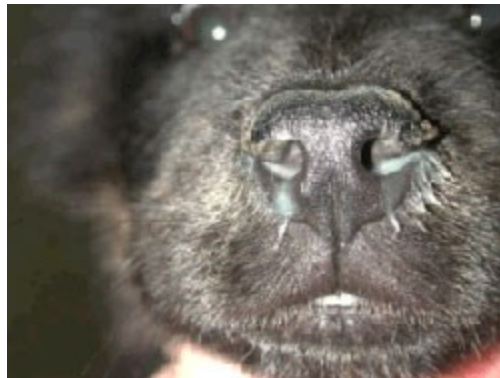


DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA CEPA DE CAMPO URUGUAYA DEL VIRUS DISTEMPER CANINO



Arianne Cardeillac

Pasantía de grado

Profundización en Biología Molecular

Orientadora: Dra Yanina Panzera

Co- Orientador: Dr Rúben Pérez

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias-UdelaR

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yanina Panzera, por haberme dado la oportunidad de trabajar en éste proyecto, por los conocimientos aportados y la orientación permanente.

Al Dr. Rúben Pérez por el asesoramiento brindado y su disposición constante.

Al Lic. Martín Hernández, por su apoyo y optimismo.

A la Dra. Lourdez Francia por su gentileza al brindarnos las muestras clínicas de partida para nuestra investigación.

A la Dra. Gabriela Bedó por los aportes realizados en la corrección de ésta tesis.

A todos los integrantes del equipo CDV; al Lic. Braulio Bonilla por su dedicación y entrenamiento. A la Lic. Soledad Guasco por su compañerismo y complicidad. Al Lic. Nicolás Sarute por su apoyo, paciencia y colaboración constante. Es a ellos a quienes dedico los resultados de ésta tesis.

A todos los integrantes de la Sección Genética Evolutiva de Facultad de Ciencias por haberme integrado y acompañado en el transcurso de mi pasantía.

ÍNDICE

1. Resumen.....	4
2. Introducción	
2.1 Genoma viral.....	6
2.2 La enfermedad y el ciclo viral.....	6
2.3 Diagnóstico.....	7
2.4 Caracterización Genética.....	8
2.5 Antecedentes del grupo.....	9
3. Objetivos	11
4. Materiales y métodos	
4.1 Muestra.....	12
4.2 Extracción del genoma viral.....	12
4.3 Diagnóstico.....	12
4.4 Diseño de cebadores	13
4.5 Caracterización genética.....	14
4.6 Electroforesis.....	15
4.7 Purificación de amplicones.....	16
4.8 Clonación.....	16
4.9 Extracción del DNA plasmídico.....	16
4.10 Secuenciación.....	16
4.11 Análisis de las secuencias.....	17
5. Resultados	
5.1 Diagnóstico mediante RT-PCR	19
5.2 Caracterización, obtención del gen H.....	19
5.3 Comparación del gen H de Uy 109 con las cepas uruguayas.....	23
5.4 Comparación de la proteína H de Uy 109 con cepa vacunal.....	23
5.5 Análisis filogenético	27
6. Discusión.....	29
6.1 Diagnóstico	29
6.2 Caracterización genética.....	29
6.3 Comparación del gen H de Uy 109 con la cepa vacunal.....	30
6.4 Análisis filogenético.....	30
7. Conclusiones y Perspectivas.....	32
8. Bibliografía	33
9. Anexo	37

1. RESUMEN

El virus Distemper Canino (CDV) pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus envuelto con genoma de RNA simple hebra, de polaridad negativa, no segmentado, y de aproximadamente 15.7 kilobases. Presenta distribución cosmopolita y afecta a cánidos domésticos y salvajes de todas las edades, así como a otros miembros del orden *Carnívora*. CDV es el agente etiológico de la enfermedad infecciosa denominada Distemper, Joven edad o Moquillo que se caracteriza por presentar altas tasas de mortalidad y elevada morbilidad y una amplia variedad de síntomas clínicos a nivel sistémico.

Esta enfermedad se ha podido controlar mediante el uso de vacunas con virus vivos atenuados; sin embargo, en los últimos años se han observado numerosos brotes infecciosos en poblaciones de cánidos vacunados en diversas partes del mundo, e incluso en la región. Se ha propuesto que esto puede deberse entre otras causas, a la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia, o a la emergencia de nuevas cepas con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas administradas. Debido a ésta problemática y a la escasa información existente en la región, resulta de importancia desarrollar y mantener planes de vigilancia mediante el empleo de metodologías de diagnóstico molecular así como también conocer las cepas de campo circulantes en el país.

En éste estudio se diagnosticó como positiva una muestra de secreción ocular proveniente de un can con sintomatología clínica de Distemper. El diagnóstico molecular fue llevado a cabo mediante Retrotranscripción (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplificando un fragmento de 287 pb de la región conservada del gen que codifica la proteína de la nucleocápside (N).

Con el fin de conocer las cepas de campo circulantes en el país, realizamos la caracterización genética mediante el análisis del gen que codifica para la proteína Hemaglutinina (H). Obtuvimos la tercera secuencia nucleotídica completa del gen H en nuestro país. Los análisis comparativos de las tres cepas indicaron un elevado porcentaje de identidad del orden del 99%, sugiriendo la existencia de una cepa predominante en el país. La comparación con respecto a la cepa vacunal mostró elevados valores de divergencia, similares a los observados en otras regiones.

El análisis filogenético realizado usando cepas de campo de CDV representativas de los distintos linajes caracterizados en el mundo, reveló que las cepas uruguayas poseen una estrecha vinculación con la mayoría de las cepas aisladas en Sudamérica y a su vez con las del linaje europeo. Asimismo se observó la existencia de un segundo linaje circulante en Sudamérica, representado por una única cepa de Argentina.

Si bien los datos aquí reportados contribuyen a la caracterización genética de las cepas de CDV circulantes en el país, es necesario ampliar el número de muestras a analizar con el fin de continuar con los planes de vigilancia y así lograr un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad en la región.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Genoma viral

El virus Distemper Canino (CDV) pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus envuelto que posee un genoma de RNA simple hebra, de polaridad negativa, no segmentado, y de aproximadamente 15.7 kilobases. Dicho genoma presenta en cada extremo regiones no traducidas UTR 3' y 5' esenciales para la replicación y transcripción. Posee seis genes dispuestos en tándem separados por regiones intergénicas que presentan secuencias conservadas no traducidas que intervienen en la regulación de la transcripción, y a su vez, en la edición y la modificación de los mensajeros virales (Griffin, 2007; Lamb & Parks, 2007). Estos genes codifican para las proteínas estructurales del virión: la proteína N constituye la nucleocápside, la proteína de matriz (M) se asocia con la envoltura lipídica, la hemaglutinina (H) determina la adsorción del virus a la célula hospedera, la glicoproteína de fusión (F) favorece la fusión de la envoltura viral con la membrana celular del hospedero y la proteína Larga (L) y la fosfoproteína P forman parte del complejo RNA polimerasa RNA dependiente (van Regenmortel et al, 2000; Lamb & Parks, 2007), (Figura 1).

El gen P además codifica para dos proteínas no estructurales, denominadas C y V; C se obtiene cuando se utiliza un marco abierto de lectura (ORF) alternativo en el RNA mensajero, mientras que V se genera mediante edición del mensaje. La función de estas proteínas se ha vinculado con la interferencia en la respuesta inmune de la célula huésped, aunque no se ha esclarecido completamente (Griffin, 2007; Lamb & Parks, 2007), (Figura 1).

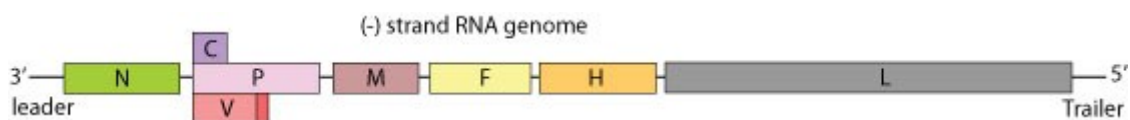


Figura 1. Esquema del genoma de CDV.

2.2 La Enfermedad y el ciclo viral

CDV es el agente etiológico de la enfermedad infecciosa denominada Distemper, Joven edad o Moquillo. Dicha enfermedad presenta distribución cosmopolita y afecta a

cánidos domésticos y salvajes de todas las edades, así como a otros miembros del orden *Carnívora* como ser mustélidos, vivérridos, úrsidos, prociénidos y félidos (Appel, 1987; Grachev et al., 1989; Appel et al., 1994; Appel & Summers, 1995; Harder & Osterhaus, 1997; Carpenter et al., 1998; Kennedy et al., 2000; Kuiken et al., 2006; Griffin, 2007; Takayama et al., 2008).

Distemper se caracteriza por presentar altas tasas de mortalidad y elevada morbilidad (Appel 1987) y una amplia variedad de síntomas clínicos a nivel sistémico (Appel & Summers, 1995). Una vez que el virus ingresa al organismo, ocurre infección de los macrófagos en el tracto respiratorio donde se da la primera replicación y luego a través de ellos llega a los órganos linfáticos, lo que puede provocar una severa inmunosupresión. El curso de la infección una vez que se alcanza esta etapa, es sumamente variable y la severidad de los síntomas depende de la cepa viral, la edad y la inmunocompetencia del animal (Appel & Summers, 1999; Martella et al., 2008). A continuación, el virus se propaga a los epitelios de diversos órganos, como el tracto gastrointestinal, respiratorio, urinario y al sistema nervioso central, provocando una amplia variedad de síntomas clínicos asociados a lesiones en estos sistemas (Appel y Summers, 1999). Distemper es altamente contagiosa, su transmisión ocurre principalmente por vía de aerosoles de secreciones respiratorias y éste, es liberado en todas las excreciones corporales sin importar la presencia o no de síntomas clínicos (Appel & Summers, 1995, 1999).

2.3 Diagnóstico

La diversidad en las manifestaciones clínicas está asociada al ciclo impredecible y variable del virus en el huésped, lo que dificulta establecer un diagnóstico clínico *ante-mortem* preciso en la mayoría de los animales analizados (Frisk et al., 1999).

Se han desarrollado diversos ensayos para detectar al agente viral en animales que presentan sintomatología asociada a infección por CDV. Para realizar el diagnóstico etiológico se utilizan células de tejidos como el epitelio urinario y la piel, muestras de sangre y de fluidos corporales como secreciones nasales y oculares (Kim et al., 2006). Las metodologías de diagnóstico incluyen ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, ELISA e hibridación in situ. Sin embargo, dichas técnicas no satisfacen los requerimientos de un ensayo de detección sensible, rápido y específico (Frisk et al., 1999). El desarrollo de métodos moleculares basados en Retrotranscripción

(RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Frisk et al., 1999; Kim et al., 2001; Gebara et al., 2004; Saito et al., 2006). La detección del genoma viral por RT-PCR ha revelado la presencia del virus en secreciones óculo-nasales, orina, líquido céfalo-raquídeo, sangre, y a nivel de varios tejidos (Frisk et al., 1999).

Para realizar el diagnóstico molecular comúnmente se amplifica la región central del gen N, dado que la misma es altamente conservada entre diversas cepas de CDV (Frisk et al., 1999, Gebara et al., 2004, Saito et al., 2006).

2.4 Caracterización genética

Durante muchos años Distemper ha sido controlado mediante el uso de vacunas con virus vivos atenuados, (Appel & Summers, 1995, 1999). Sin embargo, en años recientes se ha observado un resurgimiento de la enfermedad y se han registrado numerosos brotes infecciosos en poblaciones de cánidos vacunados en diversas partes del mundo, e incluso en la región (Ek-Kommonen et al., 1997; Calderón et al., 2007; Takayama et al., 2008). Se ha propuesto que esto puede deberse entre otras causas a la reversión de las cepas atenuadas a la virulencia (Appel, 1987), o a la emergencia de nuevas cepas con la capacidad de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas administradas (Pardo et al., 2005). Es por ésta razón que resulta de vital importancia realizar la caracterización genética de las cepas de campo circulantes.

Las glicoproteínas H y F constituyen los mayores determinantes antigénicos (Appel & Summers, 1999). La hemaglutinina reconoce el receptor de la célula huésped y se encarga de la adsorción celular en el primer paso de la infección (Griffin, 2007). Una adecuada respuesta inmune del huésped contra esta proteína puede prevenir dicha infección (Martella et al., 2006). Las secuencias del gen H obtenidas de casos recientes de infección en varias regiones del mundo como Norte América, Europa, Asia, muestran una marcada diversidad al compararlas con las cepas utilizadas en las vacunas (Bolt et al., 1997; Iwatsuki et al., 1997; Haas et al., 1997, 1999; Mochizuki et al., 1999; Martella et al., 2006). A su vez varios análisis han revelado que el gen H está sujeto a una variación genética más elevada que el resto de los genes virales (Bolt et al., 1997), por lo que comúnmente se utiliza la secuencia nucleotídica de éste gen para realizar análisis filogenéticos entre cepas circulantes y así establecer las relaciones existentes entre las mismas (Harder & Osterhaus, 1997; Mochizuki et al., 1999). Hasta la fecha se

establecieron, ocho linajes principales acorde a su distribución geográfica llamados América-1, América-2, Asia-1, Asia-2, Ártico, Europa, Europa-wildlife y Sudáfrica (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006; An et al., 2008; Woma et al., 2009). La mayoría de las cepas vacunales se agrupan formando un cluster aparte (América-1) (Figura 2).

2.5 Antecedentes del grupo

Debido al aparente aumento de casos de Distemper en nuestro país se implementó por primera vez en Uruguay una metodología de diagnóstico molecular basada en la amplificación por RT-PCR de un fragmento de 287 pb de la región conservada del gen N partiendo principalmente de muestras no invasivas para el animal como orina (Sarute, 2008, Tesina de grado) y secreción ocular (Guasco, 2010, Tesina de grado). A su vez, recientemente comenzamos con la caracterización genética de las cepas de campo circulantes en base al análisis de la secuencia nucleotídica del gen H. El primer análisis se realizó en base a un fragmento del extremo 3' del gen H a partir de una muestra de orina. Esta cepa denominada CDVUy-1 se agrupó formando un cluster con cepas aisladas en Brasil, Argentina y Europa, (Bonilla, 2008, Tesina de grado). Posteriormente mediante la amplificación del gen completo de H a partir de otras dos muestras de campo, se confirmaron las mismas relaciones filogenéticas y una elevada divergencia con respecto a la cepa corrientemente utilizada en las vacunas (Guasco, 2010, Tesina de grado).

Con el fin de continuar con los estudios de vigilancia epidemiológica, en el presente trabajo diagnosticamos y caracterizamos una nueva muestra proveniente de un can con sintomatología clínica asociada a Distemper.

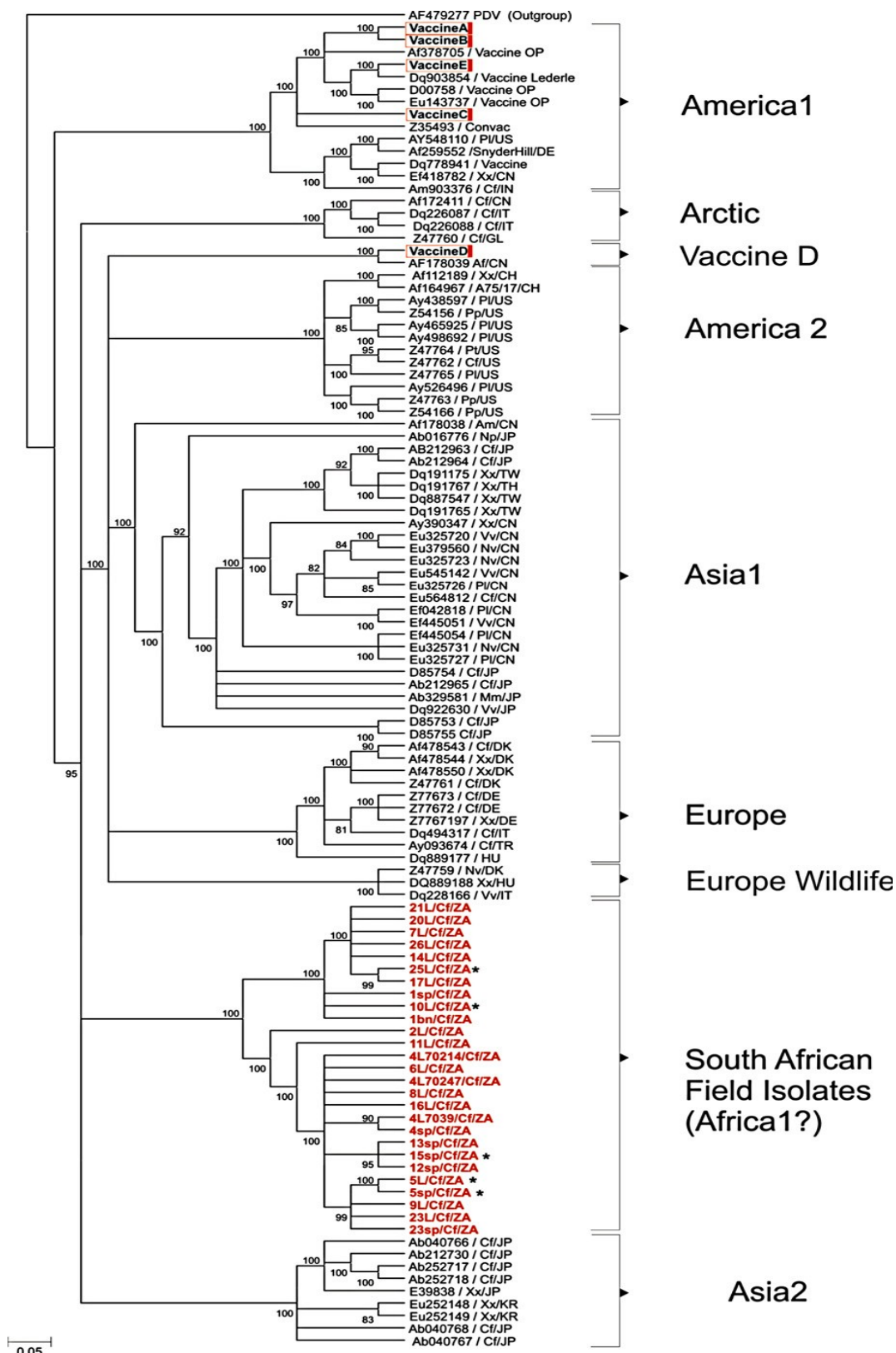


Figura 2. Relaciones filogenéticas entre cepas de CDV basadas en el alineamiento de secuencias nucleotídicas del gen H. Se observan los 8 linajes acorde a la distribución geográfica de las distintas cepas de CDV. Tomado de Woma et al., 2009.

3. OBJETIVOS

Familiarizarse con metodologías de detección y caracterización genética de un virus con genoma de RNA: Virus Distemper Canino.

Diagnosticar mediante la amplificación del gen N una muestra de campo proveniente de un can con sintomatología clínica de Distemper.

Caracterizar genéticamente una muestra de campo diagnosticada mediante el diseño de cebadores capaces de amplificar el gen H.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Muestra

Una muestra de secreción ocular utilizada en este estudio, denominada Uy109, fue tomada de un perro con síntomas clínicos presuntivos de infección por CDV, el cual no había sido vacunado (Tabla 1). Además, se utilizó una muestra de la vacuna Puppy Novibac DP (cepa Onderstepoort) que fue clonada y utilizada como control positivo en las reacciones de PCR.

Tabla 1. Ficha técnica del animal utilizado en el estudio

Tipo de muestra	Síntomas	Vacunas	Sexo	Edad	Procedencia	Año de colecta
Secreción ocular	CDV clínico	Sin vacunar	Macho	4 Meses	Canelones	05/2008

4.2 Extracción del genoma viral

La extracción del RNA viral se realizó a partir de un volumen aproximado de 100 μ L de secreción ocular mediante la técnica que utiliza el reagente TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Paralelamente se utilizó como control negativo una muestra proveniente de un animal sano sin síntomas clínicos de CDV.

4.3 Diagnóstico

Para el diagnóstico etiológico de la muestra se realizó la amplificación de un fragmento de 287pb correspondiente a la región conservada del gen N mediante RT-PCR usando los cebadores NF (Directo) y NR (Reverso) descritos por Frisk et al., 1999.

La reacción de retrotranscripción fue empleada para sintetizar DNA complementario (DNAC) a partir del RNA genómico extraído. Para la misma se utilizó el Kit “RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase” de FERMENTAS y se siguieron las instrucciones del fabricante (Anexo 1). Dado que el genoma de CDV presenta polaridad negativa, se utilizó en ésta etapa un cebador directo (NF).

La reacción de PCR fue realizada de acuerdo a las condiciones descritas en la tabla 2 y 3.

Para el diagnóstico de la muestra de campo se utilizaron distintas cantidades de DNAC (1 μ L, 3 μ L y 5 μ L) como sustrato de la reacción de PCR, mientras que se utilizó 1 μ L de

una dilución de DNA plasmídico de la muestra vacunal como control positivo y 3µL de DNAC de una muestra proveniente de un animal sano como control negativo.

Tabla 2. Reactivos de la PCR de diagnóstico

Reactivo	[]stock	[]f	Vol
Buffer	10 X	1 X	1 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0,8 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
Cebador: NF	10 uM	0,3 uM	0,5 µl
Cebador: NR	10 uM	0,3 uM	0,5 µl
Taq Polimerasa (Fermentas)	25 u	0,5 U	0,2 µl
DNAC			1-5 µl
H2O			Hasta 10 µl

Tabla 3. Condiciones de ciclado de la PCR de diagnóstico

Condiciones de ciclado:	Tiempo	Temperatura	
1° Hold	2:00	94°C	X 35 ciclos
Desnaturalización	0:30	94°C	
Hibridación	0:40	49°C	
Extensión	1:00	72°C	
2° Hold	10:00	72°	

4.4 Diseño de cebadores

En paralelo con el trabajo final de Soledad Guasco, se diseñaron cuatro cebadores capaces de amplificar el gen H completo de CDV. Estos fueron llamados: HFE- Directo externo, HFI- Directo interno, HRE- Reverso externo y HRI- Reverso interno. La combinación de los cebadores HRE y HFI permiten amplificar un fragmento de 1227 pb correspondiente a la región 5' del gen H (fragmento derecho), y la combinación de los cebadores HRI y HFE permiten amplificar un fragmento de 1038 pb correspondiente a la región 3' del gen H (fragmento izquierdo) (Figura 3).

Las secuencias empleadas en el alineamiento para el diseño de cebadores fueron obtenidas a partir de la base de datos del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) y alineadas por el método Clustal mediante el programa “BioEdit Sequence Alignment Editor”.

El cálculo de las temperaturas de meelting (Tm) y los porcentajes de contenido GC, así como la evaluación de la formación de estructuras secundarias y dimerizaciones en los cebadores diseñados, fue realizado usando la herramienta Oligo Analyzer 3.0 de Integrated DNA Technologies, Inc, © Copyright 2009, (Tabla 4).

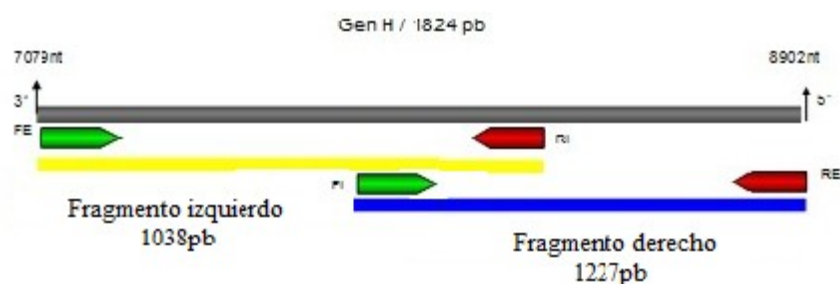


Figura 3. Esquema del gen H. Se muestra en amarillo el fragmento izquierdo de H y en azul el fragmento derecho de H con el juego de cebadores correspondiente.

Tabla 4. Se detallan las características de los cebadores diseñados

Secuencias de cebadores del gen H	Largo	Posición en genoma	Contenido GC	Temperatura de melting
HFE: Directo externo 5 'CTTAGGGCTCAGGTAGTCCAAC3'	22	7056-7077nt	54,5%	56,8 °C
HRE: Reverso externo 5 'GTCGGTAAGGGATTTCTCACCAC3'	23	8947-8969nt	52,2%	57,3 °C
HFI: Directo interno 5 'GCTATCTCAGACGGAGTGTATGG3'	23	7742-7764nt	52,2%	56,5 °C
HRI: Reverso interno -5 'GAGCGACAGGTATCACCTCTTC3'	22	8072-8093nt	54,5%	56,9 °C

4.5 Caracterización Genética

Fue puesta a punto una técnica de one-step RT-PCR mediante la utilización del kit comercial “Superscript one-step RT-PCR” de INVITROGEN, Se utilizaron los cebadores HFE-HRE para lograr amplificar el gen que codifica para la proteína

Hemaglutinina (Anexo 1). Dado que no se obtuvo amplicón del tamaño esperado (2100 nucleótidos), se procedió a realizar la reamplificación de ésta one-step utilizando los cebadores HRE-HFI para el fragmento derecho del gen H y HRI-HFE para el fragmento izquierdo del mismo (Figura 3).

Los experimentos y las condiciones del ciclado fueron estandarizados y realizados para cada fragmento por separado: Tabla 5 y 6.

Tabla 5. Condiciones de reactivos de la PCR para la reamplificación del Fragmento Derecho e Izquierdo

Reactivo	[]stock	[]f	Vol
Buffer	10 X	1 X	1 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0,8 µl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,2 µl
Cebador: HRE ó HRI	10 uM	0,3 uM	0,5 µl
Cebador: HFI ó HFE	10 uM	0,3 uM	0,5 µl
Taq Polimerasa: Fermentas	25 u	0,5 U	0,2 µl
DNAc			1 µl
H2O			Hasta 10 µl

Tabla 6. Condiciones de ciclado de la PCR para la amplificación de ambos fragmentos.

Condiciones de ciclado:	Tiempo	Temperatura	
1° Hold	2:00	94°C	X35 ciclos
Desnaturalización	0:30	94°C	
Hibridación	00:45	49°C	
Extensión	1:00	72°C	
2° Hold	05:00	72°C	

4.6 Electroforesis

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y revelado por tinción con nitrato de plata. Se utilizó buffer de carga en base a formamida y buffer TBE 1x como buffer de corrida (Anexo I).

Para la purificación del amplicón, el análisis del rastreo por PCR, la cuantificación del DNA plasmídico obtenido de las mini-preparaciones y el análisis de los productos de las reacciones de PCR de las mini-preparaciones, se realizó electroforesis en gel de agarosa

al 0,8% y tinción con bromuro de etidio. Se utilizó “Orange Loading Dye 6x” de FERMENTAS como buffer de carga y TAE 1x como buffer de corrida (Anexo I).

4.7 Purificación de amplicones

La purificación de los amplicones de interés a partir de los productos de PCR fue realizada con el kit “QIAquick Gel Extraction Kit” de QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo I).

4.8 Clonación

La clonación de los productos purificados fue realizada con el kit “GeneJet PCR Product Cloning kit” de FERMENTAS y se utilizaron para la transformación bacterias *E.coli XL-1 Blue* competentes. Se realizaron las reacciones de ligación y transformación siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo I).

Los transformantes fueron incubados en 300 µl de medio líquido SOC, en shaker durante 90 minutos a 37°C (Anexo I). Los plaqueos de estos cultivos se realizaron en placas de petri conteniendo medio sólido LB-agar-ampicilina (Anexo I).

El vector plasmídico contiene un gen de resistencia a ampicilina y un gen, denominado “killer”, cuyo producto es letal para la bacteria cuando no es interrumpido.

Al albergar un inserto, el gen “killer” es interrumpido y su producto no es funcional. Aquellas bacterias que no adquirieron el plásmido no pudieron desarrollarse en un medio con ampicilina, mientras que las que transformaron con un plásmido sin inserto, expresaron el producto del gen “killer” y tampoco pudieron crecer. De esta forma, cualquier colonia que se observó debía contener al vector con un inserto.

Los análisis de las colonias obtenidas se realizaron en forma directa mediante PCR.

4.9 Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó por medio de mini-preparaciones, mediante el uso del kit comercial “GeneJet Plasmid Miniprep kit” de FERMENTAS. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Anexo I).

4.10 Secuenciación

Los DNA plasmídicos que presentaron el inserto deseado, fueron secuenciados en forma automática, utilizando los cebadores del vector, “Directo” (pJet F) y “Reverso” (pJet R) que flanquean el sitio de policlonado. La secuenciación automática se realizó en el Instituto Pasteur de Montevideo con el equipo ABI prism 377-Perkin Elmer.

4.11 Análisis de secuencias

El ensamblaje y la edición de las secuencias obtenidas del gen H se realizó con el programa “SeqMan NGen (SNG) - v1.2” (© 2008 DNASTAR, Inc.). Para confirmar su identidad, se utilizó el algoritmo Blast de la base de datos del NCBI.

Las secuencias nucleótídicas y aminoacídicas fueron alineadas usando el método ClustalW del programa “MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.1” (Tamura et al. 2007). En el alineamiento nucleotídico se incluyeron además las dos cepas uruguayas previamente caracterizadas, la cepa vacunal Onderstepoort, dos cepas de Argentina y cuatro cepas de Brasil publicadas en la base de datos que hasta la fecha no fueron analizadas, así como cepas representativas de los diferentes linajes de CDV caracterizados en el mundo (Tabla 7).

El cladograma fue inferido por el método Neighbor-Joining, usando el modelo de sustitución nucleotídica “p-distance, utilizando el programa “MEGA4.1” (Tamura, et al. 2007).

El soporte estadístico de los cluster fue estimado mediante bootstrap con 1000 pseudoréplicas.

Tabla 7. Secuencias de cepas de CDV de diversos linajes representativos de todo el mundo empleadas en los alineamientos para la reconstrucción filogenética

Nombre de la cepa	Nro de acceso	Año de aislamiento	País	Linaje	Animal
Arg23	FJ392652	2003	Argentina	Sin clasificar	Perro
Arg24	FJ392651	2005	Argentina	Sin clasificar	Perro
CDVBR1	EU098102	2007	Brasil	Sin clasificar	Perro
CDVBR2	EU098103	2007	Brasil	Sin clasificar	Perro
CDVBR3	EU098104	2007	Brasil	Sin clasificar	Perro
CDVBR4	EU098105	2007	Brasil	Sin clasificar	Perro
P94S	AB212964	2006	Japón	Asia 1	Perro
Canine/NTU 4-2003	DQ191767	2005	Taiwan	Asia 1	Perro
DK91 D	AF478550	2004	Dinamarca	Europa	Perro
Hamamatsu strain	D85754	2003	Japón	Asia 1	Perro
A75/17	AF164967	1999	USA	America 2	Perro
4513	Z77673	1997	Alemania	Europa	Perro
American dog	Z47762	1997	USA	America 2	Perro
black leopard	Z47763	1997	USA	America 2	Leopardo
javelina	Z47764	1997	USA	America 2	Jabalí
Danish dog	Z47761	1997	Dinamarca	Europa	Perro
Danish mink	Z47759	1997	Dinamarca	Europa wl	Visón
98-2666-1	AY548110	2004	USA	America 1	Mapache
Snyder Hill	AF259552	2000	Alemania	America 1	Perro
179/94	DQ226087	2006	Italia	Artico	Perro
48/05	DQ226088	2006	Italia	Artico	Perro
lesser panda	AF178039	1999	China	America 2	Panda
Giant panda	AF178038	1999	China	Asia 1	Panda gigante
2544	Z77672	1997	Alemania	Europa	Perro
324/03	DQ494317	2008	Italia	Europa	Perro
H04Bp1F	DQ889177	2007	Hungría	Europa	Perro
H06Ny12	DQ889188	2007	Hungría	Europa wl	Perro
207/00	DQ228166	2006	Italia	Europa wl	Perro
26D	AB040766	2002	Japón	Asia 2	Perro
HM-6	AB040768	2002	Japón	Asia 2	Perro
HM-3	AB040767	2002	Japón	Asia 2	Perro
4L70247	FJ461697	2010	Sudáfrica	Sudafrica	Perro
4SP	FJ461715	2010	Sudáfrica	Sudafrica	Perro
6L	FJ461703	2010	Sudáfrica	Sudafrica	Perro
10L	FJ461705	2010	Sudáfrica	Sudafrica	Perro
23SP	FJ461723	2010	Sudáfrica	Sudafrica	Perro
Onderstepoort	AF378705	2002	USA	America 1	Vacuna
Convac vaccine strain	Z35493	1994	USA	America 1	Vacuna
PDV/DK88-1a	AF479277	2004	Dinamarca		Phocine distemper virus

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico mediante RT-PCR

En este estudio realizamos el diagnóstico de una muestra de secreción ocular perteneciente a un perro con sintomatología clínica de Distemper. Tras la extracción del RNA viral y posterior reacción de RT-PCR, determinamos la presencia del genoma viral en la muestra Uy109 obteniendo el amplicón de 287pb del gen N esperado (Figura 4).

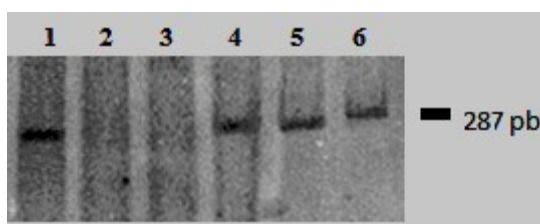


Figura 4. Gel de poliacrilamida al 6 %. Carril 1: 1 μ L dil 1/100 Control positivo Carril 2: Blanco de PCR, Carril 3: 3 μ L DNAc control negativo, Carril 4: 1 μ L DNAc Uy109, Carril 5: 3 μ L DNAc Uy109, Carril 6: 5 μ L DNAc Uy109.

Caracterización

5.2 Obtención del gen H

El RNA extraído de la muestra Uy109 fue sometido a una reacción de one-step RT-PCR usando diferentes cantidades de cDNA molde. Dado que no se obtuvo el amplicón del tamaño esperado (2100 pb) se realizó una reamplificación con los cebadores capaces de amplificar el gen H en dos fragmentos. Tras la reacción se obtuvieron los dos fragmentos (derecho e izquierdo) del peso molecular esperado (Figura 5).

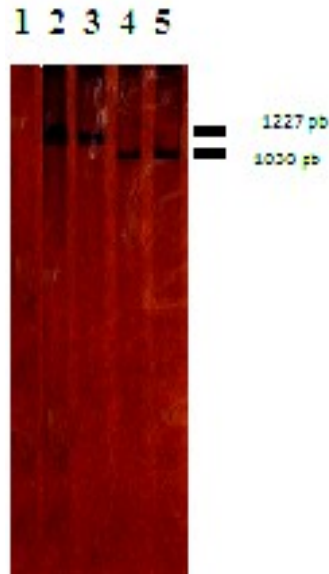


Figura 5. Gel de poliacrilamida al 6 % correspondiente a la reamplificación del fragmento derecho e izquierdo de Uy109 Carril 1: Blanco de PCR. Carril 2: Control positivo fragmento derecho, Carril 3: 1 μ L de DNAC del fragmento derecho de Uy109, Carril 4: Control positivo fragmento izquierdo, Carril 5: 1 μ L de DNAC del fragmento izquierdo de Uy109.

Los amplicones obtenidos, tanto del fragmento derecho como del fragmento izquierdo fueron clonados. Previo a la clonación fue preciso obtener una mayor cantidad de producto de PCR para cada uno de los fragmentos para alcanzar la relación molar inserto: vector recomendado como óptimo. Con el fin de optimizar la ligación del o los insertos deseados, los amplicones fueron purificados, partiendo del recorte de bandas en gel de agarosa utilizando el kit “QIAquick Gel Extraction Kit” de QIAGEN (Figura 6).

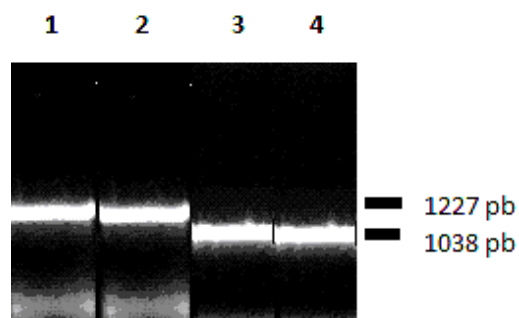


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % tinción con Bromuro de Etidio. Carril 1: Concentrado de productos de PCR del fragmento derecho de Uy109, Carril 2: Control de peso fragmento derecho. Carril 3: Concentrado de productos de PCR del fragmento izquierdo de Uy109, Carril 4: Control de peso fragmento izquierdo.

Una vez realizada la elución de cada fragmento de DNA, los productos fueron concentrados a 5.5 µl y luego 0,5 µl fueron analizados por electroforesis en gel de poliacrilamida para evaluar la eficiencia de la elución (dato no mostrado).

A continuación, se procedió a la clonación de ambos fragmentos y posterior análisis de colonias obtenidas.

La detección de las colonias que contenían el inserto de interés se realizó mediante un rastreo por PCR con los cebadores específicos para cada uno de los insertos. En ellos se utilizaron las condiciones anteriormente descritas, con la diferencia de una etapa de desnaturalización inicial de 5 minutos.

Los productos de estos ensayos fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa confirmando la presencia de ambos fragmentos, derecho e izquierdo (Figura 7 y 8).

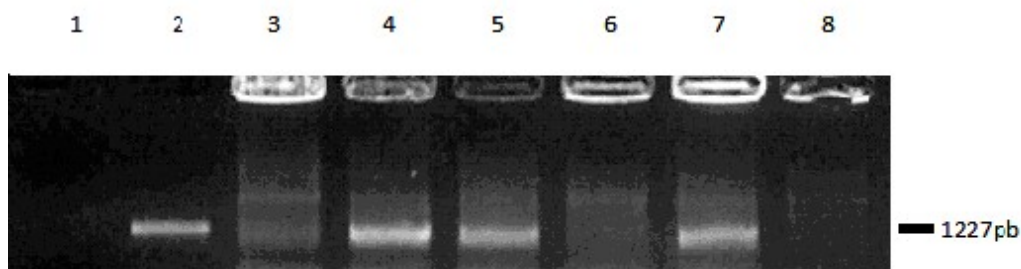


Figura 7. Electroforesis en gel de Agarosa 0,8% tinción bromuro de etidio. Productos de rastreo por PCR de colonias del fragmento derecho de Uy109. Carril 1: blanco, Carril 2: control de peso fragmento derecho, Carril 3: colonia 3, Carril 4: colonia 4, Carril 5: colonia 5, Carril 6: colonia 6, Carril 7: colonia 7, Carril 8: colonia 8.

Se confirmó la presencia del inserto en las colonias 4, 5, y 7 del fragmento derecho de Uy109.

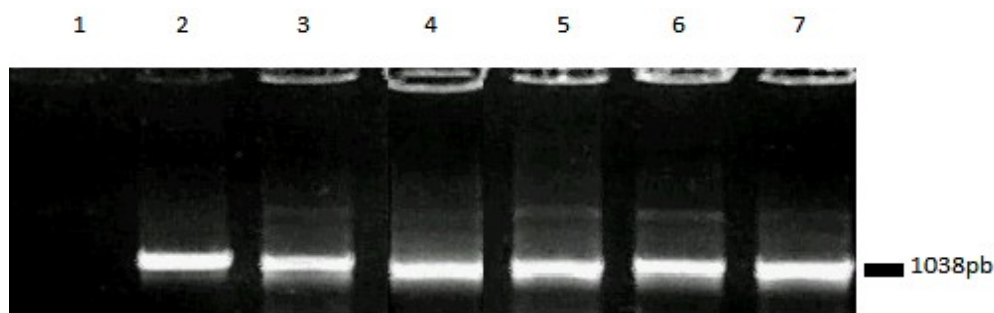


Figura 8. Electroforesis en gel de Agarosa 0,8% tinción bromuro de etidio. Productos de rastreo por PCR de colonias del fragmento izquierdo de Uy109. Carril 1: blanco, Carril 2: control de peso fragmento izquierdo, Carril 3: colonia 1, Carril 4: colonia 2, Carril 5: colonia 3, Carril 6: colonia 5, Carril 7: control positivo fragmento izquierdo (vacuna).

Se confirmó la presencia del inserto en las colonias 1, 2, 3, y 5 del fragmento izquierdo de Uy109.

Una vez identificadas las colonias que poseían el inserto deseado, se procedió a extraer el DNA plasmídico. Fueron seleccionadas para ello las colonias 4, 5 y 7 correspondientes al fragmento derecho de Uy109 y las colonias 2, 3 y 5 correspondientes al fragmento izquierdo de Uy109.

A continuación se realizó una reacción de PCR utilizando 1µl de una dilución 1/10 como molde de los productos de minipreparaciones a modo de confirmar la presencia del fragmento de interés. Para esta reacción se utilizaron las mismas condiciones anteriormente descritas para ambos fragmentos. Los resultados de dicha reacción pueden observarse en la Figura 9.

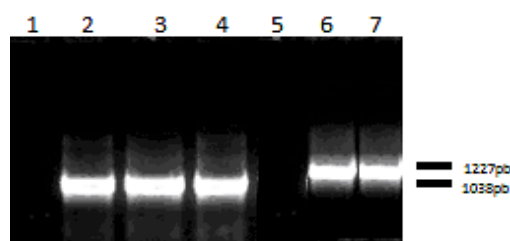


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% tinción bromuro de etidio. Productos de la reacción de PCR sobre los DNA plasmídicos extraídos en la mini-preparación. Carril 1: Blanco de PCR fragmento izquierdo; Carril 2: 1 µl dilución 1/10 de DNA plasmídico, colonia 3 fragmento izquierdo; Carril 3: 1 µl dilución 1/10 de DNA plasmídico, colonia 5 fragmento izquierdo; Carril 4: Control positivo de PCR, 0,5 µL dilución 1/10 de DNA plasmídico del clon del fragmento izquierdo proveniente de la muestra vacunal, Carril 5: Blanco de PCR fragmento derecho; Carril 6: 1 µl dilución 1/10 de DNA plasmídico, colonia 4 fragmento derecho. Carril 7: Control positivo de PCR, 0,5 µL dilución 1/10 de DNA plasmídico del clon del fragmento derecho proveniente de la muestra vacunal.

Dado los resultados obtenidos, se mandaron a secuenciar con cebadores R (Reverso) y F (Directo) del vector las colonias 3 y 5 correspondientes al fragmento izquierdo de Uy109, y la colonia 4 y 5 correspondiente al fragmento derecho de la misma.

Luego de obtenidas estas secuencias, se confirmó su identidad utilizando el algoritmo Blast de la base de datos del NCBI.

Posteriormente ambos fragmentos fueron ensamblados y se obtuvo la secuencia completa del gen H que consta de 1824 nucleótidos y su correspondiente proteína putativa de 607aa.

5.3 Comparación del gen H de Uy109 con las cepas Uruguayas

El alineamiento nucleotídico de Uy109 con las cepas uruguayas previamente caracterizadas CDV102 y CDV111 reveló la presencia de 15 sitios variables con 10 transiciones y 5 transversiones (Figura 10). A nivel de la secuencia aminoacídica se observaron 7 cambios en comparación con CDV102 y CDV111 (Figura 11), y el análisis de distancia (aminoacide p-distance), revela un 1% de diferencias aminoacídicas entre todas ellas (Figura 12).

5.4 Comparación de la proteína H de Uy109 con cepa vacunal

El alineamiento aminoacídico de Uy109 con la cepa vacunal Onderstepoort, reveló 48 cambios (Figura 11) y el análisis de distancia (aminoacide p-distance) aproximadamente un 8% de divergencia aminoacídica. (Figura 12).

24

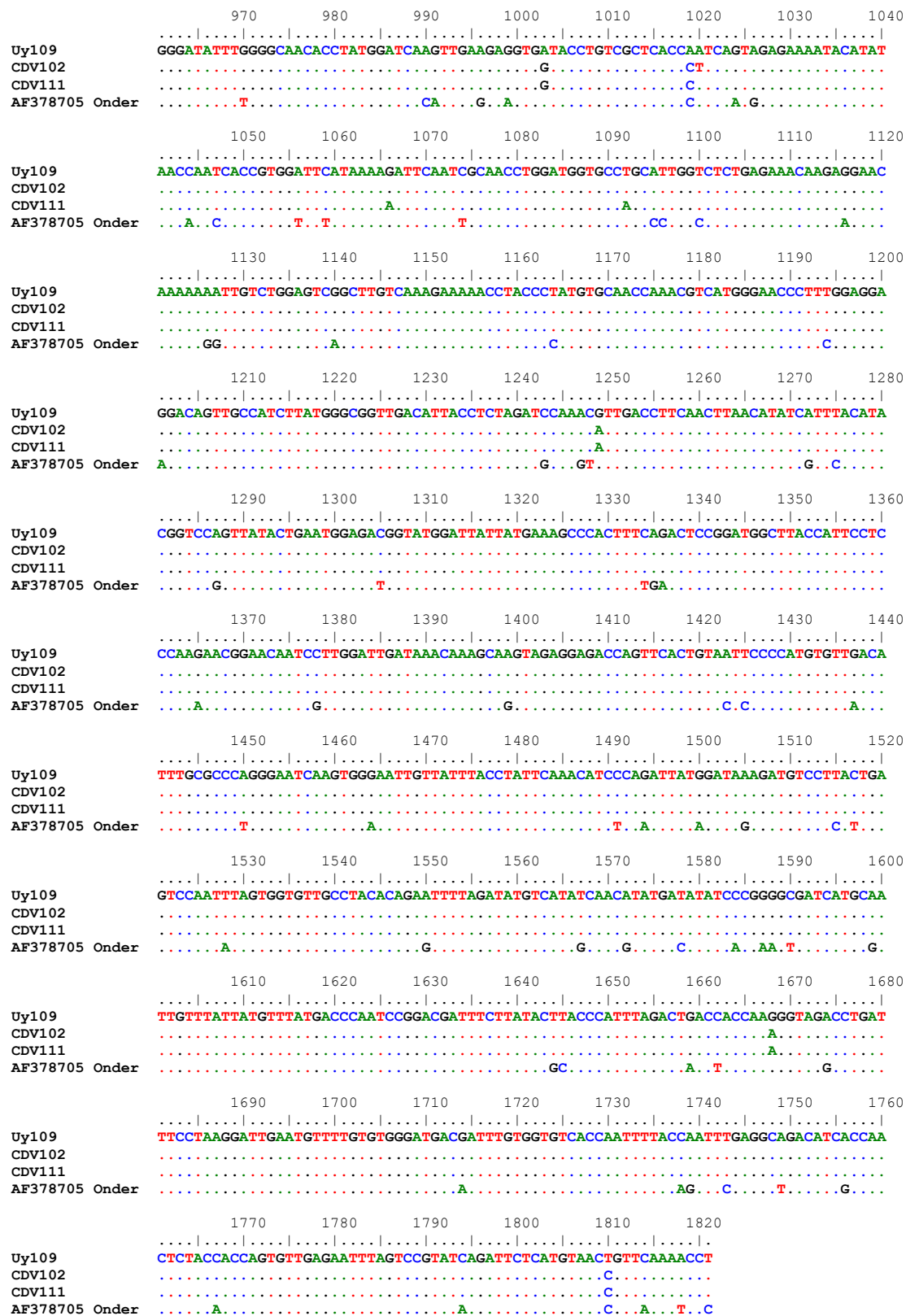


Figura 10. Alineamiento de la secuencia nucleotídica del gen H de la cepa vacunal Onderstepoort con la secuencias de las cepas Uruguayas Uy109, CDV102 y CDV111.

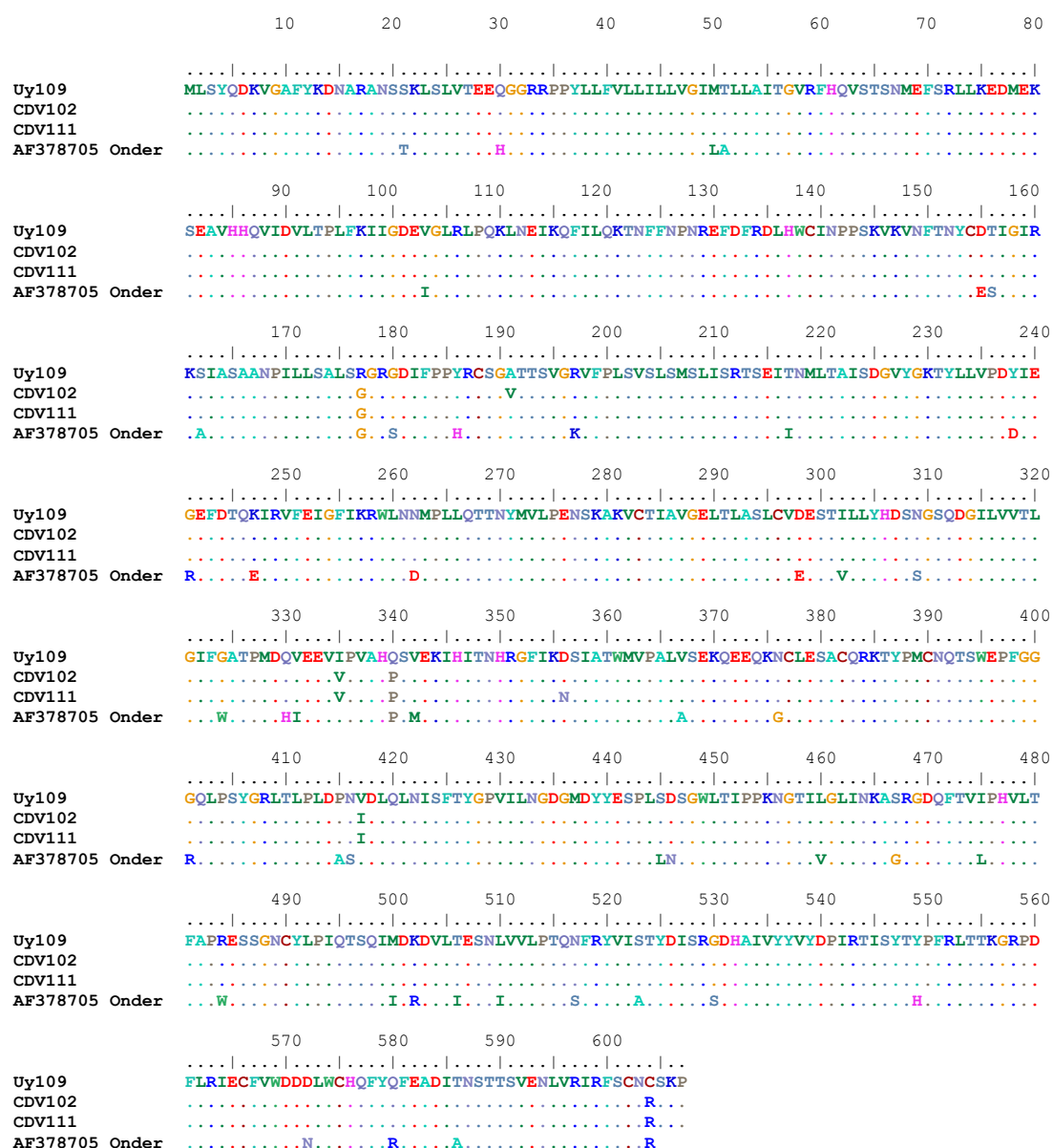


Figura 11. Alineamiento de la secuencia aminoacídica del gen H de la cepa vacunal Onderstepoort con la secuencias de las cepas Uruguayas Uy109, CDV102 y CDV111.

	1	2	3
1. CDV102			
2. Uy 109	0.010		
3. CDV111	0.003	0.010	
4. AF378705 Onderstepoort	0.081	0.081	0.081

Figura 12. Análisis de distancia (aminoacide p-distance) de H de la cepa vacunal Onderstepoort con las cepas Uruguayas Uy109, CDV102 y CDV111.

5.5 Análisis filogenético

El análisis filogenético utilizando todas las cepas caracterizadas en Sudamérica y las cepas referenciales de los diferentes linajes de CDV caracterizados, reveló que las tres cepas uruguayas se agrupan juntas con un apoyo estadístico del 100%. A su vez, éstas se agrupan con todas las representantes brasileras con un 97% de apoyo y con sólo una de las representantes argentinas (Arg23 FJ392652) con un 82% de apoyo estadístico. Todo este cluster sudamericano (al que denominamos SA-1), se agrupa con las cepas del linaje europeo con un 100% de apoyo estadístico (Figura 13). El análisis de distancia (aminoacide p-distance) indicó que las cepas del grupo SA1 presentaron valores de divergencia aminoacídica menores al 4% con respecto a las cepas del linaje europeo y superiores a éste con respecto a los demás linajes.

La otra cepa representante de Sudamérica proveniente de Argentina (Arg24 FJ392651) queda formando otro clado aparte de las cepas sudamericanas y del resto de los linajes caracterizados en el mundo; aunque se agrupa con un bajo soporte (47%) con las cepas del linaje Europa-wildlife. El análisis de distancia mostró valores de divergencia aminoacídica superiores al 4% con respecto a todos los linajes caracterizados. A éste grupo lo denominamos SA-2 (Figura 13).

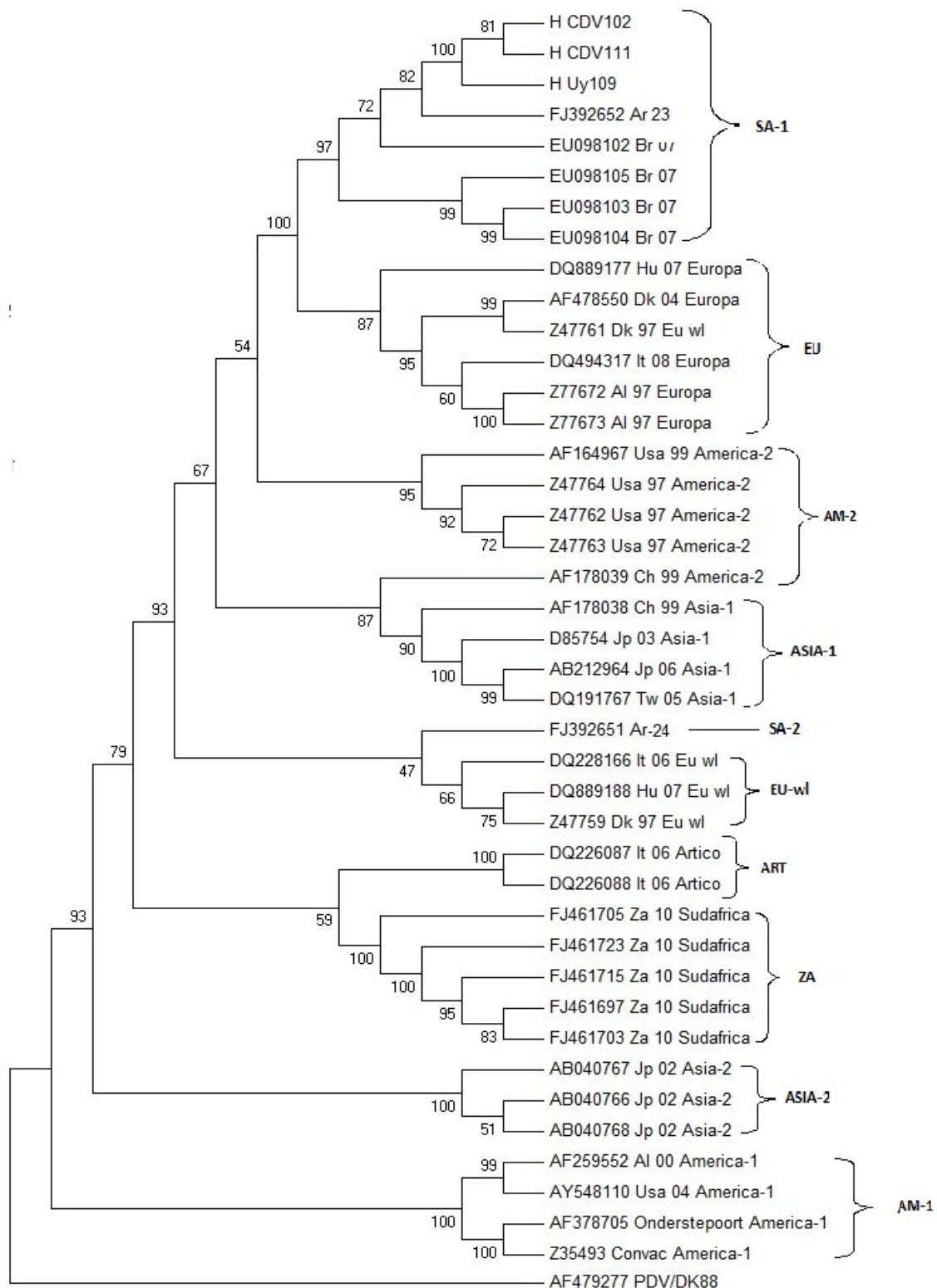


Figura 13. Cladograma en base a las secuencias nucleotídicas del gen H de cepas de CDV. Las cepas representantes de cada linaje están listadas en la Tabla 7. El cladograma fue inferido usando el método p-distancia (0.05) del programa MEGA 4.1. La significancia estadística de la filogenia fue estimada mediante bootstrap 1000 réplicas. La cepa Phocine Distemper Virus (PDV) fue utilizada como grupo externo.

6. DISCUSIÓN

6.1 Diagnóstico

En el marco de mi pasantía de fin de carrera y con el fin de familiarizarme con metodologías de detección y caracterización genética usando como modelo un virus RNA simple hebra realizamos el diagnóstico mediante RT-PCR en una muestra de secreción ocular procedente de un animal con sintomatología clínica asociada a Distemper. De ésta forma confirmamos la presencia del genoma viral, lo que nos permitió una posterior caracterización de la cepa implicada.

En cuanto al diagnóstico son muy pocos los registros existentes en los cuales se utiliza este tipo de muestra como punto de partida (Elia et al., 2006., Kim et al., 2006) a pesar de que la secreción ocular es fácil de coleccionar, procesar y almacenar y resulta ser no invasiva para el animal en comparación con otros fluidos (Gebara et al., 2004). A su vez, mediante RT-PCR a tiempo real se ha revelado que éste tipo de muestras presenta elevados títulos virales (Elia et al., 2006), lo que simplifica su detección y la convierte en una muestra idónea para realizar estudios de diagnóstico.

El método molecular utilizado, además de permitir un diagnóstico *ante-mortem* rápido con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Frisk et al., 1999; Kim et al., 2001; Gebara et al., 2004; Saito et al., 2006), relevante para mantener planes de vigilancia, nos permite la caracterización genética de las cepas de campo circulantes en el país.

6.2 Caracterización genética

El gen H que codifica para la proteína Hemaglutinina presenta una elevada variabilidad genética dentro de las cepas de CDV, por ello su análisis ha sido utilizado para caracterizar los diferentes genotipos circulantes en el mundo (Haas et al., 1997; Pardo et al., 2005; Martella et al., 2006; Calderon et al., 2007; An et al., 2008). En este estudio hemos logrado la caracterización genética de una nueva muestra, Uy109, mediante la obtención de la secuencia completa del gen H (1824 pb) por One Step RT-PCR y posterior reamplificación utilizando cebadores específicos diseñados en nuestro laboratorio. Este estudio en conjunción con estudios previos de caracterización genética, hacen un total de tres cepas caracterizadas en Uruguay hasta la fecha (Bonilla, 2008, Tesina de grado y Guasco, 2010, Tesina de grado).

La comparación de las tres cepas caracterizadas indica elevados porcentajes de identidad aminoacídica (del orden 99% a 99,7%), sugiriendo la existencia de una cepa

de CDV predominante en canes uruguayos. Sin embargo, el número de muestras con las que contamos es limitado y proceden de una región restringida dado que pertenecen al departamento de Canelones y Montevideo. Sería conveniente por tanto el análisis de un mayor número de muestras que abarquen una mayor distribución geográfica para asegurar la presencia de una cepa mayoritaria en el país.

6.3 Comparación del gen H de Uy109 con la cepa vacunal

Durante muchos años Distemper ha sido controlado mediante el uso de vacunas con virus vivos atenuados, (Appel & Summers, 1995, 1999). Sin embargo, en años recientes se ha observado un resurgimiento de la enfermedad y se han registrado numerosos brotes infecciosos en poblaciones de cánidos vacunados en diversas partes del mundo, e incluso en la región (Ek-Kommonen et al., 1997; Calderón et al., 2007; Takayama et al., 2008). En nuestro laboratorio hemos detectado el genoma viral en muestras de canes vacunados (Sarute et al., 2011 en revisión). Cuando comparamos la secuencia aminoacídica de la proteína putativa H de las muestras de campo uruguayas con la cepa vacunal (Onderstepoort), que es una de las más utilizadas en nuestra región, nos encontramos con elevados valores de divergencias del orden del 8%. Estos resultados son consistentes con los datos presentados en numerosos estudios que muestran una marcada divergencia (hasta de un 10%) de las cepas de campo circulantes en la actualidad con respecto a las utilizadas comúnmente en las vacunas (Bolt et al., 1997; Iwatsuki et al., 1997; Haas et al., 1999; Martella et al., 2006). Esta marcada divergencia podría hacer que animales vacunados contra CDV presenten bajos niveles de protección y así puedan desarrollar la patología, aunque hasta la fecha no hay datos que prueben la no eficiencia de las vacunas (Demeter et al., 2009). Sin embargo, creemos que esta divergencia resulta preocupante y debería ser considerada a la hora de la elaboración de vacunas y el desarrollo de nuevos planes de inmunización.

6.4 Análisis filogenético

El análisis filogenético reveló que la cepa caracterizada en el presente trabajo se agrupa con un elevado valor de bootstrap con las otras dos cepas uruguayas caracterizadas (Bonilla, 2008; Guasco, 2010) y la mayoría de las cepas caracterizadas en Sudamérica (cuatro de Brasil y una de Argentina), constituyendo un grupo al cual denominamos SA1. A su vez este grupo forma un único clado con un 100% de apoyo estadístico con las cepas pertenecientes al linaje europeo. El análisis de distancia (aminoacide p-

distance) indica que las cepas del grupo SA1 presentan valores de divergencia aminoacídica menores al 4% con respecto a las cepas del linaje europeo, lo que indica que forman parte del mismo linaje según el criterio aceptado para CDV (Bolt et al., 1997). Podemos decir por tanto que la mayoría de las cepas sudamericanas (grupo SA-1) como las cepas del linaje europeo son parte del mismo linaje. Esta inclusión de cepas sudamericanas, todas ellas provenientes de países limítrofes en el linaje europeo constituye una de las pocas excepciones de alteración entre la distribución geográfica y un linaje (Martella et al., 2006; Pardo et al., 2005). El movimiento de animales receptivos (tráfico), así como la importación de especies exóticas y la pérdida de barreras geográficas pueden estar influyendo en la dispersión de las distintas cepas de CDV y la existencia de flujo génico entre ambos continentes (Kim et al., 2001).

La otra cepa sudamericana que pertenece a Argentina (Arg-24 FJ392651), forma parte de un clado diferente al que denominamos grupo SA-2.

En un estudio realizado por Calderón y colaboradores se analizó una región de 871pb del gen H. En el mismo se observó que 23 de los 24 aislamientos (siendo uno de los 23 Arg-24) se agrupan juntos en el linaje que aquí denominamos SA-2. Este sería exclusivo del continente Americano y mayoritario de Argentina.

Por tanto en Sudamérica co-circulan al menos dos linajes diferentes.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La metodología de diagnóstico molecular implementada en nuestro laboratorio nos permite un diagnóstico *ante-mortem* rápido, sensible y específico.

La caracterización genética en base a la secuencia nucleotídica del gen H de una nueva muestra clínica reveló un elevado porcentaje de identidad entre las tres cepas caracterizadas en Uruguay, lo que sugiere la existencia de una cepa de campo predominante de CDV en el país.

La comparación con la cepa vacunal reveló una gran divergencia del orden de un 8%, lo cual debería ser tomado en cuenta a la hora de la elaboración de las vacunas y el desarrollo de planes de inmunización.

En Sudamérica co-circulan dos linajes, uno perteneciente al linaje europeo y el otro exclusivo de éste continente.

Si bien los datos aquí reportados contribuyen a la caracterización genética de las cepas de CDV circulantes, es conveniente ampliar el número de muestras a analizar con el fin de continuar con los planes de vigilancia y así lograr un mejor entendimiento de la epidemiología de la enfermedad en la región.

8. BIBLIOGRAFÍA

- An D.J., Yoon S.H., Park J.Y., No I.S., Park B.K.** 2008. Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet. Microbiol.* **132**, 389-395.
- Appel M.J.** 1987. Canine Distemper Virus in Virus infection of Carnivores. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 133-159.
- Appel M.J., Yates R.A., Foley G.L., Bernstein J.J., Santinelli S., Spelman L.H., Miller L.D., Arp L.H., Anderson M., Barr M., Pearce-Kelling S., Summers B.A.** 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**, 277-288.
- Appel M.J. & Summers B.A.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* **44**, 187-191.
- Appel M.J. & Summers B.A.** 1999. Canine Distemper: Current Status. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, L.E. Carmichael (Ed.), 23 Nov 1999. Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org)
- Bolt G., Jensen T.D., Gottschalck E., Arctander P., Appel M.J., Buckland R., Blixenkrone-Møller M.** 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J. Gen. Virol.* **78**, 367-372.
- Bonilla, B.** 2008. Caracterización genética del Virus Distemper Canino en Uruguay mediante el análisis del gen de la proteína Hemaglutinina. Tesina de Grado.
- Calderon, M. G., Remorini P., Periolo O., Iglesias M., Mattion N., 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.
- Carpenter M.A., Appel M.J., Roelke-Parker M.E., Munson L., Hofer H., East M., O'Brien S.J.** 1998. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **65**, 259-66.
- Demeter Z., Palade E.A., Hornyák Á., Rusvai M.** 2009. Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet. Microbiol.* **142**, 420-426.
- Diallo A.** 1990. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.* **23**, 155-163.
- 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.S., Lorusso E., Di Trani L., Buonavoglia C.** 2006 Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*. **136**, 171-6.
- Frisk A.L., Konig M., Moritz A., Baumgartner W.** 1999. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluids from Dogs with Distemper. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3634-3643.
- 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
- Grachev M.A., Kumarev V.P., Mamaev L.V., Zorin V.L., Baranova L.V., Denikina N.N., Belikov S.I., Petrov E.A., Kolesnik V.S., Kolesnik R.S., Dorofeev V.M., Beim A.M., Kudelin V.N., Nagieva F.G., Sidorov V.N.** 1989. Distemper virus in Baikal seals. *Nature* **338**, 209–210.
- Griffin D.E.** 2007. Measles Virus. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1552–1585.
- Guasco, S.** 2010. Caracterización genética del Virus Distemper Canino en Uruguay. Tesina de Grado.
- Haas L., Martens W., Greiser-Wilke I., Mamaev L., Butina T., Maack D., Barrett T.** 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.* **48**, 165–171.
- Haas L., Liermann H., Harder T.C., Barrett T., Löchelt M., von Messling V., Baumgärtner W., Greiser-Wilke I.** 1999. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.* **69**, 15-8.
- Harder T.C. & Osterhaus A.D.** 1997. Canine distemper virus: a morbillivirus in search of new hosts?. *Trends Microbiol.* **5**, 120–124.
- Iwatsuki K., Miyashita N., Yoshida E., Gemma T., Shin YS., 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. Virol.* **78**, 373-380.

- Kennedy S., Kuiken T., Jepson P.D., Deaville R., Forsyth M., Barrett T., van de Bildt MWG., Osterhaus ADME., Eybatov T., Duck C., Kydyrmanov A., Mitrofanov I., Wilson S.** 2000. Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg. Infect. Dis.* **6**, 637–639.
- Kim Y.H., Cho K.W., Youn H.Y., Yoo H.S., Han H.R.** 2001. Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J. Vet. Sci.* **2**, 59-63.
- Kim, D., Jeoung, S., Ahn, S., Lee, J., Pak, S., Kwon, H.** 2006. Comparison of Tissue and Fluid Samples for the Early Detection of Canine Distemper Virus in Experimentally Infected Dogs. *J. Vet. Sci.* **68**, 877-879.
- Kuiken T., Kennedy S., Barrett T., Van de Bildt M.W., Borgsteede F.H., Brew S.D., Codd G.A., Duck C., Deaville R., Eybatov T., Forsyth M.A., Foster G., Jepson P.D., Kydyrmanov A., Mitrofanov I., Ward C.J., Wilson S., Osterhaus A.D.** 2006. The 2000 canine distemper epidemic in Caspian seals (*Phoca caspica*): pathology and analysis of contributory factors. *Vet. Pathol.* **43**, 321–338.
- Lamb R.A. & Parks G.D.** 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp. 1450–1496.
- Martella V., Cirone F., Elia G., Lorusso E., Decaro N., Campolo M., Desario C., Lucente M.S., Bellacicco A.L., Blixenkrone-Moller M., Carmichael L.E., Buonavoglia C.** 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* **116**, 301-309.
- Martella V., Elia G., Buonavoglia C.** 2008. Canine distemper virus. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* **38**, 787-797.
- 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.
- Pardo I.D., 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.
- Saito T.B., Alfieri A.A., Wosiacki S.R., Negrão F.J., Morais H.S., 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. *J. Vet. Sci.* **80**,116-119.

Sarute, N. 2008. Diagnóstico y caracterización genética del virus Distemper canino en Uruguay a través del análisis de un fragmento del gen de la proteína de la nucleocápside. Tesina de Grado.

Sarute, N., Perez, R., Francia, L., Henández, 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. En revisión.

Takayama I., Kubo M., Takenaka A., Fujita K., Sugiyama T., Arai T., Yoneda M., Sato H., Yanai T., Kai C. 2008. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild masked palm civets in Japan. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.***32**, 539-549.

Van Regenmortel, H.V.M., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E., Estes, M.K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D., Pringle, C.R., Wickner, R.B. 2000. Virus taxonomy. *Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York, NY.

Woma T.Y., Van vuuren M., Bosman A., 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**, 126-132.

9. ANEXO DIAGNÓSTICO

Extracción de RNA viral

Agregar 1 mL de TRIzol a la muestra de secreción ocular Uy109.

Mezclar con vortex la muestra para homogeneizar.

Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (15 a 30°C).

Agregar 200µL de cloroformo.

Homogeneizar por 15 segundos.

Incubar durante de 2 o 3 minutos a temperatura ambiente (15 a 30°C).

Centrifugar durante 15 minutos a 14.000 rpm en centrífuga refrigerada de 2 a 8°C, en éste caso se realizó a 4°C.

Se observan 2 fases. Transferir la fase acuosa a otro tubo.

Precipitación: agregar 500µL de isopropanol.

Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15 a 30°C).

Centrifugar durante 15 minutos a 14.000 rpm en centrífuga refrigerada (4°C).

-Lavados: Remover el sobrenadante.

Agregar 500µL de etanol 70%.

Centrifugar durante 15 minutos a 14.000 rpm en centrífuga refrigerada (4°C).

Resuspender la muestra Uy109 en 20 µL.

Conservar el ARN a -80°C.

Retrotranscripción

Kit “RevertAid M-MulV Reverse Transcriptase” de FERMENTAS

Colocar 10 µl de RNA en un tubo de 0,2 ml.

Agregar 2 µl de cebador 10 µM. En nuestro caso el cebador utilizado fue el directo NF.

Incubar a 70 °C durante 5 minutos.

Incubar en hielo durante 2 minutos.

Agregar 4 µl de Buffer de Reacción, 5 x.

Agregar 2 µl de dNTPs, 10 mM.

Agregar 1 µl de Ribolock™ (Inhibidor de RNAsa).

Incubar a 37 °C durante 5 minutos.

Agregar 1 µl de RevertAid™ M-Mulv RT, 2 U/µl.

Incubar a 42 °C durante 60 minutos.

Incubar a 70 °C durante 10 minutos.

Almacenar a -20 °C.

ANEXO CARACTERIZACIÓN

One-step RT PCR - Amplificación

Kit “Superscript one-step RT-PCR with Platinum Taq” de INVITROGEN

RT- Síntesis de DNAc

Ciclado:	Tiempo	Temperatura
1 ciclo	30:00	50°C
1 ciclo	2:00	94°C

PCR

Condiciones de ciclado:	Tiempo	Temperatura	
Desnaturalización	0:15	94°C	X40 ciclos
Hibridación	0:30	57°C	
Extensión	2:50	72°C	
2° Hold	10:00	72°	

Gen entero H

2X Mezcla de reacción	25 µl
RNA	0,5 µl
Cebador HFE	1 µl
Cebador HRE	1 µl
RT/Taq Mezcla	1 µl
H2O	21,5µl
Vf	50 µl

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Composición del gel (8 ml):

1,6 ml de solución de poliacrilamida 6 % (Acrilamida 30 %/ Bisacrilamida 0,8 %), 1,6 ml de TBE 1 x, 4,8ml de agua destilada.

Adicionar 80 µl de APS 10% (Persulfato amónico, $S_2O_8(NH_4)_2$).

Adicionar 8 µl de TEMED (Tetrametilen, etilen diamina; $(CH_3)_2CHNHCH(CH_3)_2$).

Permitir polimerizar durante 30 a 40 minutos.

Las muestras fueron preparadas con buffer de carga con Formamida 98 %, y se utilizó TBE 1x como buffer de corrida.

Composición del buffer de carga, Formamida 98 %:

Formamida 10 ml.

Azul de bromofenol 10 mg.

Xylene Cyanol FF 10 mg.

EDTA de 0.5 M, pH 8.0, 200 µl.

El buffer de carga utilizado contiene dos frentes de corrida, Azul de bromofenol y Xylene Cyanol FF, los cuales, en gel de poliacrilamida 6 %, co-migran con fragmentos de DNA de 55 y 250 pb respectivamente.

Los ensayos de electroforesis fueron realizados a 90 Volts y 110 mA.

Revelado del gel:

El revelado del gel se realizó por medio de una tinción con nitrato de plata:

Colocar el gel en fijador en agitación durante al menos 10 minutos.

Composición del fijador (100 ml):

Etanol absoluto, 13,3 ml.

Ácido acético, 500 µl.

Agua destilada miliQ, 86,2 ml.

Trasladar el gel a un recipiente con una solución de nitrato de plata (0,2 g de nitrato de plata en 100 ml de agua destilada miliQ).

Agitar durante 10 minutos.

Retirar de la solución de nitrato de plata y realizar dos lavados breves con agua destilada miliQ.

Verter el revelador y agitar aproximadamente 5 minutos hasta completar el revelado.

Composición del revelador (100 ml):

NaOH, 3 g.

Formaldehído, 500 µl.

Agua destilada miliQ, 99,5 ml.

Retirar del revelador y colocar en fijador durante al menos 2 horas.

Composición del buffer TBE 5 x (500 ml):

27 g de Tris base.

13,75 g de ácido bórico.

10 ml de EDTA, 0,5 M, pH= 8,0.

Completar con agua miliQ.

Preparación de la solución de poliacrilamida (100 ml):

Pesar en vaso de bohemia, 30 g de acrilamida.

Adicionar 0,8 g de N, N'-metilbisacrilamida.

Agregar 60 ml de agua destilada miliQ.

Calentar a 37 °C hasta disolver.

Transferir a probeta.

Enrazar con agua destilada hasta alcanzar 100 ml.

Almacenar a 4 °C.

El buffer de corrida utilizado fue TBE 1 x.

Electroforesis en gel de agarosa 0,8 %

Preparación del gel de agarosa 0,8 % (25 ml):

0,2 g de agarosa en 25 ml de buffer TAE 1 x.

Calentar a 70 °C hasta la disolución.

Dejar enfriar y añadir bromuro de etidio a una concentración final de 50 µg/ml.

Las muestras se preparan con buffer de carga "Orange Loading Dye 6 x" (Fermentas™).

Composición del buffer de carga:

Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM

Orange G, 0.15%.

Xylene cyanol FF, 0.03%.

Glicerol, 60 %.

60 mM EDTA.

En gel de agarosa 0,8 % el marcador orange G co-migra con fragmentos de DNA de aproximadamente 50 pb, mientras que el xylene cyanol FF lo hace con fragmentos de DNA de aproximadamente 4000 pb.

La visualización de los resultados de las electroforesis se realizó mediante luz U.V. Los geles de agarosa fueron fotografiados con cámara digital.

Preparación del buffer TAE 1 x (1000 ml):

Adicionar 980 ml de agua destilada miliQ a 20 ml de TAE 50 x.

Preparación del buffer TAE 50 x (100ml):

24,2 g de Tris base.

5,71 ml de ácido acético glacial puro.

20 ml de EDTA 0,25 M, pH= 8.

Disolver y llevar a 100 ml con agua destilada miliQ.

Purificación del amplicón de interés a partir de un gel de agarosa.

“QIAquick Gel Extraction Kit” de QIAGEN

Para la elución de DNA a partir de un gel de agarosa.

Escindir el fragmento del gel conteniendo la banda correspondiente al amplicón que se desea purificar con bisturí limpio.

Colocar el fragmento de gel en un tubo de 1,5 ml y determinar el peso del fragmento de gel.

Agregar 3 volúmenes de Buffer QG, considerando la equivalencia: 1 mg de gel -1 µl.

Incubar a 50 °C durante 10 minutos hasta que el gel se disuelva. Durante el proceso se puede mezclar por inversión para acelerar el mismo.

Luego de que se haya logrado la disolución del fragmento de gel, verificar que el color de la solución sea amarillo, esto indicará que el pH es el adecuado para comenzar la adsorción en la membrana de la columna.

Agregar 1 volumen de gel, de isopropanol 100%; considerando nuevamente la equivalencia: 1 mg de gel -1 µl. Mezclar.

Colocar la columna en un tubo colector.

Añadir la muestra a la columna, considerando que el volumen del reservorio de la columna es de 800 µl. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto. Si el volumen de la muestra excede los 800 µl se debe repetir este paso.

Descartar el líquido del tubo colector y colocar la columna nuevamente en él.

Agregar 750 µl de Buffer PE a la columna. Incubar a temperatura ambiente durante 2 a 5 minutos. Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.

Descartar el líquido del tubo colector y re-ubicar la columna en el mismo.

Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.

Colocar la columna en un tubo de 1,5 ml estéril.

Agregar 50 µl de agua destilada miliQ.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Centrifugar a 13000 rpm durante 1 minuto.

Almacenar a -20 °C.

CLONACIÓN “GeneJET PCR Cloning Kit” de FERMENTAS

Clonación con células competentes *E.coli XL-1 Blue*.

Para la reacción de ligación y la posterior transformación se utilizó el kit y se siguieron las instrucciones del fabricante.

- Reacción de Blunting:

Colocar en un tubo de 1,5 ml, 10 µl de Buffer de reacción 2 x.

Agregar hasta 7 µl del producto de PCR purificado. Debe tenerse en cuenta que el ratio molar inserto:vector óptimo recomendado es de 3:1, aunque se acepta relaciones en un rango de 0,5:1 a 15:1.

Agregar 1 µl de “DNA Blunting Enzyme”

Agregar agua destilada miliQ hasta alcanzar un volumen final de 18 µl.

Mezclar con vortex brevemente y centrifugar brevemente a máxima velocidad.

Incubar la mezcla a 70 °C durante 10 minutos.

- Reacción de ligación.

Agregar a la mezcla 1 µl de pJET/Blunt Cloning Vector, 50 ng/µl.

Agregar 1 µl de T4 DNA Ligasa, 5U/µl.

Mezclar con vortex brevemente y centrifugar brevemente a máxima velocidad.

Incubar a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos.

- Transformación con células competentes *E.coli XL-1 Blue*.

Transferir 5 µl de la mezcla de ligación a un tubo “falcon”.

Incubar en hielo durante 2 minutos.

Agregar 50 µl de células competentes *XL-1 Blue*.

Incubar en hielo durante 15 minutos.

Realizar un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos.

Agregar 300 µl de medio SOC.

Incubar en shaker durante 90 minutos.

- Plaqueo

Plaquear el cultivo en placas de petri con medio LB-agar-ampicilina, previamente incubadas a 37 °C durante al menos 2 horas.

Incubar las placas por aproximadamente 9 horas a 37 °C.

Almacenar a 4 °C hasta su análisis.

-Preparación del medios liquido y sólido LB pH= 7 (30 ml de LB líquido y 470 ml de LB sólido).

5 g de triptona.

2,5 g de extracto de levadura.

2,5 g de NaCl.

Disolver en agua destilada miliQ, y enrazar con agua destilada miliQ a 500 ml.

En el caso de LB Agar adicionar 7,05 g de agar a 470 ml de LB.

Esterilizar por autoclave durante 20 minutos.

El LB líquido se almacena a 4 °C.

Adicionar ampicilina a una concentración de 50 µg/ml.

Verter, bajo condiciones de esterilidad, el LB-agar-ampicilina en placas de petri.

Cada placa contiene aproximadamente 30 ml de LB-agar-ampicilina.

Permitir solidificación y finalmente almacenar a 4 °C.

- Preparación del medio SOC (20 ml).

En vaso de bohemia, pesar 0,4 g de triptona.

Adicionar 0,1 g de extracto de levadura.

Agregar 40 µl de NaCl 5 M.

Agregar 20 µl de KCl 2,5 M.

Agregar 10 ml de agua destilada miliQ.

Disolver. Llevar a 20 ml con agua destilada miliQ.

Esterilizar por autoclave durante 20 minutos.

Almacenar a 4 °C.

Al momento de utilizar:

Agregar 200 µl de Mg^{+2} 2 M, previamente esterilizado.

Agregar 100 µl de glucosa 2 M, previamente esterilizada.

- Rastreo por PCR.

El rastreo por PCR se realizó siguiendo las mismas condiciones de amplificación por RT-PCR y con los cebadores específicos para cada fragmento por separado.

- Extracción del DNA plasmídico.

“GeneJet Plasmid Miniprep kit” de FERMENTAS.

Resuspender el pellet celular en 250µl de solución de resuspensión.

Transferir la suspensión celular a un tubo de microcentrífuga. Las bacterias pueden ser resuspendidas completamente mediante mezcla con vortex o pipeteo hasta que no haya remanentes celulares.

Nota: asegurarse que la Rnasa A haya sido previamente añadida a la solución de resuspensión.

Agregar 250µl de la solución de lisis y mezclar bien invirtiendo el tubo 4 ó 5 veces hasta que la solución se vuelva viscosa y clara.

Nota. No mezclar con vortex para evitar cortes en el DNA cromosómico. No incubar por más de 5 minutos para evitar desnaturalización o superenrollamiento del DNA plasmídico.

Agregar 350µl de solución de neutralización y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo 4 o 5 veces.

Nota. Es importante mezclar bien después de la adición de la solución de neutralización para evitar la precipitación localizada de desechos de células bacterianas. El lisado bacteriano neutralizado es viscoso y turbio.

Centrifugar por 5 minutos para sedimentar los restos celulares y el DNA cromosómico.

Transferir el sobrenadante a la columna GeneJET mediante pipeteo. Evitar transferir el precipitado blanco.

Centrifugar por 1 minuto. Descartar el líquido que fluye hacia el tubo colector y poner la columna en el mismo tubo.

Agregar 500µl de solución de lavado (diluido previamente con etanol) a la columna GeneJET. Centrifugar de 30 a 60 segundos y descartar el líquido que fluye hacia el tubo colector y poner la columna en el mismo tubo.

Repetir el procedimiento usando 500µl de solución de lavado.

Descartar el líquido que fluye hacia el tubo colector y centrifugar nuevamente un minuto con el fin de remover posibles residuos de solución de lavado. Este paso es esencial para eliminar residuos de etanol.

Transferir la columna GeneJET a un tubo eppendorf. Agregar 50µl de buffer de elución en el centro de la membrana de la columna para eluir el DNA plasmídico con cuidado de no tocar la membrana con el tip de la pipeta. Incubar por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 2 minutos.

Nota. Un paso de elución adicional con buffer de elución o agua recupera DNA residual de la membrana y aumenta el rendimiento global en un 10 a 20%

Descartar la columna y guardar el DNA plasmídico purificado a -20°C.