.2.1.4.1 Análisis de la secuencia completa de la hemaglutinina

Este análisis se realizó a partir del alineamiento de 46 secuencias aminoacídicas de la hemaglutinina, donde se incluyeron las secuencias de los cuatro aislamientos caracterizados en esta Tesis, las secuencias de los nueve aislamientos sudamericanos caracterizadas hasta la fecha (tres uruguayos, dos argentinos y cuatro brasileros), y secuencias de 33 aislamientos representativos de los ocho linajes de CDV disponibles en el Genbank (Tabla 4).

Los 13 aislamientos de Sudamérica se separan claramente en dos clados. Un clado está constituido por diez aislamientos (cinco uruguayos, cuatro brasileros y el aislamiento argentino Arg23), con un valor de *bootstrap* de 97%. Todos los aislamientos de este clado, al cual denominamos Sudamérica 1 (SA1), se asocian con el clado que define al linaje Europa 1 (EU1) con un valor de *bootstrap* de 100% (Figura 18). Los aislamientos pertenecientes a SA1 presentan valores de divergencia aminoacídica de 2,5% respecto al linaje EU1, y superiores al 4,6% respecto al resto de los linajes caracterizados (Tabla 5B).

El otro clado sudamericano está constituido únicamente por tres aislamientos de Argentina (Arg24, Arg25 y Arg26), y presenta un valor de *bootstrap* del 100%. Este clado, al que denominamos Sudamérica 2 (SA2), se halla separado del resto, aunque se relaciona con el linaje Europa 2 (EU2) con un bajo valor de *bootstrap* (50%) (Figura 18). Los aislamientos de SA2 muestran valores de divergencia de hasta 1,8% entre sí, y superiores al 4,4% respecto a SA1 y al resto de los linajes caracterizados, incluyendo a EU2 (Tabla 5B).

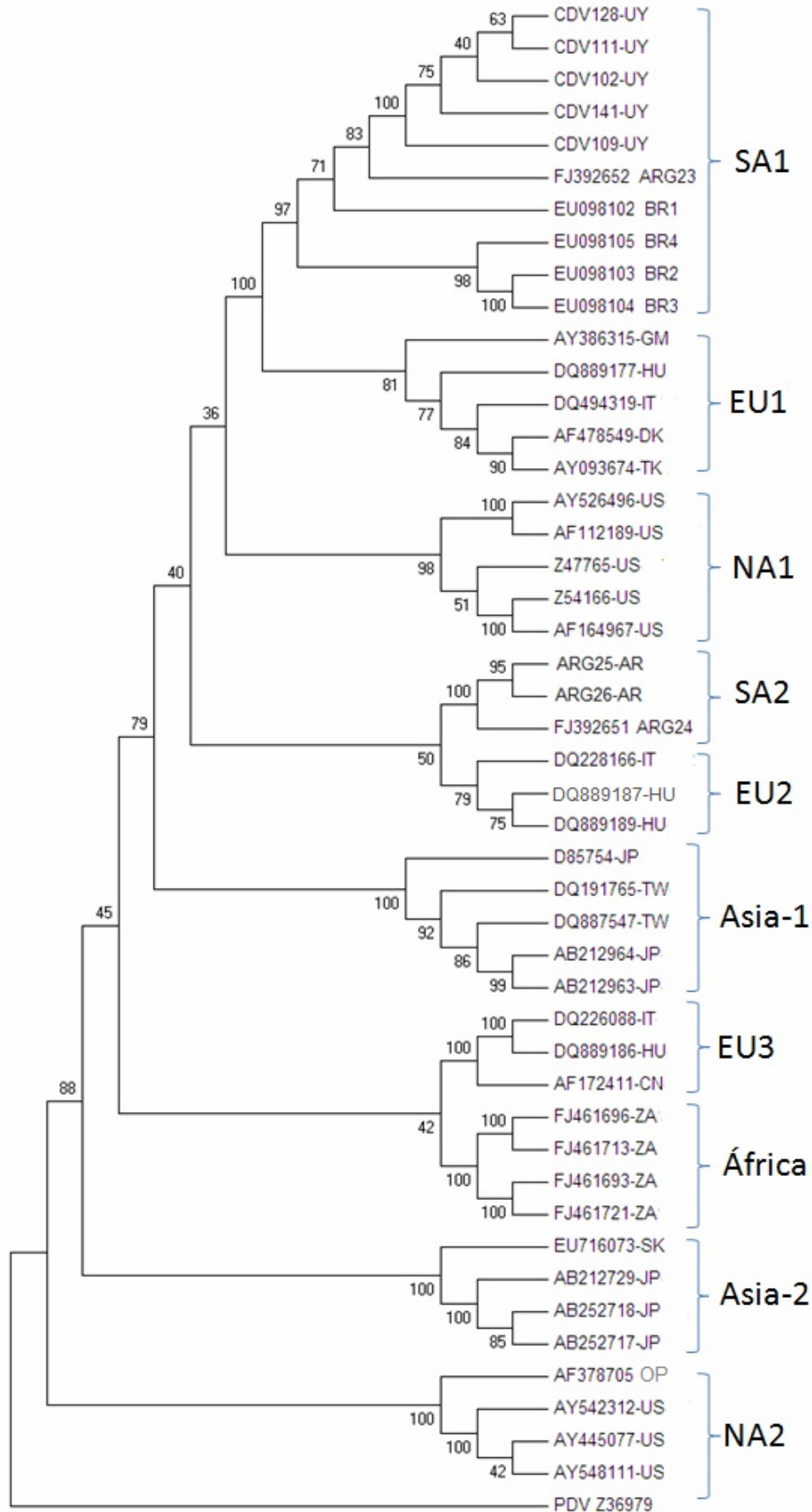


Figura 18. Cladograma en base a la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina de los aislamientos sudamericanos y aislamientos de los ocho linajes de CDV. Como grupo externo se empleo la secuencia de un aislamiento del virus Distemper de fócidos (PDV) (Nº acceso Z36979). UY: Uruguay, BR: Brasil, AR: Argentina, US: Estados Unidos, GM: Alemania, IT: Italia, HU: Hungría, DK: Dinamarca, TK: Turkia, JP: Japón, TW: Taiwan, SK: Corea del Sur, CN: China, OP: cepa Onderstepoort. SA1: Sudamérica-1, EU1: Europa-1, SA2: Sudamérica-2, EU2: Europa-2, EU3: Europa-3, NA1: Norteamérica-1, ZA: África, NA2: Norteamérica-2.

3.2.1.4.2 Análisis de secuencias parciales de la hemaglutinina (134 aminoácidos)

Este análisis comprendió las 38 secuencias sudamericanas descritas a la fecha y las 33 secuencias representativas de los ocho linajes utilizadas en el análisis de la secuencia completa. Dicho análisis mostró que los aislamientos sudamericanos se dividen en dos clados como se observó en el análisis de la hemaglutinina completa. Un clado comprende los mismos aislamientos de SA1 (excepto por EU098102 perteneciente a Brasil) y también los uruguayos (CDV75 y CDV116), y presenta un valor de *bootstrap* de 84%. Este clado se agrupa con las variantes del linaje EU1 (que incluye a la cepa EU098102) con un *bootstrap* de 60% (Figura 19).

El otro clado de Sudamérica agrupa los tres aislamientos pertenecientes al clado SA2 definido con la secuencia completa de H, los 22 de canes domésticos y el proveniente de un zorro perro de Argentina, con un valor de *bootstrap* de 99% (Figura 19).

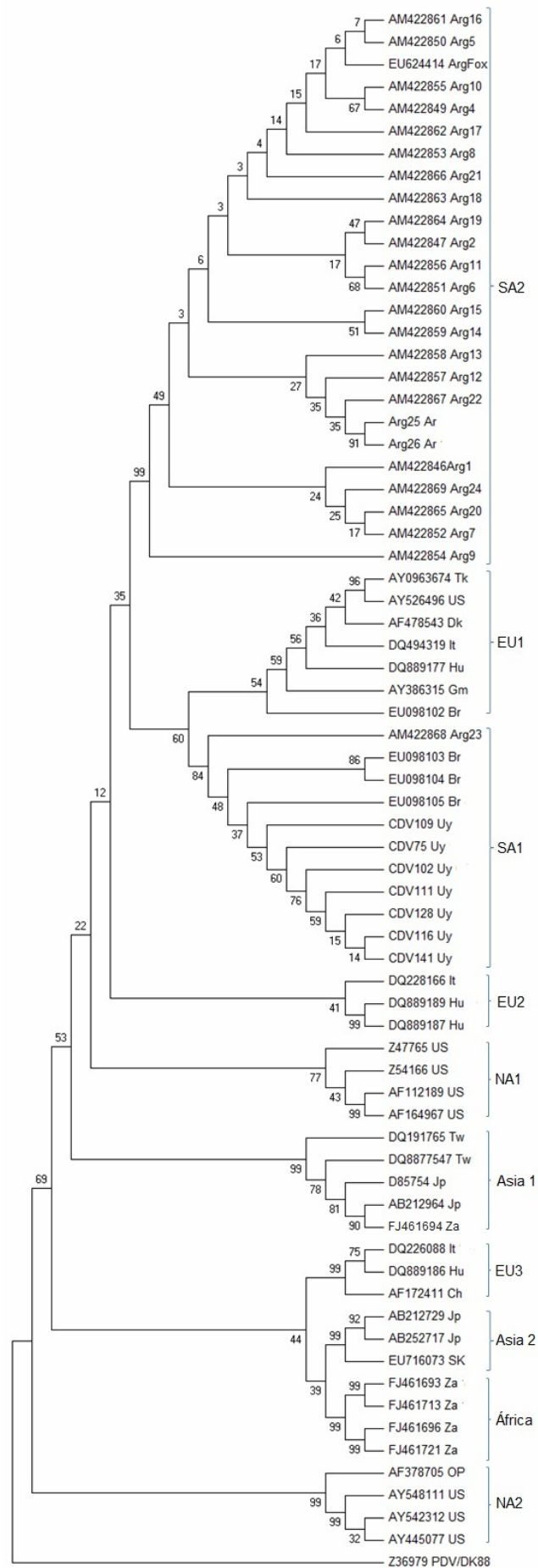


Figura 19. Cladograma en base a 134 aa de la hemaglutinina de los aislamientos sudamericanos y de aislamientos representativos de los ocho linajes de CDV. Como grupo externo se empleo la secuencia de un aislamiento del virus Distemper de fócidos (PDV) (Nº acceso Z36979). UY: Uruguay, BR: Brasil, AR: Argentina, US: Estados Unidos, GM: Alemania, IT: Italia, HU: Hungría, DK: Dinamarca, TK: Turquía, JP: Japón, TW: Taiwan, SK: Corea del Sur, CH: China, IN: India, OP: cepa Onderstepoort. SA1: Sudamérica-1, EU1: Europa-1, SA2: Sudamérica-2, EU2: Europa-2, EU3: Europa-3, NA1: Norteamérica-1, ZA: África, NA2: Norteamérica-2.

3.2.1.5 Comparación con la cepa vacunal OP

En el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la hemaglutinina de todos los aislamientos de Uruguay y Argentina junto a los 604 aa de la cepa OP (Nº acceso AF378705), se observó un rango de 134 – 149 diferencias nucleotídicas, y cambios aminoacídicos en el rango de 47 - 56 (Figura 16, 17).

La comparación de dichas secuencias reveló elevados valores de variabilidad aminoacídica (~8,3% respecto a los aislamientos del clado SA1 y ~9,5% con los aislamientos del clado SA2) (Tabla 5B).

El análisis filogenético con la secuencia completa y parcial de la hemaglutinina, mostró que todos los aislamientos de Sudamérica aparecen claramente separados de la cepa vacunal OP (Figura 18, 19).

3.2.1.6 Identificación de sitios potenciales de glicosilación

Las nueve secuencias completas de los aislamientos de Uruguay y Argentina presentaron ocho sitios de glicosilación en toda su extensión, excepto por el aislamiento de Argentina (Arg23) que presentó siete sitios. En la cepa OP (Nº acceso: AF378705) se observaron seis sitios, lo cual concuerda con análisis previos donde se estableció que la mayoría de los aislamientos de campo de CDV poseen sitios de glicosilación adicionales en la hemaglutinina respecto a la cepa vacunal OP (Figura 17 y 20) (Mochizuki et al., 1999; Sawatsky & von Messling, 2010).

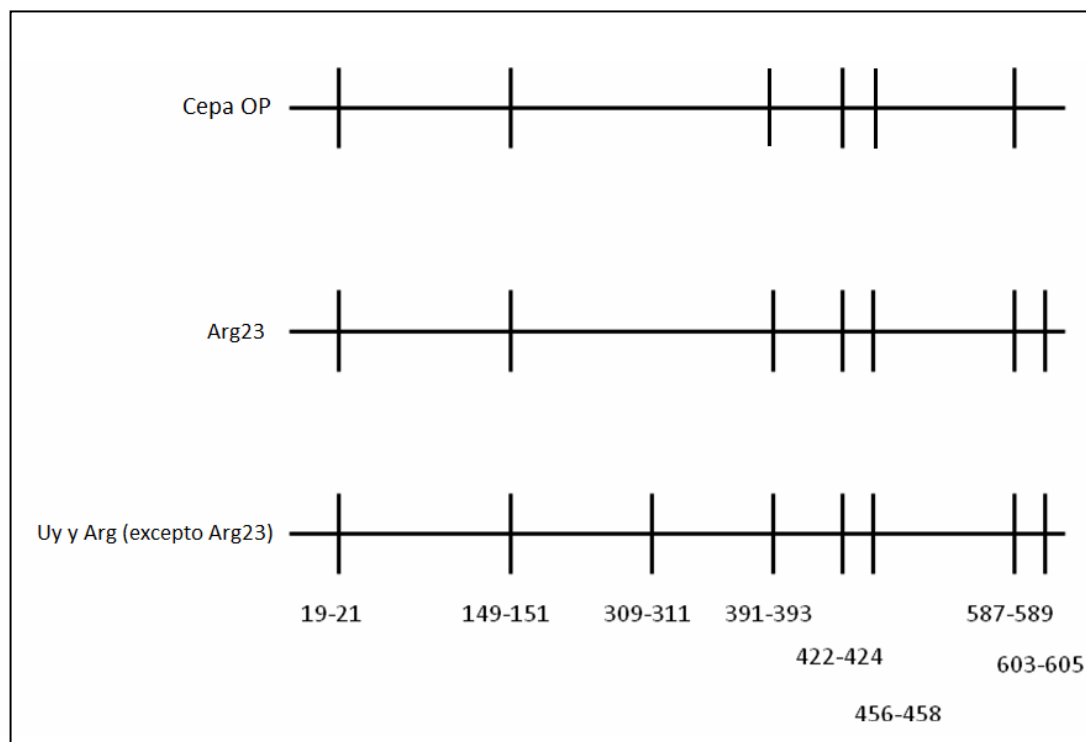


Figura 20. Representación esquemática de los sitios potenciales de glicosilación de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP. OP: Onderstepoort, Uy: Uruguay, Arg: Argentina.

3.2.1.7 Estudio de presiones selectivas

El análisis de presiones selectivas mediante el algoritmo SLAC se realizó con las secuencias de la hemaglutinina descritas en esta Tesis y las 198 secuencias no redundantes publicadas en la base de datos. El valor dN/dS global de la proteína fue menor que 1 (0.28), indicando que se encuentra bajo selección negativa. El análisis de las presiones selectivas en los codones individuales reveló que 246 codones están seleccionados negativamente, 347 evolucionan de forma neutral y 11 estarían sujetos a selección positiva (Tabla 6).

Entre los codones seleccionados positivamente, se encuentran dos (530 y 549) que están localizados en la región codificante de la zona de unión al receptor celular SLAM. Se observó que el aa codificado por el codón 530 difiere entre los grupos sudamericanos SA1 y SA2, en los aislamientos de SA1 se identificó glicina (530G), mientras que en los pertenecientes a SA2 se observó ácido aspártico (530D). En el caso del codón 549, todos los aislamientos sudamericanos codificaron tirosina (549Y) (Figura 17).

Codon	Cambios S		Cambios NS		dS	dN	dN-dS
	obs	obs	E [sitios S]	E [sitios NS]			
146	0	3	0.35	0.81	0	3.72	3.72
160	0	4	0.32	0.78	0	5.12	5.12
302	0	3	0.34	0.82	0	3.66	3.66
309	0	4	0.30	0.86	0	4.64	4.64
370	0	4	0.29	0.80	0	4.99	4.99
376	1	7	0.30	0.86	3.28	8.18	4.90
401	0	3	0.38	0.73	0	4.09	4.09
412	0	4	0.38	0.78	0	5.14	5.14
417	0	3	0.35	0.81	0	3.71	3.71
530	2.50	9.50	0.35	0.81	7.19	11.75	4.55
549	0	5	0.30	0.79	0	6.32	6.32

Tabla 6. Representación de los residuos sujetos a selección positiva en la hemaglutinina. Se destaca en recuadro los residuos 530 y 549. Cambios S obs: número de cambios sinónimos observados en el sitio, Cambios NS obs: número de cambios no sinónimos observados en el sitio, E [sitios S]: número de cambios sinónimos esperados en el sitio, E [sitios NS]: número de cambios no sinónimos esperados en el sitio, dS: cambios S obs/E [sitios S], dN: cambios NS obs/E [sitios NS], dN: cambios NS obs/E [sitios NS] - cambios S obs /E [sitios S].

3.2.2 Péptido señal de la proteína de fusión

3.2.2.1 Amplificación por RT-PCR tiempo final

Se realizó la RT-PCR para amplificar los 681 pb que incluyen a la región Fsp (405 pb) en todas las muestras uruguayas donde se había obtenido la secuencia parcial o completa del gen H, a excepción de un aislamiento (CDV109). Se obtuvieron resultados positivos para seis aislamientos caracterizados previamente por el gen H, y además se obtuvo el amplicón en un nuevo aislamiento (CDV127) (Tabla 4) (Figura 21).

Con los aislamientos argentinos se siguió el mismo criterio, y se amplificó la región Fsp de los cuatro aislamientos caracterizados mediante el análisis del gen H (Tabla 4).

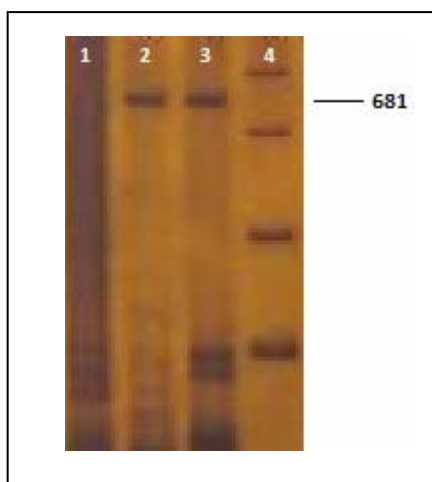


Figura 21. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de producto de PCR de la región Fsp. Carril 1: blanco PCR, Carril 2: CDV75 fragmento F4854-R5535, Carril 3: CDV128 fragmento F4854-R5535, Carril 4: marcador de peso molecular (850pb, 450pb, 200pb, 50pb).

3.2.2.2 Estudios comparativos

Las secuencias nucleotídicas de 405 pb correspondientes a los 135 aa del Fsp de los aislamientos de Uruguay y Argentina, se editaron, alinearon y compararon. Los aislamientos uruguayos presentaron siete sitios nucleotídicos variables y cinco cambios aminoacídicos (Figura 22, 23). El análisis de las secuencias de los cuatro aislamientos argentinos mostró una elevada variabilidad genética con 45 sitios nucleotídicos variables y 28 cambios a nivel aminoacídico (Figura 22, 23).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
AF378705 Ceba OP  ATGCACAAGG GAATCCCAAA AAGCTCCAAA ACCCAAAACAC ATACCCAACA AGACCCGCCCC CCACAACCCA GCACCGAACC
CDV75           .CA A..... .G.A.T.....T.....CC.....T.....AA.G.AT.A.T.A.T.
CDV102          .CA A..... .G.A.T.....T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
CDV111          .CA A..... .G.A.T.....T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
CDV116          .CA A..... .GAA.T.....T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
CDV127          .CA A..... .G.A.T.....T.T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
CDV128          .CA A..... .G.A.T.....T.T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
CDV141          .CA A..... .G.A.T.....T.T.....CC.....T.....A.G.AT.A.T.A.T.
Arg23           .CA A..... .G.A.....C.....CC.....T.....A.G.A.....T.A.T.
Arg24           .CA A.C..... .G.A.....A.....C.....G.T.T.....A.G.A.....A.....
Arg25           .CA A.C..... .G.G.....A.....C.....G.T.T.....A.G.A.....A.....
Arg26           .CA A.C..... .G.G.....A.....C.....G.T.T.....A.G.A.....A.....
    
```

```

      90      100     110     120     130     140     150     160
AF378705 Ceba OP  CGAAGAGACC AGGACTCCC GAGCAGACA CAGCATAACA TCAGCTCAGC GATCCACGCA CTATGATCCT CGAACATCGG
CDV75           .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV102          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV111          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV116          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV127          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV128          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
CDV141          .CC.....CA.....C......G.....G.....A.G.C.....G.....
Arg23           .CC.....CA.....A......G.....A.....A.G.C.....G.....
Arg24           .T.CC......A.....A.T......G.....T.....C.G.....A.....
Arg25           .CC......A.....T.....A.T......G......C.....G.....A.....
Arg26           .CC......A.....T.....A.T......G......C.....G.....A.....
    
```

```

      170     180     190     200     210     220     230     240
AF378705 Ceba OP  ACAGACCCGT CTCTACACC ATGGACAGGA TCAGTCCCG CAAGCAAACT AGCCACAGAT TGAAGAACA CCCAGTTCAC
CDV75           .T.G.A..TCA...T...A.....C.....TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV102          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV111          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV116          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV127          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV128          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
CDV141          .T.G.A..TCA...T...A.....C.A..TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
Arg23           .T.G.A..TCA...T...C.A.....C.....TT.....G.C...T.....CAG.T.....G.C...
Arg24           .G......CA...T...A.....C.....TT.....G.C...TG...C.G.T...C.GTCC...
Arg25           .G......CA...T...A.....C.....TT.....G.C...TG...C.G.T...C.GTCC...
Arg26           .G......CA...T...A.....C.....TT.....G.C...TG...C.G.T...C.GTCC...
    
```

```

      250     260     270     280     290     300     310     320
AF378705 Ceba OP  GGAACCACG AGGCTATTAT CAGCAGATA CCAGAGAGTG TCTCAAAGG AGCGAGATCC CAGATCGAAA GCGGCAACC
CDV75           .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV102          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV111          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV116          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV127          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV128          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
CDV141          .G.....G.....T...C.....TC.....AT.....G.T.A.....T.
Arg23           .G.....G.....T...C.....CC.....AT.....G.T.A.G.....T.
Arg24           .A.G.....G.....T.G.C.T.....CC.....G.T.A.....T.
Arg25           .A.G.....G.....T.G.C.T.....CC.....G.G.A.....T.
Arg26           .A.G.....G.....T.G.C.T.....CC.....G.G.A.....T.
    
```

```

      330     340     350     360     370     380     390     400
AF378705 Ceba OP  CAATGCCATC AACTCAGGCT CTCAGTCAC CTGGTTAGTC CTGTGGTGCC TCGGAATAGC CAGTCTCTTT CTGTGTCCA
CDV75           .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV102          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV111          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV116          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV127          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV128          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
CDV141          .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
Arg23           .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
Arg24           .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
Arg25           .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
Arg26           .G.....C.....G.....C.....A.....A.....T.....T.
    
```

```

      410     420     430     440     450     460     470     480
AF378705 Ceba OP  AGGCT
CDV75           .....
CDV102          .....
CDV111          .....
CDV116          .....
CDV127          .....
CDV128          .....
CDV141          .....
Arg23           .....
Arg24           .....
Arg25           .....
Arg26           .....
    
```

Figura 22. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas del Fsp de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP.



Figura 23. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas del Fsp de los aislamientos de Uruguay, Argentina y la cepa OP.

3.2.2.3 Análisis filogenético

El estudio incluyó las secuencias aminoacídicas de los 11 aislamientos de Uruguay y Argentina caracterizados en esta Tesis, y 15 secuencias de aislamientos de Norteamérica, Asia y Europa publicados en la base de datos (Tabla 4).

El análisis filogenético reveló que los aislamientos de Sudamérica se agrupan en dos clados separados al igual que lo observado en el análisis de la hemaglutinina. El primer clado está constituido por todos los aislamientos uruguayos y el argentino (Arg23) con un valor de *bootstrap* de 89%. Este clado se relaciona con cepas de Europa, correspondientes al linaje EU1 según el análisis de la hemaglutinina, con un *bootstrap* de 100% (Figura 24). La divergencia aminoacídica dentro de este clado se ubicó entre 0 – 6,7%, donde los aislamientos de Uruguay presentaron valores de divergencia entre 0 - 3%, y valores del 4,4 – 6,7% respecto al aislamiento argentino Arg23 (Tabla 7A). Este clado se relaciona con cepas de Europa, correspondientes al linaje EU1 según el análisis de la hemaglutinina, con un *bootstrap* de 100% (Figura 24). Los aislamientos

de este clado sudamericano mostraron un porcentaje promedio de diferencias aminoacídicas del 10.5% respecto a los europeos con las que se agrupan, y superiores al 22.8% en comparación a los aislamientos de Asia y Norteamérica (Tabla 7B).

El otro clado sudamericano está constituido por los aislamientos argentinos (Arg24, Arg25 y Arg26), y posee un valor de *bootstrap* del 100%, el cual aparece claramente separado del resto de los aislamientos en el cladograma. Los valores de divergencia de dichos aislamientos se ubicaron entre 0 y 2,2% (Figura 24) (Tabla 7A). La comparación de ambos clados sudamericanos mostró valores de divergencia de hasta 22.2% (Tabla 7A). Sus valores de divergencia respecto a los aislamientos de Asia y Norteamérica fueron superiores al 23.8% (Tabla 7B).

Debido a que los aislamientos sudamericanos presentan las mismas relaciones filogenéticas que las observadas con el análisis de la hemaglutinina, también denominamos SA1 y SA2 a ambos clados.

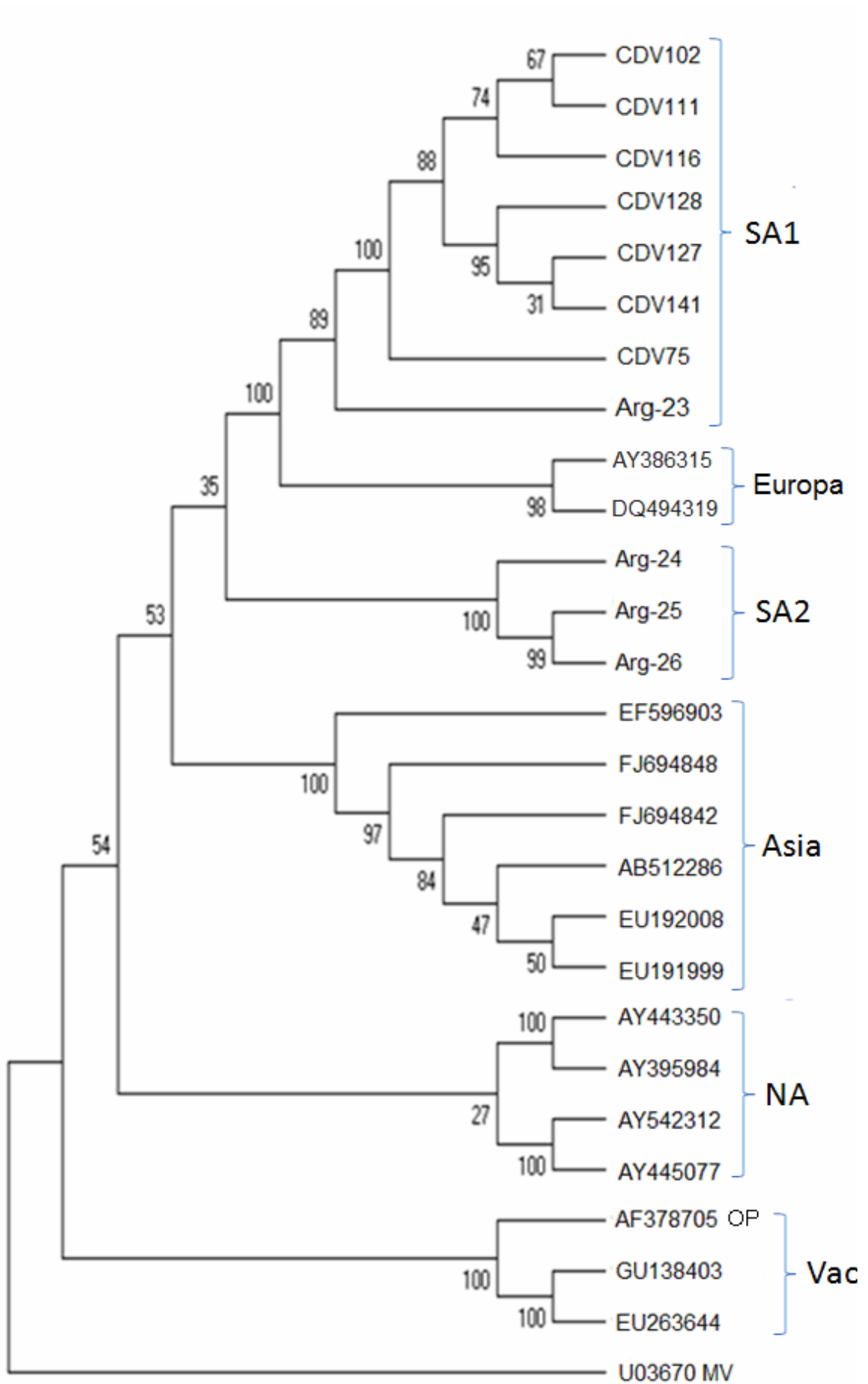


Figura 24. Cladograma en base a la secuencia aminoacídica del Fsp de los aislamientos del Río de la Plata, de diversas regiones geográficas y cepas vacunales. Como grupo externo se empleó la secuencia del Fsp de un aislamiento del virus del Sarampión (MV) (Nº acceso U03670). SA1: Sudamérica-1, SA2: Sudamérica-2, NA: Norteamérica, Vac: Cepas vacunales.

3.2.2.4 Comparación con la cepa vacunal OP

En la comparación de las secuencias aminoacídicas de ambos clados sudamericanos con la cepa OP (nº acceso AF378705), se observó un rango de 65 - 69 diferencias nucleotídicas, y cambios aminoacídicos en el rango de 42 - 44 (Figura 22, 23). El análisis filogenético reveló que todos los aislamientos de Sudamérica aparecen claramente separados de la cepa OP (Figura 24). El valor de divergencia aminoacídica promedio para el clado SA1 fue de 32,4%, mientras que para el clado SA2 el valor se ubicó en 32,1% (Tabla 7B).

A

	CDV75	CDV102	CDV111	CDV116	CDV127	CDV128	CDV141	Arg23	Arg24	Arg25
CDV75										
CDV102	0.015									
CDV111	0.015	0								
CDV116	0.022	0.007	0.007							
CDV127	0.03	0.015	0.015	0.022						
CDV128	0.03	0.015	0.015	0.022	0					
CDV141	0.03	0.015	0.015	0.022	0	0				
Arg23	0.044	0.052	0.052	0.059	0.067	0.067	0.067			
Arg24	0.193	0.193	0.193	0.2	0.2	0.2	0.2	0.193		
Arg25	0.215	0.215	0.215	0.222	0.222	0.222	0.222	0.215	0.022	
Arg26	0.215	0.215	0.215	0.222	0.222	0.222	0.222	0.215	0.022	0

B

	SA1	SA2	Europa	NA	Asia
SA1					
SA2	0.211				
Euro	0.105	0.207			
NA	0.228	0.238	0.221		
Asia	0.256	0.259	0.242	0.274	
Vac	0.324	0.321	0.319	0.265	0.279

Tabla 7. Análisis de distancia aminoacídica del Fsp.

A. Análisis de los aislamientos de Uruguay y Argentina. Se destaca en recuadro los valores de divergencia entre los aislamientos de los clados sudamericanos SA1 y SA2.

B. Porcentaje promedio de diferencias aminoacídicas entre los aislamientos de los clados sudamericanos y aislamientos de Europa, Norteamérica, Asia y la cepa vacunal Onderstepoort. Se recuadran los valores de divergencia respecto al grupo SA1. SA1: Sudamérica-1, Euro: Europa, SA2: Sudamérica-2, NA: Norteamérica, Vac: cepa Onderstepoort.

3.2.2.5 Estudio de presiones selectivas

El análisis de presiones selectivas mediante el algoritmo SLAC se realizó con las 11 secuencias descritas en esta Tesis y las 47 secuencias no redundantes del Fsp publicadas en la base de datos. El valor dN/dS global fue cercano a 1 (0.97), indicando que evoluciona de forma neutral. El análisis de las presiones selectivas en los codones individuales reveló que 18 codones están sujetos a selección negativa, 104 evolucionan de modo neutral, mientras que 12 lo hacen bajo selección positiva (Tabla 8).

Codon	Cambios S obs	Cambios NS obs	E [sitios S]	E [sitios NS]	dS	dN	dN-dS
3	0	5	0.79	2.43	0	2.06	2.06
4	0	6	0.82	2.32	0	2.59	2.59
12	1	8	1.45	1.50	0.69	5.35	4.65
19	0	4	1.08	2.15	0	1.86	1.86
21	0	9	0.90	1.85	0	4.88	4.88
28	0	7	1.06	2.17	0	3.23	3.23
49	0	5	1.02	2.21	0	2.26	2.26
51	0	3	1.32	1.23	0	2.43	2.43
58	0	6	0.79	2.42	0	2.48	2.48
64	0	5	1.06	2.17	0	2.31	2.31
99	0	5	0.88	2.30	0	2.17	2.17
110	0	4	1.04	2.18	0	1.83	1.83

Tabla 8. Representación de los residuos sujetos a selección positiva en el Fsp. Cambios S obs: número de cambios sinónimos observados en el sitio, Cambios NS obs: número de cambios no sinónimos observados en el sitio, E [sitios S]: número de cambios sinónimos esperados en el sitio, E [sitios NS]: número de cambios no sinónimos esperados en el sitio, dS: cambios S obs/E [sitios S], dN: cambios NS obs/E [sitios NS], dN: cambios NS obs/E [sitios NS] - cambios S obs /E [sitios S].

4. DISCUSIÓN

Distemper es una de las afecciones virales de mayor incidencia y relevancia a nivel mundial en cánidos domésticos y salvajes. Desde hace unas décadas, se registran continuamente brotes de la enfermedad en el mundo (Appel & Summers, 1999; Lednicky et al., 2004; Keawcharoen et al., 2005; Lan et al., 2006), así como una preocupante expansión en el rango de huéspedes (Harder et al., 1996; Lednicky et al., 2004; Goller et al., 2009). Sudamérica no está exenta de esta problemática, observándose un aumento en los casos de Distemper en canes domésticos de Argentina y Brasil (Gebara et al., 2004; Saito et al., 2006; Calderón et al., 2007). En Brasil, Distemper constituye además la principal causa de muerte o eutanasia en canes domésticos (Del Puerto et al., 2010). En ambos países también se han registrado infecciones naturales por CDV en felinos y zorros (Nava et al., 2008; Ferreyra et al., 2009; Megid et al., 2009).

En los últimos años en nuestro país, los médicos veterinarios han informado de un elevado número de casos de Distemper, incluso en canes vacunados. Con el objetivo de contribuir con la implementación de planes de vigilancia sanitaria, en el marco de mi tesina de grado implementamos, por primera vez en Uruguay, un método de detección del genoma de CDV. Este método implica la amplificación por RT-PCR tiempo final de un fragmento conservado de 287 pb del gen N (Frisk et al., 1999). La secuenciación de los amplicones obtenidos de cepas de campo uruguayas, su posterior análisis bioinformático y comparación con la cepa vacunal OP, nos permitió desarrollar un sistema de RFLP para la rápida discriminación entre cepas de campo y vacunales. De este modo, determinamos que los casos de infección en animales vacunados se debían a virus de campo, y no a la reversión de la cepa vacunal (Sarute et al., 2011).

En el marco de esta tesis de Maestría nos propusimos avanzar en el desarrollo de metodologías diagnósticas, y en la caracterización de las cepas circulantes de CDV en el Río de la Plata, en base al análisis del gen de la hemaglutinina (H) y la región codificante del péptido señal de la proteína de fusión (Fsp). El primer objetivo fue desarrollar un método de detección del genoma viral basado en RT-PCR en tiempo real con química TaqMan, mediante la hibridación y amplificación de un fragmento de una región conservada del gen N.

La tecnología de RT-PCR en tiempo real es una de las contribuciones más importantes en el área diagnóstica, permitiendo realizar procedimientos más rápidos y específicos (Mackay, 2007). A la fecha en Sudamérica, el único estudio de detección del genoma viral por RT-PCR en tiempo real se basa en la utilización del agente intercalante SYBR Green (Del Puerto et al., 2010). Dicho método es considerado no específico debido a que la molécula de SYBR Green se intercala en todas las estructuras de DNA doble hebra, incluidos amplicones inespecíficos o dímeros de cebadores, y no solamente en el amplicón de interés (Mackay, 2007). Por tanto, el método diagnóstico aquí desarrollado, constituye el primer desarrollo en Sudamérica de detección específica del genoma de CDV por RT-PCR tiempo real mediante química TaqMan.

Nuestro trabajo comenzó por comparar muestras diagnosticadas como positivas por el método de RT-PCR tiempo final previamente implementado, y el uso de un control positivo (cDNA cepa vacunal Onderstepoort). Una vez estandarizado el protocolo del PCR y las condiciones de ciclado, desarrollamos el uso de un control interno (CI) (genoma viral IBV), el cual brindó una mayor rigurosidad al método de diagnóstico.

Mediante este ensayo, detectamos al genoma viral en el 73% de las muestras analizadas, y en la muestra de la cepa vacunal OP utilizada como control positivo. En el restante 27% de las muestras, no se detectó al genoma viral aunque éstas provenían de animales con sintomatología compatible con Distemper. En estos casos puede haber ocurrido que los síntomas observados fueran causados por otro agente viral, debido a la similitud en la sintomatología de Distemper con otras virosis de canes (Appel & Summers, 1999), o bien que las muestras no se hayan conservado adecuadamente antes de recibirlas en nuestro laboratorio. La utilización del CI en los ensayos, asegura que en los casos negativos no hubo degradación del RNA durante la extracción del genoma viral, o inhibición en las reacciones de RT y/o RT-PCR en tiempo real. Estas muestras negativas también fueron sometidas al ensayo de RT-PCR por tiempo final, y en ningún caso se detectó la presencia del genoma viral. Estos resultados concuerdan con los datos de Elia y cols. (2006), quienes establecieron que el límite de detección del genoma viral es el mismo para su método basado en RT-RT-PCR en tiempo real con química Taqman, y el desarrollado por Frisk y cols (1999). Aunque ambos métodos puedan presentar la misma sensibilidad, el método de

diagnóstico desarrollado, presenta la ventaja de ser más rápido y evitar posibles problemas de contaminación, debido a que no existe manipulación del amplicón.

En el ensayo diagnóstico, utilizamos muestras de orina y secreciones óculo-nasales debido a que presentan diversas ventajas como muestras diagnósticas: se obtienen a través de métodos que no son invasivos para el animal y son fáciles de coleccionar, procesar y almacenar. Mediante cuantificación por RT-PCR en tiempo real, se determinó que la carga viral de estos fluidos es superior a la detectada en muestras de sangre y diversos tejidos, sustentando el uso de las mismas para ensayos de detección del genoma viral (Elia et al., 2006).

Con el fin de realizar un análisis preliminar sobre la ocurrencia y distribución de los casos de Distemper en Uruguay, se establecieron correlaciones entre los parámetros sanitarios de los animales y el diagnóstico por RT-PCR en tiempo real. Del total de las muestras diagnosticadas como positivas, el 21% provenían de animales no vacunados, en estos casos se observó una mayor frecuencia de la enfermedad en animales entre tres y seis meses de edad. Este resultado no es sorprendente debido a que durante este período los animales pierden los anticuerpos neutralizantes maternos, lo cual los vuelve susceptibles al virus (Kim et al., 2001). Debido a ello, los planes de vacunación siguen el siguiente esquema: la primera dosis se debe aplicar a los dos meses, aunque los anticuerpos maternos interfieran con el desarrollo de la respuesta, la segunda dosis debe ser administrada después de tres o cuatro semanas de la primera, y finalmente la tercera a los cuatro meses de vida; se sugieren, además, refuerzos anuales de por vida (Kim et al., 2001; Calderón, 2008). La mayoría de los casos positivos (74%), sin embargo, provenían de animales vacunados. Resultados similares se observaron previamente en la región, donde animales vacunados contrajeron la enfermedad (Saito et al., 2006; Calderón, 2008; Del Puerto et al., 2010; Sarute et al., 2011). Estos casos podrían deberse a una insuficiente cobertura vacunal, asociada al no seguimiento de los planes de vacunación recomendados, a la inadecuada administración de las vacunas, o más importante aún a la falta de neutralización cruzada entre las cepas de campo y vacunales (Rikula, 2008).

El segundo objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar genéticamente a los aislamientos de campo del Río de la Plata mediante el análisis de la secuencia codificante del gen H y la región Fsp. La caracterización de los aislamientos también

nos permitió compararlos con la cepa vacunal OP, revelando elevados valores de divergencia aminoacídica para ambas regiones genómicas: en el orden del 9% a nivel de la hemaglutinina, y del 32% en la región Fsp (Tabla 5B; 6B). Este resultado confirma análisis previos donde se estableció que existe una marcada diferenciación genética entre las cepas vacunales y los aislamientos de campo de otras regiones geográficas, con valores de divergencia aminoacídica semejantes a los detectados en los aislamientos del Río de la Plata (Bolt et al., 1997; Lan et al., 2006; Martella et al., 2006; Lee et al., 2008; Sultan et al., 2009).

La diferenciación genética entre cepas de campo y vacunales es particularmente importante en el caso de la proteína H, debido a que es el determinante inmunógeno principal del virus (Blixenkrone-Moller et al., 1991). El análisis de la secuencia aminoacídica de la hemaglutinina de los aislamientos de campo, nos permitió identificar sitios potenciales de glicosilación que no están presentes en la cepa OP. Estas diferencias contribuirían a la falta de neutralización cruzada entre las cepas de campo y vacunales (Sawatsky & von Messling, 2010). La eficacia de las vacunas comerciales podría verse comprometida por la elevada variación genética/antigénica y la ocurrencia de nuevos sitios de glicosilación en las cepas de campo, favoreciendo la ocurrencia de casos de Distemper en poblaciones de canes vacunados (Bolt et al., 1997). La elevada divergencia detectada en la hemaglutinina entre cepas de campo y vacunales en Asia ha determinado que se comiencen a utilizar nuevas vacunas basadas en la atenuación de cepas que circulan actualmente en esta región (Zhao et al., 2009). Por tanto, el análisis de la variabilidad genética no solo es relevante para estudios de caracterización, sino que también constituye un importante aporte para la formulación de nuevas vacunas.

Nuestro trabajo constituye el primer estudio de caracterización realizado en Sudamérica en base al análisis de la secuencia completa de la hemaglutinina y el Fsp. El trabajo de Calderón y cols. (2007), único estudio de variabilidad genética de CDV en la región a la fecha, está basado en el análisis de una secuencia parcial del gen H (871 pb) de aislamientos de campo de Argentina. La obtención de la secuencia completa de la hemaglutinina de los aislamientos de Uruguay y Argentina, nos permitió analizar las relaciones evolutivas entre dichos aislamientos y los ocho linajes de CDV descritos a la fecha (Martella et al., 2006; Demeter et al., 2007; An et al., 2008; Woma et al., 2009).

El análisis filogenético reveló que todos los aislamientos de Uruguay, Brasil y un aislamiento argentino Arg23, forman un clado que denominamos SA1. Los aislamientos de este clado forman parte de un clado mayor que incluye el linaje EU1, los cuales mostraron niveles de divergencia aminoacídica del 2.5% entre sí y con los aislamientos de EU1, y valores superiores al 4.6% con el resto de los linajes caracterizados. Se considera que dos aislamientos pertenecen a un mismo linaje si forman un clado en la filogenia y presentan valores de divergencia aminoacídica en la hemaglutinina menores al 4%, mientras que si los valores son superiores al 4% pertenecen a linajes distintos (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006). Podemos afirmar, entonces, que los aislamientos sudamericanos de SA1 pertenecen al linaje EU1, por lo que proponemos denominar al linaje EU1 como Europa 1/Sudamérica 1 (EU1/SA1). Este linaje constituye uno de los más distribuidos alrededor del mundo, ya que está presente en tres países de Sudamérica (Uruguay, Argentina y Brasil), y en varios países de Europa (Martella et al., 2006). El análisis de cepas de CDV aisladas en distintas regiones geográficas, y pertenecientes a diversos huéspedes carnívoros, reveló que la deriva genética/antigénica actúa sobre el gen H principalmente por un patrón geográfico (Martella et al., 2006). Sin embargo, los aislamientos de SA1 y los de EU1 presentan una elevada identidad genética, lo cual indicaría que comparten un ancestro común, o bien que el tráfico incontrolado de animales ha favorecido a la dispersión del virus entre ambos continentes. Este intercambio debe ser reciente y continuo debido a que ambas poblaciones virales no presentan elevados valores de divergencia.

Los aislamientos argentinos (Arg24, Arg25 y Arg26) forman el segundo clado sudamericano. Estos aislamientos presentan valores de divergencia de hasta 1,8% entre sí, y mayores al 4,4% respecto a los aislamientos de los ocho linajes previamente caracterizados. Este clado constituye, por tanto, un nuevo linaje genético al cual denominamos Sudamérica 2 (SA2). Calderón y cols. (2007) establecieron en base al análisis de una secuencia parcial del gen H, que los aislamientos de campo de Argentina se pueden clasificar en dos genotipos, uno de los cuales agrupa a la mayoría de los aislamientos caracterizados (23 de 24). Nuestro análisis de la secuencia parcial de la proteína H (134 aa), incluyendo a las secuencias de todos los aislamientos uruguayos, argentinos y brasileños caracterizados a la fecha, confirma que 23 de los aislamientos analizados por Calderón y cols. (2007) se agrupan dentro del linaje SA2,

mientras que el restante (Arg 23) lo hace en el linaje EU1/SA1 (Figura 19). Estos resultados indican que el linaje SA2 es el mayoritario en Argentina, mientras que el linaje EU1/SA1 es el de menor prevalencia. Por el contrario, el linaje EU1/SA1 es el único representado en Uruguay y Brasil.

El linaje SA2 se encuentra relacionado con un bajo soporte (50%) con un linaje de Europa característico de carnívoros silvestres (EU2) (Figura 18). El linaje EU2 incluye cepas aisladas de hurones, visones y zorros rojos (Martella et al., 2006). Este vínculo sugiere que SA2 sería un linaje circulante entre la fauna silvestre de Sudamérica. Ferreyra y cols. (2009) determinaron en base a una secuencia parcial del gen H, que la cepa de zorro perro (*Cerdocyon thous*) (Nº acceso EU624410) se agrupa con el genotipo mayoritario de Argentina. Nuestro análisis basado en la secuencia de 134 aa de la hemaglutinina mostró que dicho aislamiento pertenece al linaje SA2, el más representado en Argentina (Figura 19). Este zorro pertenece a una reserva donde los visitantes pueden ingresar con canes y en sus proximidades habitan un gran número de perros, la mayoría de ellos sin vacunación. Debido a ello, los autores proponen que los canes domésticos habrían transmitido el virus a los carnívoros de la reserva (Ferreyra et al., 2009). Sin embargo, no se puede descartar que el flujo de CDV haya sido desde los carnívoros silvestres a los canes domésticos. La presencia de un residuo aminoacídico en la hemaglutinina característico de carnívoros silvestres presente en los aislamientos de canes del linaje SA2, favorecería esta hipótesis. El residuo 530, ubicado en la zona de unión al receptor SLAM, está involucrado en la determinación del tropismo celular y posiblemente en la transmisión interespecífica del virus (von Messling et al., 2005). En esta posición se observaron cinco residuos aminoacídicos diferentes entre aislamientos de campo (D, E, G, N y R). La mayoría de los aislamientos de canes domésticos presentan G o E, mientras que en los aislamientos de silvestres se observa R, D o N (McCarthy et al. 2007). Todos los aislamientos del clado SA1 presentan 530G (característico de canes domésticos), mientras que los de SA2, incluyendo al aislamiento del zorro de Argentina, presentan 530D característico de la fauna silvestre, y ausente en aislamientos de canes de otros linajes (McCarthy et al., 2007). Este hallazgo sugiere que el linaje SA2 probablemente tuvo su origen en la fauna silvestre y se transmitió a cánidos domésticos.

Otro residuo aminoacídico de la proteína H, presuntamente implicado en la transmisión de CDV entre huéspedes carnívoros es el residuo 549, que también se ubica en la zona de unión al receptor SLAM (von Messling et al., 2005). La mayoría de los aislamientos de carnívoros silvestres presenta el residuo 549H, mientras que los canes domésticos poseen 549Y (McCarthy et al., 2007). Sin embargo, todos los aislamientos de canes de los clados SA1 y SA2 presentan el residuo 549Y. Recientemente, el residuo 549Y también se detectó en el aislamiento del zorro argentino, y en tres aislamientos de zorros silvestres de Alemania (Nikolin et al., 2011). Por tanto, este residuo no parece ser exclusivo de canes domésticos, limitando su utilidad como marcador de cepas por no discriminar entre huéspedes carnívoros.

Los residuos 530 y 549 se encuentran seleccionados positivamente junto a otros nueve residuos de la hemaglutinina. Estos nueve residuos no cambian entre los aislamientos de Sudamérica, por tanto no se podrían asociar en primera instancia a la diversificación de las cepas de nuestra región y su capacidad para infectar nuevos huéspedes.

En Sudamérica existen dos linajes co-circulantes con distinta distribución y prevalencia. Este hecho extiende resultados previos donde se estableció que en cierta región geográfica pueden coexistir más de un linaje de CDV (Hashimoto et al., 2001; Lednicky et al., 2004; Martella et al., 2006; Zhao et al., 2009). En todos los continentes se han descrito más de un linaje circulante, a excepción de África (Woma et al., 2009). Asimismo, se estableció que excepcionalmente aislamientos con diferente origen geográfico pueden agruparse dentro de un mismo linaje, como es el caso de Europa 3 (EU3) (Martella et al., 2006; Demeter et al., 2007). En nuestro trabajo, establecimos que los aislamientos sudamericanos de SA1 pertenecen a un linaje distante geográficamente como EU1, igual a lo observado para el linaje EU3 que agrupa aislamientos de Asia y Europa (Martella et al., 2006).

El análisis de la hemaglutinina nos permitió, por primera vez, caracterizar y describir a los linajes de CDV circulantes en Sudamérica, trabajo que recientemente publicamos (Panzer et al., 2011). Sin embargo, la amplificación del gen H es dificultosa si no se propaga al virus previamente en cultivo celular, debiendo utilizar cuatro y hasta cinco juegos de cebadores para amplificar su secuencia completa a partir de muestras clínicas (Pardo, 2006; Negrao, 2007). En nuestro estudio, intentamos amplificar la secuencia completa del gen H en 34 muestras (26 uruguayas y ocho argentinas),

obteniendo la secuencia completa en solo cuatro de ellas. Debido a esta dificultad, comenzamos a analizar otras regiones del genoma que fueran informativas para estudios de caracterización y evolución de CDV. De este modo, amplificamos la región Fsp de los siete aislamientos uruguayos y los cuatro argentinos caracterizados mediante el análisis de la hemaglutinina, y de un nuevo aislamiento de nuestro país (CDV127) (Tabla 4). Se estableció que la región Fsp presenta una variabilidad genética mayor a la detectada en la hemaglutinina (hasta 27% a nivel aminoacídico entre aislamientos de campo) y consta solamente de 405 pb, lo cual facilita su amplificación (von Messling & Cattaneo, 2002).

Al igual que lo observado para la proteína H, el análisis filogenético realizado con las secuencias aminoacídicas del Fsp reveló que las cepas sudamericanas se distribuyen en dos clados. La mayoría de los aislamientos sudamericanos pertenecen a un mismo clado (SA1), el cual se encuentra relacionado con cepas europeas, mientras que tres aislamientos argentinos (Arg24, Arg25, Arg26), forman un clado independiente (SA2) (Figura 24; Tabla 7B). El análisis de la secuencia completa de la hemaglutinina y la proteína de fusión (1989 pb) de aislamientos de Asia, reveló las mismas relaciones evolutivas para ambos genes (Lee et al., 2008). No obstante, nuestro trabajo es el primer estudio que analiza en conjunto la variabilidad de la hemaglutinina y la región Fsp, estableciendo que ambas regiones genómicas ofrecen la misma información debido a que se observan las mismas relaciones filogenéticas.

El análisis de la variación aminoacídica dentro de los clados reveló que los aislamientos de SA1 y los europeos con los que se agrupan (nº acceso AY386315, DQ494319) presentaron valores de divergencia de hasta 11,9%, mientras que entre los aislamientos del clado SA2 los valores fueron de hasta 2,2% (Tabla 7A). Los valores de divergencia aminoacídica promedio entre los clados SA1 y SA2 fueron del 21%. La comparación de ambos clados sudamericanos con los aislamientos de Asia y Norteamérica, también reveló elevados valores de divergencia (hasta 22,5%) (Tabla 7B). Estos valores de divergencia son superiores a los detectados en base al análisis de la hemaglutinina (hasta 3.5% dentro un mismo clado, y superiores al 4% entre los clados). Por tanto, la variabilidad de la región Fsp es, al menos, tres veces superior a la observada en la hemaglutinina. Las relaciones filogenéticas y los valores de variabilidad detectados en el Fsp, nos permite proponer un nuevo criterio

para definir linajes de CDV en base a esta región: dos aislamientos pertenecen a un mismo linaje si se agrupan en un mismo clado, y presentan valores de divergencia aminoacídica menores a 12%, mientras que pertenecen a linajes distintos si dichos valores son superiores a 12% y se agrupan en clados diferentes.

La divergencia aminoacídica detectada en la región Fsp de los aislamientos del Río de la Plata, son incluso superiores a los de divergencia nucleotídica (Figura 22, 23). Esto también se observó en aislamientos de otras regiones geográficas, por tanto se han analizado las posibles implicancias del Fsp sobre la función de la proteína F madura y la patogénesis viral. Estudios realizados con cepas mutantes en la región Fsp mostraron que la presencia de mutaciones específicas tiene efectos drásticos sobre la actividad de fusión de F. Von Messling & Cattaneo (2002) generaron mutantes con cambios en uno de los dos codones de inicio presentes en el Fsp (posiciones 1 y 61), sustituyendo en ambos casos metionina por leucina (M1L y M61L). Para ambos mutantes M1L y M61L, se detectó una actividad de fusión 20 veces superior respecto a los virus parentales. En dicho estudio, también se estableció que la longitud del Fsp influye sobre los niveles de actividad de la proteína F. El análisis de mutantes con el Fsp de longitud variable, reveló que la variante con el Fsp más corto (28 aa) presentó una actividad de fusión 70 veces mayor que la proteína parental. Se propone, por tanto, que dicha región podría modular la función de la proteína F, ya que las proteínas con mutaciones específicas o un Fsp de menor longitud presentaron mayor actividad fusogénica *in vitro* (Von Messling & Cattaneo, 2002).

Además, cabe destacar que el Fsp presenta una vida media de 30 minutos luego de ser procesado. El hecho que el péptido señal no sea degradado inmediatamente después de su clivaje sugiere que estaría involucrado en otra función adicional (von Messling & Cattaneo, 2002). Estudios realizados con células infectadas por HIV, mostraron que muchos procesos de la respuesta inmune dependientes de la calmodulina (proteína intracelular que actúa como receptor para el calcio en todas las células eucariotas), son interrumpidos por la interacción de esta molécula con el péptido señal de la glicoproteína gp160 del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (Martoglio et al., 1997). La calmodulina reconoce regiones cargadas positivamente con hélices anfifílicas de 16 a 35 residuos (hélices baa). La secuencia del péptido señal de gp160 presenta una región que forma una hélice baa, la cual tiene gran afinidad por la calmodulina e

inhibe su unión al calcio *in vitro* (Martoglio et al., 1997). A nivel del Fsp de CDV, también se describió una estructura de hélice baa con polaridad positiva. Esta estructura favorecería una interacción con la calmodulina semejante a la que ocurre en HIV, influyendo sobre la patogénesis viral (von Messling & Cattaneo, 2002). Sería relevante analizar si el elevado número de sustituciones aminoacídicas observadas en el Fsp, determinan un cambio sobre la polaridad de esta región entre aislamientos de campo. Esta aproximación permitiría establecer si en los aislamientos analizados la hélice baa se encuentra alterada debido a variaciones en la secuencia primaria del Fsp, lo cual impediría su unión a la calmodulina y la consecuente interrupción de los procesos que ésta regula.

El análisis de presiones selectivas del Fsp, reveló que el cociente dN/dS fue cercano a 1 (0.97), lo que indicaría que esta región evoluciona de forma neutral. Sin embargo, 12 de los 135 codones están sujetos a selección positiva, sugiriendo que son relevantes para el Fsp, aunque la región en su conjunto presente un dN/dS global neutral (Tabla 8). En otros modelos virales también se observó que la región amino-terminal de ciertas glicoproteínas de la envoltura, presenta un sesgo hacia los cambios no sinónimos, con un elevado número de residuos seleccionados (Curran et al., 2002). La región hipervariable 1 (HRV1) de la glicoproteína E2 del virus de la Hepatitis C, presenta un patrón evolutivo semejante al Fsp de CDV. Esta región forma parte de la proteína E2 que se expresa en superficie y presenta un sitio de unión a anticuerpos neutralizantes (Curran et al., 2002; Mondelli et al., 2003). Debido a que el Fsp es procesado en el medio intracelular antes que la proteína F se exporte a la envoltura viral, dicha región no sería blanco de anticuerpos. Sin embargo, la variabilidad aminoacídica y el número de residuos bajo selección positiva detectados en el Fsp, semejante a lo observado en la región HRV1, permite especular sobre una posible función de esta región aún no identificada.

4.1 Conclusiones y perspectivas

El estudio de la prevalencia de la enfermedad y de la variabilidad genética de las cepas circulantes son elementos fundamentales para analizar la epidemiología de Distemper en nuestra región. En el presente trabajo de Tesis se presenta, por primera vez en Sudamérica, un método de detección del genoma de CDV por RT-PCR en tiempo real

con química TaqMan. Este método constituye una herramienta rápida y confiable para la detección del genoma viral, y podría incluirse dentro de un eventual plan de contingencia de Distemper en nuestro país y la región.

También presentamos el primer estudio de caracterización genética de aislamientos de campo en nuestro continente, en base al análisis de la secuencia completa del gen H y la región Fsp. Mediante el análisis de ambas regiones genómicas, identificamos la presencia de dos linajes co-circulantes con diferente distribución y abundancia, uno correspondiente a un linaje ya caracterizado (EU1), el cual proponemos que se denomine EU1/SA1, y un nuevo linaje descrito en este trabajo denominado SA2. El linaje EU1/SA1 está representado por aislamientos de Uruguay, Brasil y Argentina, mientras que SA2 está formado solamente por aislamientos argentinos. Las relaciones evolutivas entre las cepas sudamericanas de SA1 y el linaje EU1, puede deberse al intercambio incontrolado de animales entre ambos continentes, mientras que el linaje SA2 se habría originado por el contacto entre carnívoros silvestres y canes domésticos. Dichos resultados fueron recientemente publicados por nuestro grupo de investigación (Panzera et al., 2011).

El análisis de un número mayor de aislamientos de Sudamérica permitirá establecer la prevalencia de ambos linajes en la región, en especial en Argentina y Brasil donde la información sobre la variabilidad genética de las cepas circulantes en distintas regiones es limitada. El análisis de aislamientos de carnívoros silvestres permitirá determinar si éstos pertenecen al linaje SA2, lo cual sería relevante para elucidar el origen de este linaje. Esto es de relevancia principalmente en nuestro país, debido a que no se cuenta con registros de CDV en animales silvestres.

El análisis de la región Fsp, permitió identificar un nuevo marcador para estudios de caracterización y evolución de CDV, el cual presenta valores de variabilidad genética más elevados que la hemaglutinina y reveló las mismas relaciones evolutivas. Debido a ello, proponemos una nueva definición de linajes para CDV en base a su variabilidad. Estos resultados serán publicados en un manuscrito que se encuentra en etapa de corrección por los autores.

Dentro de las actividades futuras de nuestra línea de investigación se destacan:

- Desarrollar un ensayo de sensibilidad y un método de cuantificación de la carga viral mediante RT-PCR en tiempo real.
- Ampliar los estudios de caracterización molecular de CDV en nuestra región, con el objetivo de monitorear a las cepas circulantes y eventualmente detectar nuevas variantes emergentes.
- Relevar la variabilidad genética de los CDVs que puedan ser detectados en carnívoros silvestres o en cautiverio de nuestro país.
- Realizar análisis funcionales para establecer los efectos de la variabilidad del Fsp sobre la fisiología de la proteína F y la patogénesis viral.
- Estudiar la dinámica poblacional de CDV y su posible rol en la patogénesis y virulencia.

Referencias bibliográficas

An, D.J., Yoon, S.H., Park, J.Y., No, I.S., Park, B. (2008). Phylogenetic characterization of Canine Distemper Virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet. Microbiol.* 132, 389-395.

Anderson, D.E., von Messling, V. (2008). Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J. Virol.* 82, 10510-10522.

Appel, M.J. (1987). En: Horzinek, M.C. (Ed.), Canine Distemper Virus in Virus Infections of Carnivores, vol. 1. Elsevier Science Publishers B.V. 179, 133–159.

Appel, M.J., Summers, B.A. (1999). Canine Distemper: Current Status. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Carmichael, L.E. Ed. International Veterinary Information Service.

Bellini, W.J., Englund, G., Richardson, C.D., Rozenblatt, S., Lazzarini, R.A. (1985). Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J. Virol.* 58, 408-416.

Blixenkrone-Moller, M., Pedersen, I.R., Appel, M.J., Griot, C. (1991). Detection of IgM antibodies canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Vet. Diagn. Invest.* 3, 3-9.

Bolt, G., Jensen, T.D., Gottschalck, E., Arctander, P., Appel, M., Buckland, R., Blixenkrone-Moller, M., (1997). Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J. Gen. Virology.* 78, 367-372.

Calderón, M.G., Remorini, P., Periolo, O., Iglesias, M., Mattion, N., La Torre, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341-349.

Calderón, M.G. (2008). Caracterización molecular de cepas de Parvovirus y virus Distemper canino provenientes de perros domésticos vacunados y no vacunados de Argentina. Tesis de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Callison, S.A., Hilt, D.A., Boynton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., Swayne, D.E., Jackwood, M.W. (2006). Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods.* 138, 60-65.

Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., Billeter, M.A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell.* 56, 759-764.

Curran, R., Jameson, C.L., Craggs, J.K., Grabowska, A.M., Thomson, B.J., Robins, A., Irving, W.L., Ball, J.K. (2002). Evolutionary trends of the first hypervariable region of the hepatitis C virus E2 protein in individuals with differing liver disease severity. *J. Gen. Virol.* 83, 11-23.

Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A., Montali, R.J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo. Wildl. Med.* 31, 441-451.

Demeter, Z., Lakatos, B., Palade, E.A., Kozma, T., Forgach, P., Rusvai, M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet. Microbiol.* 122, 258-269.

Del Puerto, H., Vasconcelos, A. C., Moro, L., Alves, F., Braz, G. F., Martins, S. (2010). Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 30, 139-144.

Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L. (1997). Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet. Rec.* 141, 380-383.

Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M., Luroso, E., Di Trani, L., Buonavoglia, C. (2006). Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 136, 171-176.

Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgartner, W. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluids from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634-3643.

Ferreira, H., Calderón, M.G., Marticorena, D., Marull, C., Leonardo, B.C. (2009). Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *J. Wild. Dis.* 45, 1158-62.

Frolich, K., Czupalla, O., Haas, L., Hentschke, J., Dedek, J., Fickel, J. 2000. Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Vet. Microbiol.* 74, 283-292.

Gebara, C.M.S., Wosiacki, S.R., Negrao, F.J., de Oliveira, D.B., Beloni, S.N.E., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F. (2004). Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene by RT-PCR in urine of dogs with distemper clinical signs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 480-487.

Gemma, T., Watari, T., Akiyama, K., Miyashita, N., Shin, Y.S., Iwatsuki, K., Kai, C., Mikami, T. (1996). Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 547-550.

Goller, K.V., Fyumagwa, R.D., Nikolin, V., East, M.L., Kilewo, M., Speck, S., Müller T., Matzke, M., Wibbelt, G. (2009). Fatal canine distemper infection in a pack of African wild dogs in the Serengeti ecosystem, Tanzania. *Vet Microbiol.* 146, 245-252.

Haig, D. (1956). Canine distemper immunisation with avianised virus. Onderstepoort. *J Vet Res* 27, 19-53.

Harder, T.C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., van Amerongen, G., Orvell, C., Barrett, T., Appel, M.J., Osterhaus A.D. (1996). Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77, 397-405.

Hashimoto, M., Une, Y., Mochizuki, M. (2001). Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch. Virol.* 146, 149-155.

Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y., Mori, T., Hirayama, N., Kai, C., Mikami, T. (1997). Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virology.* 78, 373-380.

Keawcharoen, J., Theamboonlers, A., Jantaradsamee, R., Rungsipipat, A., Poovorawan, Y., Oraveerakul, K. (2005). Nucleotide Sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol.* 105, 137-142.

Kim, Y., Cho, K., Youn, H., Yoo, H., Han, H. (2001). Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* 2, 59-63.

Lamb, R.A., Parks, G.D. (2007). Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication en *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, 5ª Ed.

Lan N.T., Yamaguchi R., Inomata A., Furuya Y., Uchida K., Sugano S., Tateyama S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol.* 115, 32-42.

Lednicky, J.A., Dubach, J., Kinsel, M.J., Meehan, T.P., Bocchetta, M., Hungerford, L.L., Sarich, N.A., Witecki, K.E., Braid, M.D., Pedrak, C., Houde, C.M. (2004). Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virology*. 2, 1:2.

Lee, M.S., Tsai, K.J., Chen, L.H., Chen, C.Y., Liu, Y.P., Chang, C.C., Lee S.H., Hsu, W.L. (2008). The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Veterinary Journal*. 183, 184-190.

Liermann, H., Harder, T.C., Lochelt, M., von Messling, V., Baumgartner, W., Moennig, V., Haas, L. (1998). Genetic analysis of the central untranslated genome region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine Distemper Morbilliviruses. *Virus Genes*. 17, 259-270

Mackay, I. (2007). Real-Time PCR in Microbiology: from diagnosis to characterization. Caister Academic Press, 1st Ed.

Martella, V., Elia, G., Lucente, M, Decaro, N., Lorusso, E., Banyai, K., Blixenkrone-Møller, M., Lan, N., Yamaguchi, R., Cirone, F., Carmichael, L., Buonavoglia, C. (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology*. 116, 301–309.

Martoglio, B., Graf, R., Dobberstein, B. (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO J*. 16, 6636-6645.

McCarthy A.J., Shaw M., Goodman S.J., B.P.R. (2007). Pathogen evolution and disease emergence in carnivores Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings of the Royal Society B*. 3165-3174.

Megid, J., de Souza, V.A., Teixeira, C.R., Cortez, A., Amorin, R.L., Heinemman, M.B., Cagnini, D.Q., Richtzenhain, L.J. (2009). Canine distemper virus in a crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: case report and phylogenetic analyses. *J. Wildl. Dis.* 45, 527-530.

Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S., (1999). Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2936-2942.

Mondelli, M.U., Cerino, A., Meola, A., Nicosia, A. (2003). Variability or conservation of hepatitis C virus hypervariable region 1? Implications for immune responses. *J. Biosci.* 28, 305-310.

Nava, A.F., Cullen, L. Jr, Sana, D.A., Nardi, M.S., Filho, J.D., Lima, T.F., Abreu, K.C., Ferreira, F. (2008). First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth.* 5, 513-518.

Negrao, F.B. (2007). Análise filogenética do gene da hemaglutinina de estirpes selvagens brasileiras do vírus da Cinomose canina. Tesis de Doctorado del Programa en post-graduación en Ciencia Animal, Universidad Estadual de Londrina.

Panzer, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., LaTorre, J., Pérez, R. (2011). Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res.* 163, 401-404.

Pardo, I., Johnson, G.C., Kleiboeker, S.B. (2005). Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5009-5017.

Pardo, I. (2006). Phylogenetic characterization of canine Distemper virus detected in naturally infected North American dogs. Master of Science. University of Missouri-Columbia.

Plattet, P., Cherpillod, P., Wiener, D., Zipperle, L., Vandeveld, M., Wittek, R., Zurbriggen, A. (2007). Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *J. Virol.* 81, 11413-11425.

Rikula, U.K. (2008). Canine distemper in Finland: vaccination and epidemiology. Disertación académica presentada en la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Helsinki.

Saito, T.B., Alfieri, A.A., Wosiacki, S.R., Negrao, F.J., Morais, H.S.A., Alfieri, A.F. (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res. Vet. Sci.* 80, 116-119.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sarute, N., Pérez, R., Francia, L., Hernández, M., Bedó, G., Bonilla, B., Guasco, S., Cardeillac, A., Panzera, Y. (2011). Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay. *Veterinaria.* 47, 7-13.

Sawatsky, B., von Messling, V. (2010). Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J. Virol.* 84, 2753-2761.

Scagliarini, A., Dal Pozzo, F., Gallina, L., Vaccari, F., Morganti L. (2007). TaqMan based real time PCR for the quantification of canine distemper virus. *Vet. Res. Commun.* 1, 261-263.

Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi, Y. (2003). Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *J. Virol.* 77, 9943-9950.

Si, W., Zhou, S., Wang, Z., Cui, S.J. (2010). A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus. *Viol. J.* 7, 86-91.

Stern, L.B., Greenberg, M., Gershoni, J.M., Rozenblatt, S. (1995). The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J. Virol.* 69, 1661-1668.

Sultan, S., Charoenvisal. N., Lan, N.T., Yamaguchi, R., Maeda, K., Kai, K., (2009). The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper viruses. *Viol. J.* 6, 157-166.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.* 24, 1596-1599.

von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. Virol.* 75, 6418-6427.

von Messling, V., Cattaneo, R. (2002). Amino-terminal precursor sequence modulates canine distemper virus fusion protein function. *J. Virol.* 76, 4172-4180.

von Messling, V., Springfield, C., Devaux, P., Cattaneo, R., (2003). A Ferret Model of Canine Distemper Virus Virulence and Immunosuppression. *J. Virol.* 77, 12579-12591.

von Messling, V., Milosevic, D., Devaux, P., Cattaneo, R. (2004) Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J. Virol.* 78, 7894-7903.

von Messling V., Oezguen N., Zheng Q., Vongpunsawad S., Braun W. and Cattaneo R. (2005). Nearby Clusters of Hemagglutinin Residues Sustain SLAM-Dependent Canine Distemper Virus Entry in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Virol.* 79, 5857-5862.

Vongpunsawad, S., Oezgun, N., Braun, W., Cattaneo, R. (2004). Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J. Virol.* 78, 302-313.

Woma T.Y., van Vuuren M., Bosman A.M., Quan M., Oosthuizen M., (2009). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 143, 126-32.

Zhao, J.J., Yan, X.J., Chai, X.L., Martella, V., Luo, G.L., Zhan, H.L., Gao, H., Liu, Y.X., Bai, X., Zhang, L., Chen, T., Xu, L., Zhao, C.F., Wang, F.X., Shao, X.Q., Wu, W., Cheng, S.P., (2009). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Vet. Microbiol.* 140, 34-42.

Zipperle, L., Langedijk, J.P., Orvell, C., Vandeveld, M., Zurbriggen, A., Plattet, P. (2010). Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *J. Virol.* 84, 9618-9624.