



Caracterización genética de aislamientos brasileros del virus Distemper Canino en base al análisis del gen de la proteína de fusión

Jéssika Llanes Ramírez

Licenciatura en Bioquímica

Orientadora: Dra. Yanina Panzera

Co-orientador: MSc. Nicolás Sarute

Sección Genética Evolutiva

Facultad de Ciencias-UdelaR

Montevideo, Mayo de 2014

AGRADECIMIENTOS

A la Sección Genética Evolutiva por haberme brindado la posibilidad de realizar mi tesina de grado.

A mis orientadores Nicolás Sarute y Yanina Panzera, siempre dispuestos a brindarme ayuda, y sobre todo, gracias por su paciencia.

A los compañeros del laboratorio, algunos de los cuales compartimos parte del proyecto CDV.

A mi familia y amigos, que me acompañaron y apoyaron a lo largo de estos años.

AGRADECIMIENTOS.....	I
INDICE.....	II
RESUMEN.....	III
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Clasificación Taxonómica.....	1
1.2. Genoma y proteínas virales.....	1
1.2.1. Genoma.....	1
1.2.2. Proteínas virales.....	2
1.3 Patogenia.....	3
1.4 Epidemiología y vacunación.....	4
1.5 Caracterización Genética.....	4
1.6 Objetivos.....	5
1.6.1. Objetivo general.....	5
1.6.2. Objetivos específicos.....	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1 Muestras.....	6
2.2 Aislamiento del genoma viral.....	6
2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT).....	7
2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	7
2.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	8
2.6 Purificación de los amplicones.....	8
2.7 Secuenciación y análisis de secuencias.....	9
2.8 Análisis filogenético.....	9
2.9 Likelihood Mapping.....	11
3. RESULTADOS.....	12
3.1 Amplificación de la región Fsp del genoma de CDV por RT-PCR y electroforesis.....	12
3.2 Secuenciación y análisis bioinformático.....	12
3.3 Análisis filogenético.....	15
3.4 Likelihood mapping.....	17
4. DISCUSIÓN.....	18
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	20
6. BIBLIOGRAFIA.....	21

RESUMEN

El virus Distemper canino (CDV) es miembro del género *Morbillivirus* dentro de la familia *Paramyxoviridae*. CDV es un virus envuelto, con genoma ARN simple cadena, polaridad negativa y de aproximadamente 15,7 kilobases. Este virus es el agente etiológico de una enfermedad infecciosa denominada Distemper o Joven Edad, que afecta a todas las familias de carnívoros terrestres y se caracteriza por presentar altas tasas de mortalidad. La enfermedad se controla principalmente a través de vacunas con virus atenuados, sin embargo, recientemente se han registrado numerosos brotes de la enfermedad en distintas regiones geográficas, incluso en poblaciones de canes correctamente vacunados. Una posible explicación a este hecho, es la emergencia de nuevas cepas capaces de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas. Debido a que la información sobre las cepas circulantes en la región es escasa, nuestro grupo ha realizado la caracterización de cepas de CDV en la región, mediante el análisis de los genes de las glicoproteínas de superficie hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F).

En el presente trabajo se realizó la caracterización de cepas circulantes en Brasil mediante el análisis de la región codificante del péptido señal de la proteína F (Fsp), y se establecieron sus relaciones evolutivas con cepas uruguayas, argentinas, y con cepas descritas en otras regiones geográficas. Nuestros resultados indican que las cepas brasileras se agrupan con cepas de la región y Europa en el linaje Europa1/Sudamérica1. Además, el presente estudio es el primer registro de relevamiento de la variabilidad genética de la región Fsp de aislamientos de Brasil, contribuyendo a la comprensión de la evolución y dispersión del virus en el continente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Clasificación Taxonómica

El virus Distemper canino (CDV) es miembro del género *Morbillivirus* perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* y es el agente etiológico de una enfermedad infecciosa denominada Distemper (CD). Dentro del este género también se encuentra el virus del Sarampión (MeV) y el virus Rinderpest (RPV), entre otros (Griffin, 2007).

1.2. Genoma y proteínas virales

1.2.1. Genoma

CDV posee un genoma de ARN simple hebra, polaridad negativa de aproximadamente 15,7 kb. El genoma presenta seis genes que codifican para las proteínas estructurales del virión: la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la proteína de fusión (F), la hemaglutinina (H) y la proteína *large* (L) (Figura 1) (Lamb & Parks, 2007). Los genes se transcriben por una ARN polimerasa ARN dependiente, la cual inicia la transcripción desde el extremo 3' hacia el extremo 5' del genoma viral mediante un mecanismo de transcripción conocido como "start-stop". Este mecanismo implica que la polimerasa realice una pausa una vez que transcribe un gen, pudiendo continuar con la transcripción de los genes situados *downstream* o detenerse, generando así un gradiente de transcripción el cual se mantiene a lo largo de la infección (Anderson & von Messling, 2008).

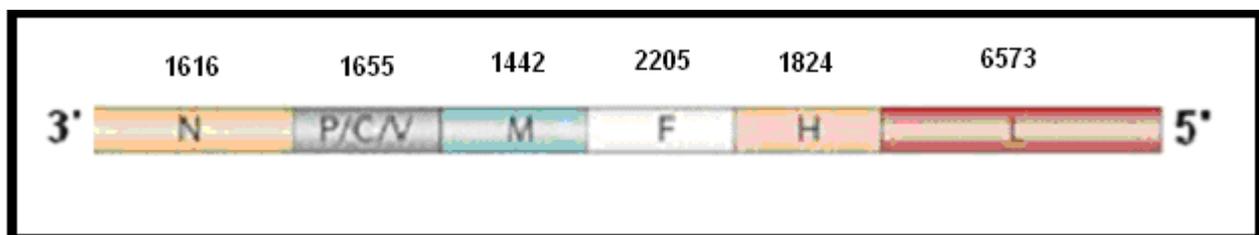


Figura 1: Esquema del genoma de CDV. Se indica el tamaño en nucleótidos de los marcos abiertos de lectura (ORF) de cada gen; N: nucleocápside; P/C/V: fosfoproteína; M: matriz; F: fusión; H: hemaglutinina; L: *large*.

1.2.2. Proteínas virales

Nucleocápside (N): es la primera en traducirse y está constituida por 525 aminoácidos (aa). Es una proteína de unión al ARN que envuelve al genoma viral y forma parte del complejo ribonucleoproteico (RNP), el cual interactúa con las demás proteínas virales (Figura 2) (Griffin, 2007; Lamb & Parks, 2007).

Fosfoproteína (P): la proteína consta de 507 aa y forma parte del complejo RNP junto a la proteína *large* y la nucleocápside (Figura 2). La fosfoproteína es activada mediante fosforilación y actúa como co-factor de la ARN polimerasa. (Griffin, 2007).

Proteína de matriz (M): está constituida por 335 aa, es la principal organizadora de la morfogénesis viral, e interactúa con las proteínas integrales de membrana, la bicapa lipídica y la nucleocápside (Figura 2) (Lamb & Parks, 2007).

Proteína de fusión (F): es una glicoproteína constituida por 662 aa, está involucrada en la fusión de la envoltura viral con la membrana de la célula huésped, y en la fusión entre células (Figura 2). La proteína F es sintetizada como un precursor inactivo denominado pre-F₀, el cual es clivado entre los aminoácidos 135-136 por la acción de una peptidasa celular, generando el péptido señal (F_{sp}) de 135 aa y al precursor inmaduro F₀. Luego, F₀ es glicosilado y clivado por una furina celular, formando las subunidades F₁ y F₂ que se mantienen unidas bajo la forma de un heterodímero, el cual representa la forma activa de la proteína F. Si bien F_{sp} no forma parte de la proteína F madura, se ha establecido que esta región puede afectar indirectamente la actividad de fusión de la proteína e influir en la patogénesis viral (von Messling & Cattaneo, 2002; Lamb & Parks, 2007).

Hemaglutinina (H): es una glicoproteína constituida por 607 aa que forma parte integral de la membrana y está involucrada en el reconocimiento del receptor celular de CDV (CD150) (Figura 2). La proteína H está involucrada en la adsorción celular en la primera etapa de la infección, y junto a la proteína F, son los determinantes antigénicos del virus (Griffin, 2007).

Proteína *large* (L): está constituida por 2183 aa y es la subunidad esencial de la ARN polimerasa, debido a su rol catalítico en la síntesis de ARN (Figura 2) (Lamb & Parks, 2007).

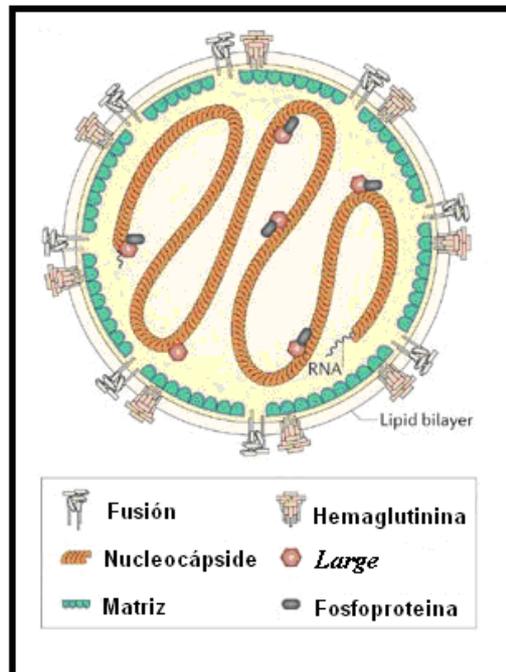


Figura 2: Esquema de la partícula viral de un *Morbillivirus*. Se detalla al genoma ARN y las proteínas virales. Imagen tomada de Moss & Griffin, 2006.

1.3 Patogenia

La transmisión del virus se da por la inhalación de aerosoles infecciosos. Una vez que el virus ingresa al organismo se replica inicialmente en los macrófagos y posteriormente se disemina a través de los linfocitos locales a las amígdalas y a los ganglios linfáticos, lo cual puede llevar a una severa inmunosupresión. Si el animal infectado desarrolla una respuesta inmune intensa, el virus se elimina de los tejidos y el animal es capaz de recuperarse; sin embargo una respuesta inmune insuficiente determina que el virus alcance los tejidos epiteliales, el sistema digestivo, y en la fase aguda al sistema nervioso central (SNC). El daño cerebral conduce a encefalitis precoz o encefalomielitis progresiva con desmielinización y muerte (Appel & Summers, 1999; Martella *et al.*, 2008).

1.4 Epidemiología y vacunación

Distemper es una de las afecciones más severas en cánidos domésticos, y actualmente afecta a todas las familias de carnívoros terrestres (Appel & Summers, 1999; Deem *et al.*, 2000). La enfermedad presenta distribución cosmopolita con un amplio rango de huéspedes, habiéndose observado brotes en grandes félidos de Norteamérica, mapaches y civetas de palma de Asia, zorros de Sudamérica y Europa, y en chacales de África (Yoshikawa *et al.*, 1989; Machida *et al.*, 1993; Appel *et al.*, 1994; Ferreyra *et al.*, 2009; Gowtage-Sequeira *et al.*, 2009; Martella *et al.*, 2009; Megid *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010).

En la década del cincuenta se desarrollaron las primeras vacunas con virus vivos atenuados que permitieron controlar y prevenir infecciones por CDV en canes domésticos. Sin embargo, en los últimos años se han detectado brotes en animales vacunados en diferentes regiones geográficas (Gemma *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Negrao *et al.*, 2013). Este fenómeno podría explicarse por la falla en las vacunas y/o en la vacunación, por la reversión hacia la virulencia de las cepas vacunales, o bien por la emergencia de cepas lo suficientemente divergentes como para evadir la protección inmune generada por las vacunas (Pardo *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2006). Las cepas comúnmente utilizadas en la producción de vacunas atenuadas son la Rockborn, Onderstepoort y Lederle (Greene, 2000; Demeter *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2007;). La cepa Rockborn es la más utilizada en Brasil y en términos generales presenta elevada eficacia (Selwyn *et al.*, 2009).

1.5 Caracterización Genética

La mayoría de los estudios de caracterización genética de CDV se realizan mediante el análisis del gen H debido a su elevada variabilidad. Los valores de divergencia aminoacídica en la proteína H alcanzan hasta un 10% entre cepas de campo y cepas vacunales (Harder *et al.*, 1996; Bolt *et al.*, 1997; Iwatsuki *et al.*, 1997; Pardo *et al.*, 2005). Los análisis filogenéticos basados en dicha variabilidad han permitido identificar nueve linajes: Europa 1/Sudamérica 1, Europa 2 y Europa 3, Norteamérica 1 y 2, Asia 1 y 2, Sudamérica 2, y África (Martella *et al.*, 2006; An *et al.*, 2008; Woma *et al.*, 2009; Panzera *et al.*, 2012).

Por otro lado, estudios recientes han revelado que la variabilidad presente en la región codificante del péptido señal de la proteína de fusión (Fsp) es mayor a la detectada para el gen H. La variabilidad aminoacídica del péptido Fsp alcanza valores de 34% entre cepas de campo y vacunales (Plattet *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2009). Estos elevados valores sugieren que la región Fsp podría ser un marcador adecuado para realizar estudios de caracterización de CDV. Debido a ello, y a la dificultad de obtener el gen H completo, nuestro grupo de investigación ha analizado la región Fsp de cepas sudamericanas aportando claras evidencias sobre su utilidad en estudios filogenéticos (Sarute *et al.*, 2013). Con el fin de continuar con el relevamiento de la variabilidad genética de las cepas circulantes de CDV en la región, en este trabajo analizamos, por primera vez, la región Fsp de cepas de campo brasileras.

1.6 Objetivos

1.6.1. Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es realizar la caracterización genética mediante el análisis de la región Fsp, de modo de contribuir al conocimiento de la dispersión y evolución del virus en la región.

1.6.2. Objetivos específicos

1.6.2.1. Relevar la variabilidad genética de la región Fsp entre las cepas brasileras. Establecer la variabilidad genética entre las cepas de campo y la cepa vacunal Rockborn.

1.6.2.2. Realizar análisis comparativos entre las cepas brasileras y cepas aisladas en la región y el resto del mundo, con el fin de establecer sus relaciones evolutivas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestras

Se analizaron cinco muestras denominadas BR151, BR152, BR153, BR154 y BR155, provenientes de canes con diagnóstico clínico de Distemper. Las primeras cuatro corresponden a muestras de cerebelo y la última a secreción ocular.

Dichas muestras fueron cedidas por el laboratorio de la Dra. Alice Alfieri del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva de la Universidad Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, con el cual nuestro grupo mantiene una colaboración.

2.2 Aislamiento del genoma viral

La extracción de ARN se realizó mediante el reagente TRIzol (Invitrogen Life Technologies) a partir de un homogeneizado de 200 μ l de muestra y 1 ml de TRIzol, de acuerdo al siguiente protocolo:

- Mezclar con vortex e incubar a temperatura ambiente (TA) por 5 min.
- Adicionar 200 μ l 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 y adicionar 500 μ l 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 μ l de etanol 70% y centrifugar a 12.000 rpm por 5 min a 4 °C.
- Aspirar el etanol. Secar el pellet ARN a TA por 10 min.
- Adicionar 20-40 μ l de agua libre de ARNasas precalentada a 50 °C.
- Incubar a TA por 5 min. Resuspender el pellet ARN.

2.3 Reacción de Retrotranscripción (RT)

El ARN viral se utilizó para la síntesis de ADNc mediante el kit “RevertAid M-M μ LV Reverse Transcriptase” de Fermentas. Para cada reacción se utilizaron 10 μ l de ARN y 2 μ l de cebador directo (10 μ M) denominado F4748 (5’-CCACGCACTTGCCCGAGCTCA-3’). La mezcla se incubó a 70 °C por 5 min, y posteriormente en hielo por 2 min. Se adicionaron 4 μ l de Buffer de Reacción (5X), 2 μ l de dNTPs (10 mM), 1 μ l de Ribolock™ y 1 μ l de RevertAid™ RT (5 U/ μ l), y se incubó la mezcla a 42 °C por 60 min y finalmente a 70 °C por 10 min. El ADNc fue incubado a -20°C hasta su utilización.

2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se estandarizó utilizando diferentes concentraciones de reactivos y condiciones de ciclado (Tabla 1 y 2). En la reacción se utilizó el cebador directo F4854: 5’-TCC AGG ACA TAG CAA GCC AAC A-3’, y el reverso R5535: 5’-GGT TGA TTG GTT CGA GGA CTG AA-3’ capaces de amplificar un segmento de 681 pb que incluye la región Fsp (Sarute *et al.*, 2013).

Tabla 1. Reactivos utilizados en la reacción de PCR

<i>Reactivo</i>	<i>[] stock</i>	<i>[] f</i>	<i>Vol (μl)</i>
Buffer	10 X	1 X	1.0
MgCl ₂	25 mM	2.0 mM	0.8
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.2
Primer F4854	10 μ M	0.4 μ M	0.4
Primer R5535	10 μ M	0.4 μ M	0.4
Taq (Fermentas)	5 U/ μ l	1U	0.2
		ADNc	3.0
		H ₂ O	4.0
		Vol f	10

Tabla 2. Condiciones de ciclado utilizadas en la reacción de PCR

<i>Etapas</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temp.</i>	
Desn. Inicial	3:00	94°C	
Desnaturalización	0:30	94°C	35X
Hibridación	0:45	58°C	
Extensión	1:00	72°C	
Extensión Final	10:00	72°C	

2.5 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y tinción con bromuro de etidio. Las muestras se cargaron con el buffer “Orange Loading Dye 6X” (Fermentas) y se corrió un marcador de peso molecular “FastRuler Low Range DNA Ladder 50-1500 pb” (Fermentas). Los amplicones se separaron en un campo eléctrico constante (90V, 110mA) en buffer TAE 1X durante 30 min.

2.6 Purificación de los amplicones

Los productos de PCR del tamaño esperado se purificaron utilizando el kit “GFX PCR DNA and gel band purification kit” (GE Healthcare) de acuerdo al siguiente protocolo:

- Escindir la banda del gel de agarosa
- Agregar 10 µl de Buffer de Captura tipo 3 por cada 10 mg de gel, mezclar por inversión e incubar a 60°C por 15 min.
- Transferir 800 µl de la mezcla a una columna GFX Microspin, incubar a TA por 1 min y centrifugar a 12000 rpm por 30 seg
- Repetir los pasos hasta utilizar todo el volumen de la mezcla.
- Agregar 500 µl de Buffer de Lavado tipo 1 en la columna, centrifugar a 12000 rpm por 30 seg y transferir la columna a un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml.
- Agregar 50 µl de Buffer de Elusión tipo 6 a la columna, incubar a TA por 1 min, centrifugar a 12000 rpm por 1 min.
- Recuperar el DNA purificado y almacenar a -20°C.

El DNA purificado de cada amplicón fue cuantificado por NanoDrop 8000 (Thermo Scientific) previo a la secuenciación.

2.7 Secuenciación y análisis de secuencias

El ADN purificado fue secuenciado en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) del Institut Pasteur Montevideo. Las secuencias nucleotídicas se editaron, alinearon y compararon con secuencias provenientes de cepas uruguayas y argentinas, y con secuencias de otras regiones geográficas utilizando el algoritmo ClustalX del programa “Molecular Evolutionary Genetic Analysis” (MEGA5) (Tamura *et al.*, 2011).

2.8 Análisis filogenético

El alineamiento de las secuencias nucleotídicas fue empleado para realizar una reconstrucción filogenética mediante el método maximum likelihood y el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano. El soporte estadístico de la filogenia (*bootstrap*) se estimó mediante 500 réplicas mediante el programa MEGA 5.

El análisis incluyó 35 secuencias correspondientes a cepas caracterizadas por nuestro laboratorio, cepas pertenecientes a diferentes linajes y cepas vacunales (Sarute *et al.* 2013) (Tabla 3).

Tabla 3. Denominación, año de aislamiento, origen geográfico y número de acceso de las cepas empleadas en el análisis filogenético

Denominación	Año de aislamiento	Origen geográfico	Número de acceso
UY75	2007	Uruguay	KF684021
UY102	2008	Uruguay	KC331150
UY111	2008	Uruguay	KC331151
UY116	2008	Uruguay	KF684022
UY127	2009	Uruguay	KF684023
UY128	2009	Uruguay	KC331152
UY141	2009	Uruguay	KC331153
Arg23	2003	Argentina	KC257465
Arg24	2008	Argentina	KC257466
Arg25	2010	Argentina	KC257467
Arg26	2010	Argentina	KC257468
5804	2003	Alemania	AY386315
5804P	2003	Alemania	AY386316
MS01	2007	China	EF445055
JL(07)1	2008	China	EU327875
HeB(07)1	2008	China	EU327874
BS0610	2009	China	EU934234
GS0812-4	2011	China	HQ850148
CDV GZ2	2011	China	JN381189
W812B	2011	Japón	AB607905
W729B	2011	Japón	AB607904
19876	2005	Estados Unidos	AY964110
25259	2005	Estados Unidos	AY964114
A75/17	1999	Suiza	AF164967
164071	2004	Estados Unidos	EU716337
98-2654	2004	Estados Unidos	AY466011
98-2645	2004	Estados Unidos	AY445077
98-2646	2004	Estados Unidos	AY542312
007Lm	2009	Japón	AB474397
007Lm-1vp	2009	Japón	AB462810
18133	2005	Estados Unidos	AY964108
21261	2005	Estados Unidos	AY964112
Rockborn	1997	Alemania	AF026244
Onderstepoort	1998	Estados Unidos	AF014953
PDV	1998	Holanda	AJ224706

2.9 Likelihood Mapping

Para confirmar la idoneidad de la región Fsp para estudios filogenéticos, utilizamos el método *likelihood-mapping* que permitió estimar la señal filogenética a partir de un conjunto de 129 secuencias nucleotídicas de dicha región. Este método se basa en el análisis de cuartetos de secuencias elegidos al azar, los cuales constituyen los elementos básicos de las reconstrucciones filogenéticas. Cada árbol filogenético del cuarteto es representado como un punto dentro de un triángulo equilátero, el cual se divide en diferentes regiones: los vértices representan los árboles de topología definida (resueltos), el centro representa a los árboles no resueltos, y los lados del triángulo representan los árboles parcialmente resueltos (Figura 3). La distribución de puntos y la probabilidad en cada región, estima que tan adecuadas son las secuencias de datos para utilizarlos en una reconstrucción filogenética (Strimmer and von Haeseler *et al.*, 1997).

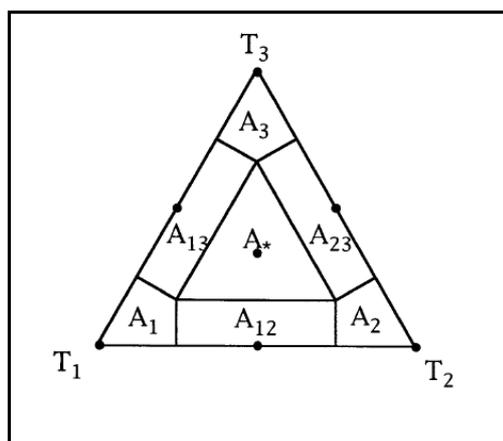


Figura 3: Representación de las diferentes regiones dentro del triángulo equilátero. A* corresponde a la región que representa los árboles no-resueltos, su área es igual a la suma de las superficies de A₁, A₂, A₃, en estas regiones los árboles se ajustan mejor que en el resto de las regiones. A₁₂, A₁₃, A₂₃ representan las regiones de árboles parcialmente resueltos. Tomada de Strimmer and von Haeseler *et al.*, 1997.

3. RESULTADOS

3.1 Amplificación de la región Fsp del genoma de CDV por RT-PCR y electroforesis

Se realizó la amplificación por PCR de la región Fsp de las cinco muestras provenientes de canes con diagnóstico clínico de Distemper (Figura 4). Los amplicones fueron purificados a partir del gel de agarosa y el DNA fue secuenciado.

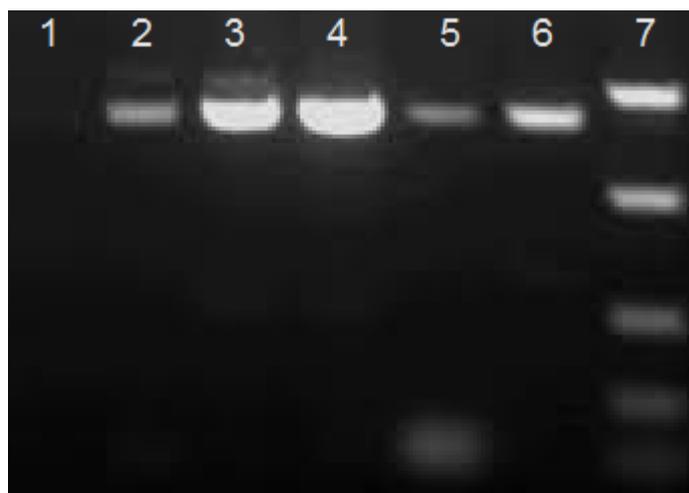


Figura 4: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR para Fsp. Carriles:

- 1) Blanco de PCR
- 2) BR151,
- 3) BR152,
- 4) BR153,
- 5) BR154,
- 6) BR155,
- 7) Marcador de Peso Molecular: 1000, 500, 200, 100 y 50 pb

3.2 Secuenciación y análisis bionfornático

Las secuencias nucleotídicas de la región codificante del Fsp (405 pb) fueron editadas y ensambladas mediante el programa SeqMan (DNASTAR, Inc.). Éstas se alinearon y compararon entre sí mostrando 45 variaciones a nivel nucleotídico, de las cuales 34 correspondieron a transiciones (sustitución de una pirimidina por una pirimidina, o de una purina por una purina) y 11 a transversiones (sustitución de una pirimidina por una purina o viceversa). El análisis de las secuencias aminoacídicas reveló 28 sustituciones.

La comparación de las secuencias nucleotídicas de las cepas de campo con la cepa vacunal Rockborn, mostró 58 variaciones nucleotídicas (Figura 5) y 34 aminoacídicas.

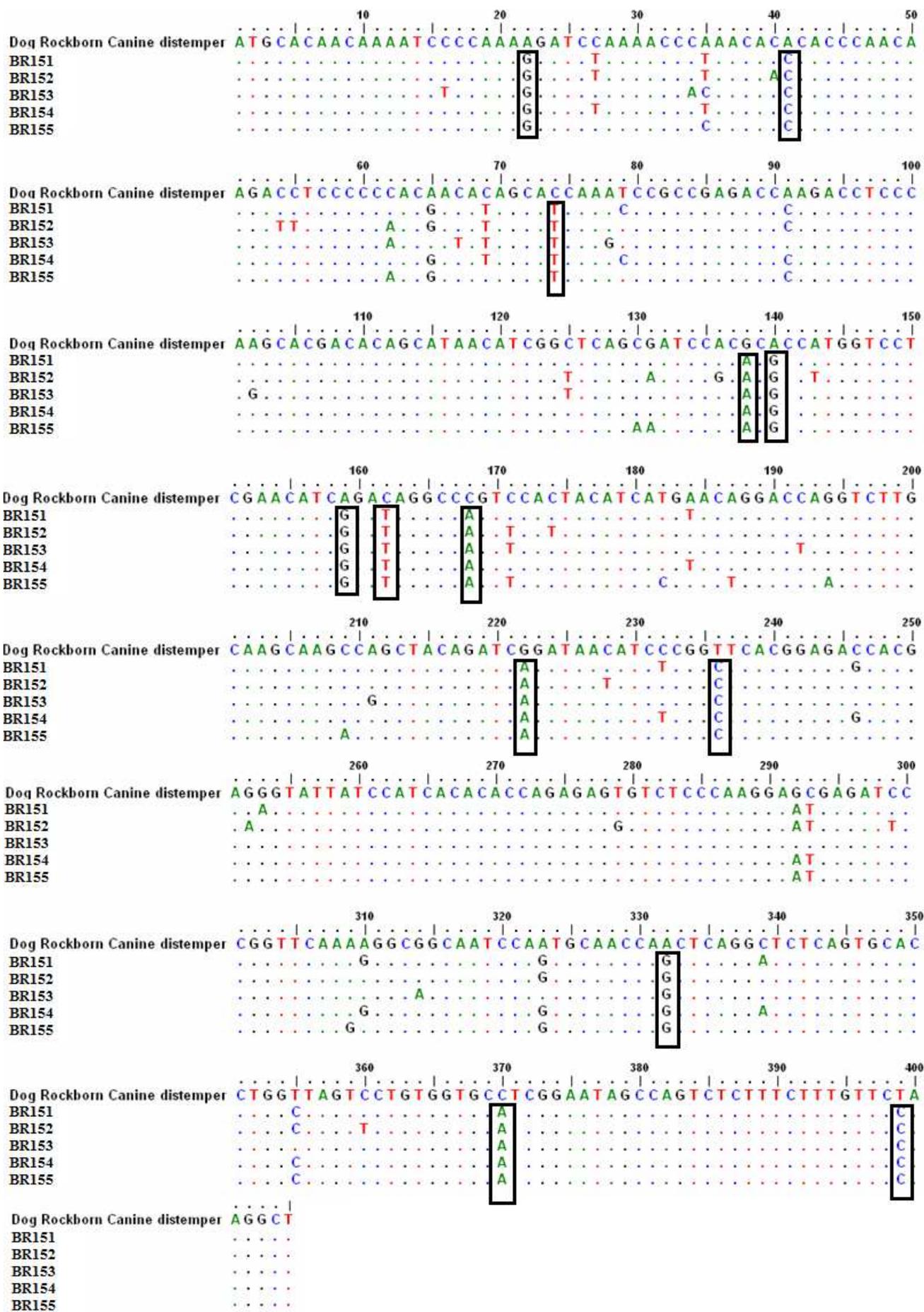


Figura 5: Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la región Fsp (405 pb) de las cepas de campo obtenidas en este trabajo y de la cepa vacunal Rockborn. Los puntos representan identidad, los nucleótidos exclusivos de las cepas de campo se detallan en recuadro.

La identidad de las cepas de campo brasileñas fue del 93.1-99.8% a nivel nucleotídico, y entre 87.4-99.3% a nivel aminoacídico. Respecto a la cepa vacunal Rockborn, la identidad con las cepas de campo fue del 90.9- 93.6% y 85.2-89.6% a nivel nucleotídico y aminoacídico respectivamente en comparación con la cepa vacunal (Tabla 4). La divergencia aminoacídica entre las cepas de campo y la vacunal alcanzó valores del 14.8%.

Tabla 4. Porcentaje de identidad de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de la región Fsp de las cepas de campo y la cepa vacunal Rockborn. Los valores en cursiva corresponden a identidad nucleotídica, mientras que los valores en negrita a identidad aminoacídica.

	<i>Vacunal Rockborn</i>	<i>BR151</i>	<i>BR152</i>	<i>BR153</i>	<i>BR154</i>	<i>BR155</i>
<i>Vacunal Rockborn</i>	*****	86,7	85,2	89,6	87,4	86,7
<i>BR151</i>	<i>92,8</i>	*****	88,9	87,4	99,3	90,4
<i>BR152</i>	<i>90,9</i>	<i>94,6</i>	*****	88,1	89,6	90,4
<i>BR153</i>	<i>93,6</i>	<i>93,6</i>	<i>93,1</i>	*****	88,1	88,9
<i>BR154</i>	<i>93,1</i>	<i>99,8</i>	<i>94,8</i>	<i>93,8</i>	*****	91,1
<i>BR155</i>	<i>92,8</i>	<i>95,3</i>	<i>94,8</i>	<i>94,3</i>	<i>95,6</i>	*****

Además, se estimaron los valores de divergencia aminoacídica (p-distance) entre las cepas de campo de Brasil, Uruguay y Argentina. La divergencia entre cepas brasileñas alcanzó el 14%, mientras que para las cepas uruguayas este valor fue del 3%, y para las argentinas 24%. La divergencia entre las cepas brasileñas y uruguayas fue de hasta 9%, y de 17,3% respecto a las argentinas; los valores de divergencia entre las cepas argentinas y brasileñas alcanzó el 17,5% (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de distancia aminoacídica de Fsp para las cepas de Brasil, Uruguay, Argentina y la cepa Rockborn

CEPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
[1] UY75	***																
[2] UY102	0,02	***															
[3] UY111	0,02	0	***														
[4] UY116	0,02	0,01	0,01	***													
[5] UY127	0,03	0,02	0,02	0,02	***												
[6] UY128	0,03	0,02	0,02	0,02	0	***											
[7] UY141	0,03	0,02	0,02	0,02	0	0	***										
[8] Arg23	0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,07	0,07	***									
[9] Arg24	0,21	0,21	0,21	0,22	0,22	0,22	0,22	0,21	***								
[10] Arg25	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24	0,24	0,23	0,02	***							
[11] Arg26	0,23	0,23	0,23	0,24	0,24	0,24	0,24	0,23	0,02	0	***						
[12] BR151	0,07	0,08	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,07	0,22	0,24	0,24	***					
[13] BR152	0,09	0,09	0,09	0,1	0,1	0,1	0,1	0,08	0,24	0,27	0,27	0,12	***				
[14] BR153	0,1	0,1	0,1	0,11	0,12	0,12	0,12	0,1	0,19	0,22	0,22	0,14	0,13	***			
[15] BR154	0,06	0,07	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,06	0,21	0,23	0,23	0,01	0,11	0,13	***		
[16] BR155	0,07	0,07	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,04	0,23	0,25	0,25	0,1	0,1	0,12	0,09	***	
[17] Rockborn	0,11	0,12	0,12	0,12	0,14	0,14	0,14	0,1	0,14	0,16	0,16	0,14	0,15	0,1	0,13	0,14	***

3.3 Análisis filogenético

El análisis reveló que las cepas brasileras se agrupan junto con una cepa argentina (Arg-23), todas las cepas uruguayas y cepas europeas formando un clado con un 99% de apoyo estadístico. En un clado diferente se agrupan las otras cepas de Argentina (Arg24, Arg25, Arg26). Mientras que el resto de las cepas se agrupan en seis clados divergentes, correspondiente a los diferentes linajes caracterizados en el mundo. En un clado aparte se encuentra la cepa vacunal Rockborn junto a una cepa de campo de Estados Unidos (Figura 6, Tabla 3).

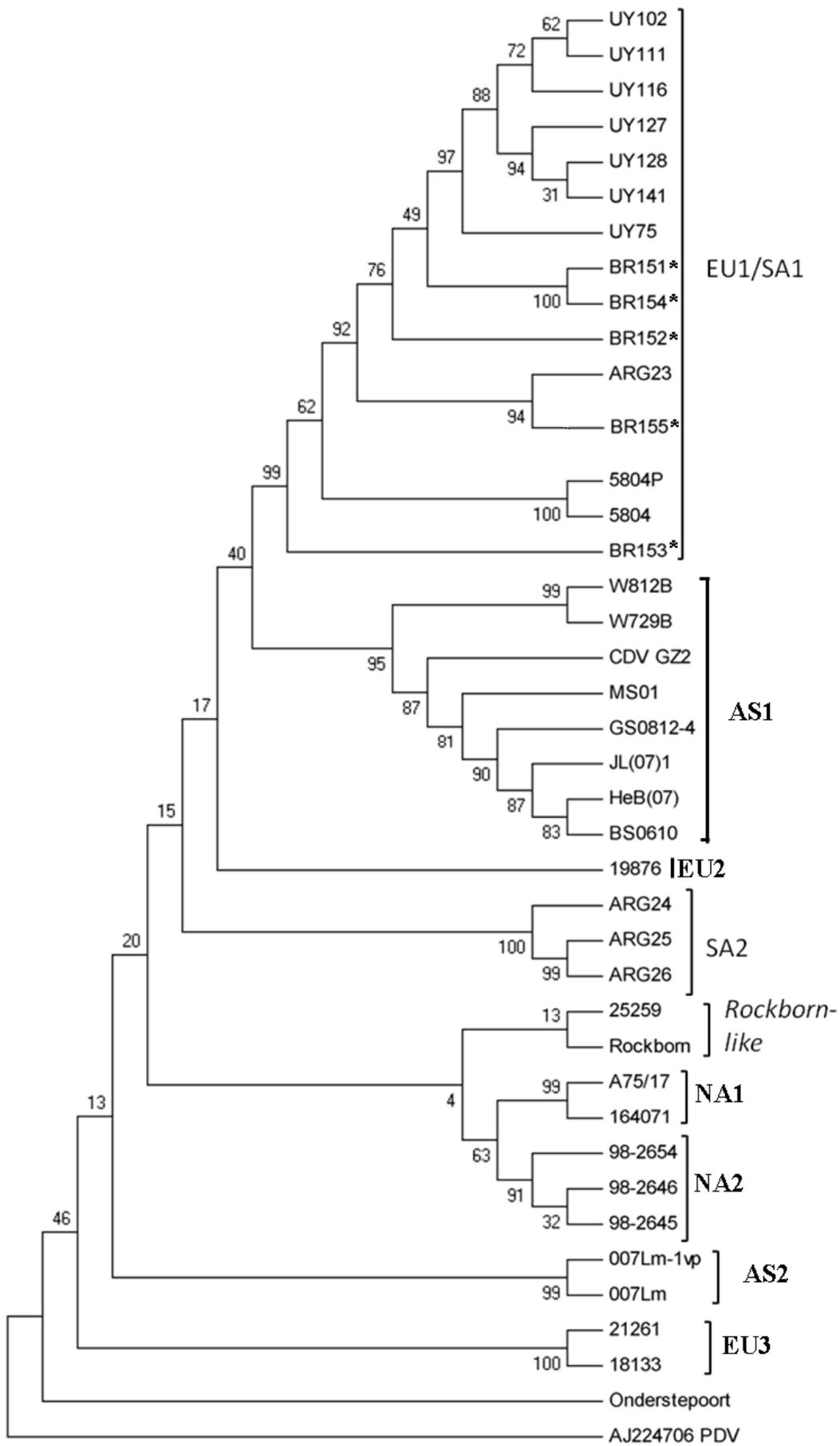


Figura 6: Árbol filogenético inferido por maximum likelihood de las secuencias nucleotídicas de la región Fsp. Se incluyeron cepas procedentes de los diferentes linajes previamente caracterizados en el mundo y del clado *Rockborn-like*. Las cepas caracterizadas en el presente trabajo fueron marcadas con un asterisco. Se utilizó una cepa del virus distemper de fócidos (PDV) como grupo externo. Los valores de *bootstrap* se indican para cada clado. AS1: Asia-1, AS2: Asia-2, EU1/SA1: Europa-1/Sudamérica-1, SA2: Sudamérica-2, EU2: Europa-2, EU3: Europa-3, NA1: Norteamérica-1, NA2: Norteamérica-2.

3.4 Likelihood mapping

El método *likelihood-mapping* reveló que las secuencias utilizadas presentan una señal filogenética significativa, debido a que el porcentaje de los árboles bien resueltos para el set de datos de la región Fsp fue del 92.5% (30.3 + 31 + 31.2), mientras que el porcentaje de árboles no-resueltos fue del 4.9% (Figura 7).

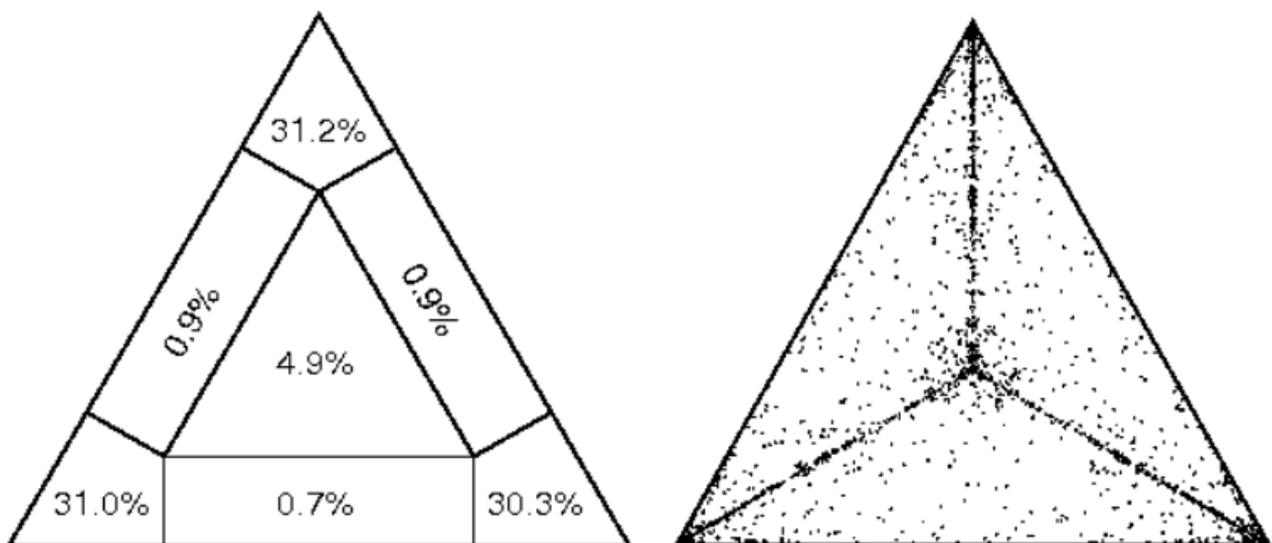


Figura 7. Análisis por likelihood mapping de la región Fsp. Los números en cada sección del triángulo representan los porcentajes de cuartetos que se encuentran en cada región.

4. DISCUSIÓN

Distemper canino es una de las afecciones infecciosas más severas en carnívoros terrestres y marinos (Appel *et al.*, 1994; Appel & Summers, 1999), registrándose brotes de la enfermedad en diversas regiones geográficas a pesar de la implementación de planes de vacunación (Gemma *et al.*, 1996; Lan *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2009; Negroao *et al.*, 2013). Una posible explicación a este hecho es la emergencia de cepas divergentes capaces de evadir la respuesta inmune generada por las vacunas (Pardo *et al.*, 2005).

Debido a la escasa información existente sobre la variabilidad de las cepas de CDV circulantes en nuestra región (Calderón *et al.*, 2007), nuestro grupo de investigación comenzó a realizar la caracterización genética de las cepas sudamericanas circulantes. En base al análisis del gen H y la región Fsp, determinamos por primera vez la existencia de dos linajes co-circulantes (EU1/SA1 y SA2) con diferente origen, prevalencia y dispersión (Panzera *et al.*, 2011; Sarute *et al.*, 2013). En el presente trabajo nos propusimos como principal objetivo realizar, por primera vez, la caracterización genética de cepas de Brasil mediante el análisis de la variabilidad de la región codificante del Fsp. El uso de este marcador para estudios de caracterización fue recientemente validado por nuestro grupo debido a su idoneidad para análisis filogenéticos, y por sus ventajas operativas ya que es más fácil de amplificar y más económico de implementar en el laboratorio en lugar del gen H comúnmente utilizado (Sarute *et al.*, 2013).

Las secuencias obtenidas de la región Fsp de las cepas brasileras, fueron editadas y ensambladas, y se incluyeron en un *dataset* conteniendo 129 secuencias obtenidas del GenBank. Dicho *dataset* fue analizado mediante el método gráfico likelihood-mapping, obteniéndose una probabilidad del 92,5% para la región de filogenias bien definidas (*well-resolved phylogenies*). Estos datos confirman reportes previos sobre la utilidad de la región Fsp para realizar análisis filogenéticos (Lee *et al.*, 2008; Sultan *et al.*, 2009; Sarute *et al.*, 2013).

El análisis filogenético reveló que las cepas de Brasil, Uruguay, Arg 23, y cepas europeas forman un mismo clado, con un soporte estadístico de 99%. La variabilidad aminoacídica de las cepas brasileras alcanzó el 12.7% respecto a las demás cepas del clado. Acorde con el criterio para

definir linajes basado en el análisis de la región Fsp, dos cepas pertenecen al mismo linaje si se agrupan juntas en un mismo clado con valores de divergencia aminoacídicas inferiores al 19%, mientras que pertenecen a linajes diferentes si no se agrupan juntas y la distancia es mayor al 19% (Sarute *et al.*, 2013). Por tanto, las cepas de Brasil formarían parte del previamente descrito linaje Europa 1/Sudamérica 1 (EU1/SA1), como también se estableció mediante el análisis del gen H completo (Negrao *et al.*, 2013). Este linaje se encuentra ampliamente distribuido en Sudamérica, lo cual no se ha observado a la fecha para los otros dos linajes de nuestro continente (Sudamérica 2 y 3), los cuales se restringen a Argentina y Ecuador respectivamente (Sarute *et al.*, 2014).

La elevada identidad entre cepas sudamericanas y europeas permite especular sobre un ancestro común. En este sentido, Blancou (2004) sostiene que el virus se habría diseminado desde las colonias españolas de Sudamérica al continente europeo en el siglo XVII. En la actualidad, factores como el intercambio comercial, traslado de animales domésticos e importación de especies exóticas puede contribuir directamente a la dispersión de CDV entre países linderos y entre continentes (Kim *et al.*, 2001).

La comparación de la cepa vacunal Rockborn con las cepas brasileras mostró valores de divergencia aminoacídica de hasta 14.8%; dichos valores son sensiblemente más bajos que los detectados para otras cepas vacunales como la cepa Onderstepoort (34%). Mediante el análisis del gen H completo, se detectaron elevados valores de identidad entre la cepa Rockborn y cepas circulantes; de hecho, varias cepas aisladas de canes domésticos de Norteamérica se encuentran relacionadas con la cepa vacunal Rockborn formando un único clado con valores de identidad de hasta el 99%, de allí que han sido denominadas *Rockborn-like* (Martella *et al.*, 2011). Debido a ello, no es llamativa la identidad observada entre las cepas de Brasil y la cepa Rockborn.

El estudio de un mayor número de muestras, incluyendo cepas circulantes de otros países de América del Sur, brindará un mayor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y aportará nuevos datos que podrían contribuir a la mejora de los planes de inmunización y las condiciones sanitarias de las poblaciones caninas.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 El análisis de la región Fsp de nuevas cepas confirmó la utilidad de este marcador para una rápida e inequívoca caracterización de las cepas de campo de CDV circulantes en una región.

5.2 El análisis filogenético reveló que las cepas Brasileñas se relacionan con cepas de Uruguay, Argentina y Europa, pertenecientes al linaje EU1/SA1, el cual presenta la mayor representación en Sudamérica hasta la fecha.

5.3 El análisis comparativo entre las cepas de campo y la cepa vacunal Rockborn mostró que existe una baja divergencia entre ellas, debido a que esta cepa se ha comenzado a utilizar recientemente en comparación con las cepas vacunales “clásicas”.

Sería interesante poder realizar el estudio de un número mayor de muestras, incluyendo cepas circulantes de otros países de América del Sur, para conocer más sobre la epidemiología de la enfermedad y poder proporcionar mecanismos para desarrollar mejores planes de inmunización y mejorar la calidad de vida de las poblaciones caninas.

6. BIBLIOGRAFIA

An D., Yoon S., Park J., No I., Park K., 2008. Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet. Microbiol.* **132**, 389-395.

Anderson D., von Messling V., 2008. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J. Virol.* **82**, 10510-10518.

Appel MJ., Yates R., Foley G., Bernstein J., Santinelli S., Spelman L., Miller L., Arp L., Anderson M., Barr M., Pearce-Kelling S., Summers B., 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* **6**, 277-288.

Appel MJ., Summers BA. 1999. Canine Distemper: Current Status. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*, Carmichael LE (Ed). International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

Blancou J. 2004. Dog distemper: imported into Europe from South America?. *Hist. Med. Vet.* **29**, 35-41.

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

Calderón MG., 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.

Deem SL., Spelman LH., Yates RA., Montali RJ. 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J. Zoo. Wildl. Med.* **31**, 441-451.

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

Ferreira H., Calderón M., Marticorena D., Marull C., Barrios L. 2009. Canine Distemper Infection in Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *J. Wild. Dis.* **45**, 1158–1162.

Gemma T, Watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin YS, 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.

Gowtage-Sequeira S., Banyard A., Barrett T., Buczkowski H., Funk S., Cleaveland S. 2009. Epidemiology, pathology and genetics analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *J. Wild. Dis.* **45**, 1008–1020.

Greene CE. 2000. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. Segunda edición, McGraw-Hill Interamericana.

Griffin DE. 2007. Measles Virus. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA, 1552–1585.

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. Virol.* **78**, 373–380.

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 RA & Parks GD. 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. En: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), Fields Virology, fifth ed. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA, 1450–1496.

Lan NT., 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

Lee MS., KuoJung T., Li-Hsuan C., Ching-Yun C., Yu-Pin L., Chao-Chin C., Shu-Hwae L., Wei-Li H. 2008. The identification of frequent variations in the fusion protein of canine distemper virus. *Vet. J.* **183**, 184-190.

Machida N., Izumisawa N., Nakamura T., Kiryu K. 1992. Canine Distemper Virus Infection in a Masked Palm Civet (*Paguma larvata*). *J. Comp. Path.* **107**, 439-443.

Machida N., Kiryu K., Ohishi K., Kandat E., Izumisawa N., Nakamura N. 1993. Pathology and Epidemiology of Canine Distemper in Raccoon Dogs (*Nyctereutes procyonoides*). *Comp. Path.* Vol. **108**, 383-392.

Martella V., Cirone F., Elia G., Lorusso E., Decaro N., Campolo M., Desario C., Lucente MS., Bellacicco AL., Blixenkrone-Møller M., Carmichael LE., 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., Lucente M., Decaro N., Lorusso E., Banyai K., Blixenkrone-Møller M., Lan N., Yamaguchi R., Cirone F., Carmichael L., Buonavoglia C. 2007. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet. Microbiol.* **122**, 32-42.

Martella V., Elia G., Buonavoglia C. 2008. Canine distemper virus. *Vet. Clin. NorthAm. Small. Anim. Pract.* **38**, 787-797.

Martella V., Bianchi A., Bertoletti I., Pedrotti L., Lugiatti A., Catella A., Cordioli P., Lucente M., Elia G., Buonavoglia C. 2009. Canine Distemper Epizootic among Red Foxes, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 2007–2009.

Martella V., Blixenkrone-Møller M., Elia G., Lucente MS., Cirone F., Decaro N., Nielsen L., Bányai K., Carmichael LE., Buonavoglia C. 2011. Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine.* **29**, 1222-1227.

Megid J., Teixeira R., Amorin R., Cortez A., Heinemann A., Antunes P., Fachini da Costa L., Fornazari F., Cipriano R., Cremasco A., Richtzenhain L. 2009. First Identification of Canine Distemper Virus in Hoary Fox (*Lycalopex vetulus*): Pathologic Aspects and Virus Phylogeny. *J. Wild. Dis.* **46**, 303–305.

Moss WJ, Griffin DE. 2006. Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol.* **4**, 900-908

Negrão FJ, Gardinali NR, Headley SA, Alfieri AA, Fernandez MA, Alfieri AF. 2013. Phylogenetic analyses of the hemagglutinin gene of wild-type strains of canine distemper virus in southern Brazil. *Genet. Mol. Res.* **12**, 2549-2555.

Panzera Y., Calderón MG., Sarute N., Guasco S., Cardeillac A., Bonilla B., Hernandez M., Francia L., Bedó G, La Torre J., Perez 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., Kleiboeker S. 2005. Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *J. Clin Micro.* **43**, 5009–5017.

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.

Sarute N., Calderón MG., Pérez R., La Torre J., Hernández M., Francia L., Panzera Y. 2013. The Fusion Protein Signal-Peptide-Coding Region of Canine Distemper Virus: A Useful Tool for Phylogenetic Reconstruction and Lineage Identification. *PLoS ONE.* 8(5): e63595. doi:10.1371/journal.pone.0063595.

Sarute N., Pérez R., Aldaz J., Alfieri AA., Alfieri AF., Name D., Llanes J., Hernández M., Francia L., Panzera Y. 2014. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes.* 48, 474-478.

Selwyn A., Amude A., Alfieri AA., Bracarense A., Alfieri AF., Summers B. 2009. Molecular detection of Canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 588–597.

Strimmer K., von Haeseler A. 1997. Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6815–6819.

Sultan S., Charoenvisal N., Thi Lan N., 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. *Virol. J.* **6**, 157-168.

Sun Z., Li A., Ye H., Shi Y., Hu Z., Zeng L. 2010. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Vet. Microbiol.* 141, 374–378.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA 5. Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2 731-2 739.

von Messling V., Cattaneo R. 2002. Amino-Terminal Precursor Sequence Modulates Canine Distemper Virus Fusion Protein Function. *J. Virol.* **76**, 4172–4180.

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.

Yoshikawa Y., Ochikubo F., Matsubara Y., Tsuruoka H., Ishii M., Nomura Y., Sugiyama M., Yamanouchi K. 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet. Microbiol.* **20**, 193-205.

Zhao J., Yan X., Chai X., Martella V., Luo G., Zhang H., Gao H., Liu Y., Bai X., Zhang L., Chen T., Xu L., Zhao C., Wang F., Shao X., Wu W., Cheng S. 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.