

Montevideo 2015

SECCIÓN
GENÉTICA
EVOLUTIVA
FACULTAD
DE CIENCIAS

DIAGNÓSTICO Y CARACTERIZACIÓN DE PATÓGENOS VIRALES CANINOS EN URUGUAY

Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica (UdelaR)

Bch. Victoria Casabone

Orientadora Dra. Yanina Panzera

Coorientador Dr. Ruben Pérez

RESUMEN	I
FUNDAMENTACIÓN	1
1. CAPÍTULO 1 – PARVOVIRUS CANINO	3
1.1 INTRODUCCIÓN	3
1.1.1 Parvovirus canino, agente etiológico	3
1.1.2 Genoma viral, características estructurales	3
1.1.3 Ciclo viral	4
1.1.4 Evolución de CPV	4
1.1.5 Parvovirosis, patogenicidad y cuadro clínico	7
1.1.6 CPV en Uruguay, antecedentes	7
1.2 OBJETIVOS	10
1.2.1 Objetivo general	10
1.2.2 Objetivos específicos	10
1.3 MATERIALES Y MÉTODOS	11
1.3.1 Estrategia de investigación	11
1.3.2 Muestras	11
1.3.2.1 Muestras de campo	11
1.3.2.2 Muestras para el ensayo de especificidad	11
1.3.3 Extracción de ADN viral	12
1.3.3.1 Extracción de ADN por el método “fast boiling”	12
1.3.3.2 Extracción de ADN con kit Zymo	12
1.3.4 Amplificación por Real Time PCR	12
1.3.4.1 Diseño de cebadores y sondas	12
1.3.4.2 Reacción de Real Time PCR	13
1.4 RESULTADOS	14
1.4.1 Metodología de diagnóstico y caracterización basada en Real Time PCR	14
1.4.1.1 Diseño de cebadores y sondas	14
1.4.1.2 Estandarización de condiciones de reacción	15
1.4.1.3 Determinación de la especificidad del método	17
1.4.2 Aplicación del ensayo por Real Time PCR en muestras de campo	18
1.4.3 Aplicación en muestras de distintos tejidos	20
1.5 DISCUSIÓN	21
1.5.1 Parvovirus canino	21
1.5.2 Metodologías de diagnóstico y caracterización	21
1.5.3 Ensayo de especificidad del método basado en Real Time PCR	24
1.5.4 Aplicación del ensayo por Real Time PCR en muestras de campo	24

1.5.5 Aplicación de Real Time PCR en muestras de distintos tejidos	27
1.5.6 Análisis de la situación epidemiológica actual en Uruguay	27
1.6 CONCLUSIONES	30
1.7 PERSPECTIVAS	30
2. CAPÍTULO 2 – DISTEMPER CANINO	31
2.1 INTRODUCCIÓN	31
2.1.1 Virus Distemper canino, agente etiológico	31
2.1.2 Genoma viral y proteínas virales	31
2.1.3 Ciclo viral	33
2.1.4 Distemper, patogenicidad y cuadro clínico	3
2.1.5 Variabilidad genética de CDV	35
2.1.5.1 Antecedentes del grupo	35
2.2 OBJETIVOS	39
2.2.1 Objetivo general	39
2.2.2 Objetivos específicos	39
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	40
2.3.1 Estrategia de investigación	40
2.3.2 Muestras de campo	40
2.3.3 Extracción de ARN con kit Zymo	40
2.3.4 Retrotranscripción	40
2.3.5 Amplificación por PCR en tiempo final	41
2.3.6 Visualización de productos de PCR	42
2.3.7 Secuenciación	42
2.3.8 Análisis bio-informáticos	43
2.3.8.1 Alineamiento y comparación de secuencias	43
2.3.8.2 Análisis filogenéticos	43
2.4 RESULTADOS	44
2.4.1 Aplicación de herramientas moleculares de diagnóstico de CD	44
2.4.2 Caracterización genética de CDV	46
2.4.2.1 Análisis bioinformáticos	46
2.4.2.1.1 Análisis de secuencias	46
2.4.2.1.2 Análisis filogenéticos	48
2.5 DISCUSIÓN	50
2.5.1 Aplicación de herramientas moleculares para el diagnóstico de CD	50

2.5.2 Caracterización genética durante el 2014	51
2.5.3 Estudio de la variabilidad genotípica de CDV en Uruguay en el 2014	52
2.6 CONCLUSIONES	53
2.7 PERSPECTIVAS	53
3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

FUNDAMENTACIÓN

Parvovirus canino (CPV) y el virus Distemper canino (CDV) son los agentes responsables de las principales infecciones virales en canes domésticos. El primero se caracteriza principalmente por afectar caninos de corta edad y producir cuadros de gastroenteritis y diarreas hemorrágicas (Desario et al., 2005); el segundo, por provocar infecciones multisistémicas presentando sintomatologías respiratorias, digestivas y/o nerviosas (Appel and Summers, 1999). Aunque no se consideran agentes zoonóticos, representan un importante problema a nivel sanitario, tanto animal como humano. Los canes domésticos, por su densidad de población y proximidad al hombre, constituyen una especie de gran importancia desde el punto de vista de salud pública. Por lo tanto, un bajo nivel de sanidad de esta especie puede ser determinante de un desequilibrio biológico/sanitario que es capaz de afectar la salud del hombre.

Además de la importancia epidemiológica de ambas enfermedades, los agentes virales son interesantes desde el punto de vista evolutivo. CPV presenta un genoma de ADN simple cadena con altas tasas de sustitución nucleotídica, similar a la de algunos virus ARN, lo que promueve su rápida evolución y por lo tanto, generación de nuevas variantes (Hoelzer et al., 2008; Shackelton et al., 2005). A nivel mundial circulan actualmente tres variantes antigénicas (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) (Martella et al., 2006; Parrish et al., 1991); y nuestro país presenta un escenario epidemiológico particular. Desde el 2006 a la fecha la población viral uruguaya ha sufrido rápidos cambios en la prevalencia de las variantes antigénicas circulantes, con poblaciones homogéneas y heterogéneas, con la cocirculación de las variantes del tipo CPV-2c y CPV-2a, que ingresaron al país producto de diferentes eventos de invasión (Maya et al., 2013; Pérez et al., 2007; Pérez et al. 2012).

El virus Distemper canino presenta un genoma ARN simple cadena, sometido a altas tasa de mutación, típica de la mayoría de los virus con genoma de ARN (Domingo et al., 2000). A nivel mundial circulan más de diez linajes diferentes y Sudamérica parece constituir una de las regiones con mayor diversidad genética; actualmente circulan cuatro linajes llamados Europa1/Sudamérica1, Sudamérica2, Sudamérica3 y Sudamérica4 con distinta distribución y prevalencia (Panzera et al., 2014).

El grupo de investigación de Genética de Microorganismos de la Sección Genética Evolutiva de la Facultad de Ciencias mantiene un programa continuo de relevamiento, caracterización genética y análisis de la evolución genómica de ambos virus. En Uruguay, implementamos por primera vez métodos de diagnóstico molecular (Pérez et al., 2007; Sarute et al., 2011) y realizamos las primeras descripciones de las características genéticas de las cepas circulantes en el país (Pérez et al., 2012; Pérez et al., 2007; Panzera et al., 2012; Sarute et al., 2013) y diversos estudios de la evolución genómica de estos virus en un contexto sudamericano (Panzera et al., 2014; Maya et al., 2013; Pérez et al., 2014; Sarute et al., 2014b).

En la presente Tesina, mediante el uso de herramientas moleculares ya estandarizadas y el desarrollo de nuevas herramientas, se monitoreó y analizó la dinámica poblacional de ambos agentes virales durante el año 2014. Para una mejor comprensión y lectura de la presente tesina se decidió hacer una división en capítulos correspondientes a cada virus.

CAPÍTULO 1

PARVOVIRUS CANINO

1.1 INTRODUCCIÓN

1.1.1 Parvovirus canino, agente etiológico

El Parvovirus canino (CPV) es el agente etiológico de la Parvovirus, la principal causa de enteritis viral en cachorros caninos, con altas tasas de mortalidad. La enfermedad fue descrita por primera vez en Estados Unidos en el año 1978 (Appel and Cooper, 1978), pero los brotes surgieron simultáneamente en distintos países alrededor del mundo. El virus se suele nombrar también como CPV-2, para diferenciarlo de otro Parvovirus no relacionado (CPV-1) que provoca abortos y causa enteritis en cachorros neonatos (Binn et al., 1970; Carmichael et al., 1994; Harrison et al., 1992).

CPV-2 pertenece a la familia *Parvoviridae*, la cual está compuesta por virus pequeños (4-6 Kb) con genomas de ADN lineal simple cadena con polaridad negativa o positiva. Se divide en dos subfamilias: *Parvovirinae*, que afecta a vertebrados, y *Densovirinae*, que infecta insectos y otros artrópodos (Kerr et al., 2006). CPV-2 se encuentra dentro del género *Parvovirus*. La única especie reconocida en este género es el virus de la Panleucopenia felina (FPV), mientras que a CPV, junto con la enteritis de visones (MEV) y el Parvovirus de mapache (RPV), se los considera como cepas genéticamente similares que se diferencian en el rango de huéspedes que afectan (Parrish et al., 1988).

1.1.2 Genoma viral, características estructurales

CPV es un virus pequeño, con un genoma de ADN de simple cadena, de polaridad negativa y una longitud aproximada de 5,2 Kb. Tiene dos marcos de lectura abiertos (ORFs). En el ORF 3' del genoma se encuentra la región que codifica los péptidos no estructurales, NS1 y NS2. En el ORF 5' se encuentra la región que codifica los péptidos que son componentes estructurales de la cápside viral, llamados VP1 y VP2 (Figura 1.1) (Reed et al., 1988). Hacia los extremos del genoma se encuentran regiones palindrómicas no codificantes que se pliegan sobre sí mismas y participan en el proceso de replicación del genoma (Tattersall and Ward, 1976). También se pueden encontrar dos grupos de repetidos en tándem en el extremo 5', uno solapado con la región codificante de las VPs, y el otro 65 pb hacia el extremo; estos repetidos intervendrían en el empaquetamiento del genoma (Rhode, 1985).

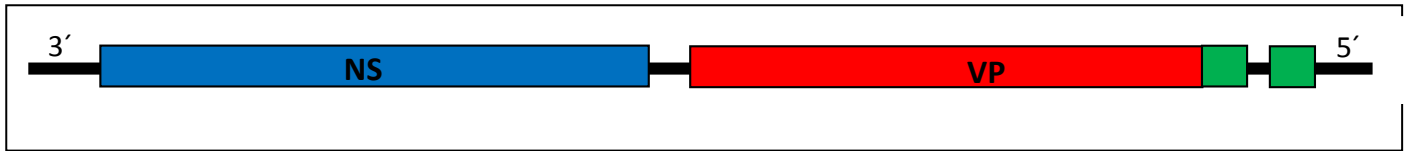


Figura 1.1. Esquema del genoma de CPV, indicando los marcos abiertos de lectura NSs (azul) y VPs (rojo). En verde los grupos de secuencias repetidas en tándem.

1.1.3 Ciclo viral

CPV ingresa a la célula huésped por medio de la unión al dominio extracelular del receptor de transferrina (TfR) (Parker et al., 2001). El complejo virus-receptor es endocitado en vesículas recubiertas por clatrina (Parker et al., 2001), que entran intactas al núcleo por transporte pasivo (Vihinen-Ranta et al., 2000). En el núcleo de la célula huésped ocurre la replicación del genoma del virus y el ensamblaje de la cápside viral. Este virus requiere para su replicación células en fase S del ciclo celular, por lo que sus blancos principales son tejidos con altas tasas de proliferación. Tras su replicación, el virus es liberado de la célula provocando su lisis (Vihinen-Ranta et al., 2002).

1.1.4 Evolución de CPV

CPV se habría originado por la ocurrencia de ciertas mutaciones puntuales en el genoma de un virus similar al de la Panleukopenia felina (FPV) (Truyen et al. 1996). Ciertos cambios en aminoácidos clave de la cápside viral de FPV (Figura 1.2) le habrían permitido al virus adaptarse al nuevo huésped canino al interactuar con la versión canina de su receptor celular, el receptor de la transferrina del tipo 1 (TfR-1) (Hueffer et al., 2003; Parker et al., 2001).

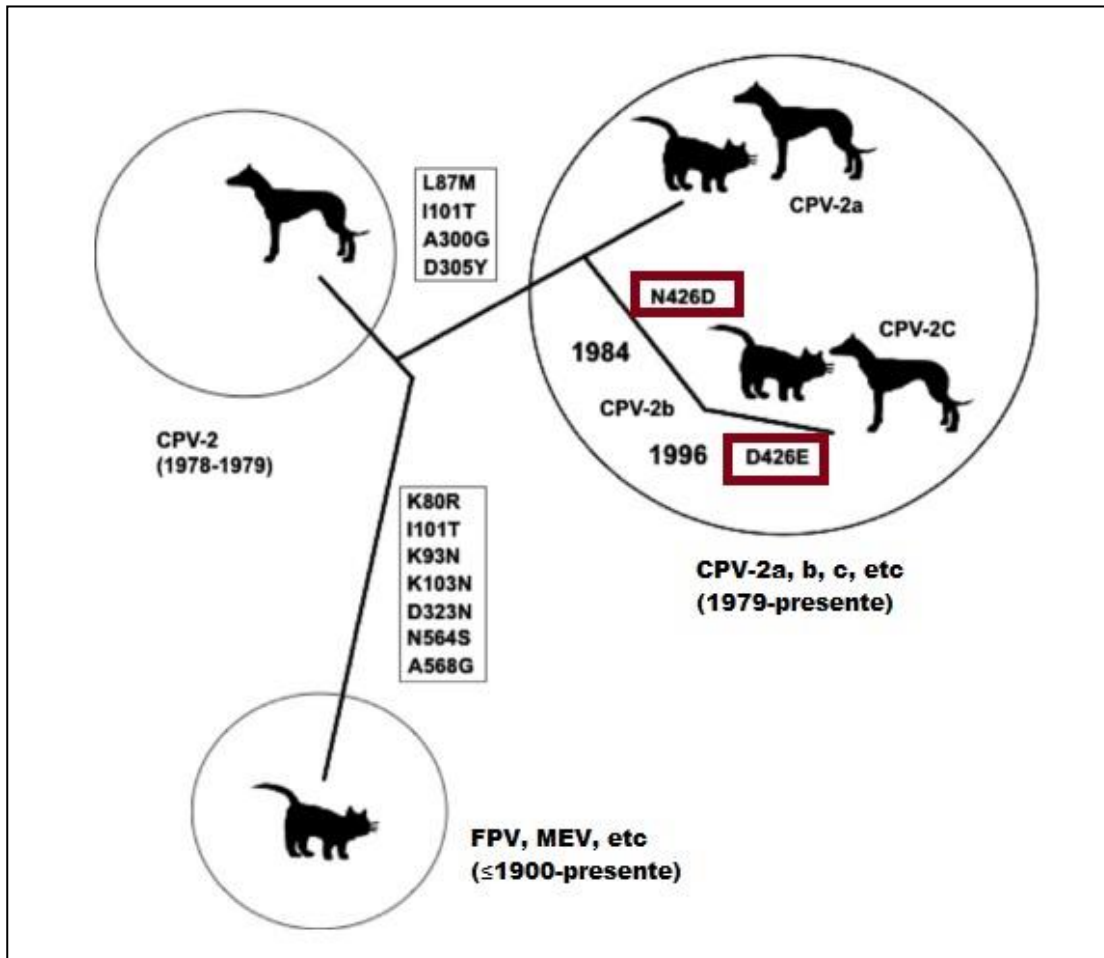


Figura 1.2. Evolución del Parvovirus canino (CPV). Relación genética, rango de huéspedes y año de la aparición del virus de la Panleucopenia felina (FPV), CPV y Parvovirus relacionados. El virus original causante de la Parvovirus canina se extinguió, y fue reemplazado por nuevas variantes genéticas (Tomado y modificado de Hoelzer & Parrish, 2010).

En poco tiempo, la rápida emergencia de la cepa original, CPV-2, y su eficaz expansión mundial generó una pandemia que provocó la muerte a decenas de miles de canes (Carmichael, 2005). A pesar de la exitosa expansión mundial que presentó CPV-2, fue rápidamente reemplazada por una nueva variante denominada CPV-2a (Parrish et al., 1985). Actualmente la variante original CPV-2 ya no se detecta en muestras de campo, pero se utiliza en la formulación de la mayoría de la vacunas (Parrish et al., 1988).

CPV-2 y CPV-2a difieren en cinco aminoácidos de la proteína viral VP2, estos cambios alteraron su reactividad frente a anticuerpos monoclonales, generando un nuevo epítipo en VP2. También aumentó la afinidad de unión al receptor transferrina felino, recuperando la capacidad de infectar felinos que se había perdido al evolucionar FPV a CPV-2. CPV-2a dio lugar a un nuevo linaje compuesto por virus capaces de

infectar tanto huéspedes caninos como felinos (Shackelton et al., 2005). Este linaje continuó evolucionando y acumulando mutaciones, generando nuevas variantes genéticas, algunas de las cuales son también variantes antigénicas. Se han descrito tres variantes antigénicas dentro del linaje 2a que se denominan CPV-2a (2a), CPV-2b (2b) y CPV-2c (2c) (Tabla 1.1) (Buonavoglia et al., 2001; Parrish et al., 1991). La variante 2b se detectó en el año 1984, producto de la generación de otro nuevo epítipo antigénico en la proteína de la cápside viral VP2. Esta variante 2b se distribuyó a nivel mundial con distintas prevalencias con respecto a 2a (Parrish et al., 1991). Por último, cerca del año 2000 surge una tercera variante antigénica, 2c, que también se expandió mundialmente (Buonavoglia et al., 2001). Actualmente circulan las tres variantes antigénicas a nivel mundial con diferentes frecuencias y prevalencia y con diferentes niveles de variabilidad genética.

Tabla 1.1. Diferencias aminoacídicas entre las variantes genéticas/antigénicas 2a, 2b y 2c.

Variante	Mutación en residuos de VP2	Emergencia
CPV-2	Arg 80 Lys Lys 93 Asn Val 103 Ala Asp 323 Asn Asn 564 Ser Ala 568 Gly	Detectado en 1978 pero se estima que emergió unos años antes.
CPV-2a	Met 87 Leu Ile 101 Thr Ala 300 Gly Asp 305 Tyr	Emerge en 1979.
CPV-2b	Asn 426 Asp	1984
CPV-2c	Asp 426 Glu	2001

Las tres variantes antigénicas pueden ser identificadas por los cambios presentes en la posición aminoacídica 426 de la proteína estructural VP2 (Tabla 1.2) (Decaro and Buonavoglia, 2012; Parrish, 1991).

Tabla 1.2. Posición aminoacídica 426 de VP2 para cada variante antigénica.

Variante	Aminoácido 426 de VP2
2a	Asn (AAT)
2b	Asp (GAT)
2c	Glu (GAA)

1.1.5 Parvovirus, patogenicidad y cuadro clínico

CPV infecta a los perros a través de la ruta oro-nasal y alcanza la mucosa intestinal luego de una diseminación inicial por los tejidos linfoides (Figura 1.3). La viremia puede persistir por varias semanas de forma intensa, aún luego de que el virus haya sido eliminado del sistema digestivo (Decaro et al., 2007a). Además, el virus puede alcanzar diversos tejidos, linfoides, bazo, médula ósea, vejiga y tejido nervioso (Decaro et al., 2007a).

Los síntomas son cuadros de anorexia, letargia, vómitos y diarreas mucoides y hemorrágicas. Si se compara la intensidad de los síntomas producidos por las variantes provenientes del linaje 2a con la original CPV-2, se encuentra que presentan una enfermedad más severa que la generada por el genotipo original y tienen mayor mortalidad (Decaro et al., 2005a).

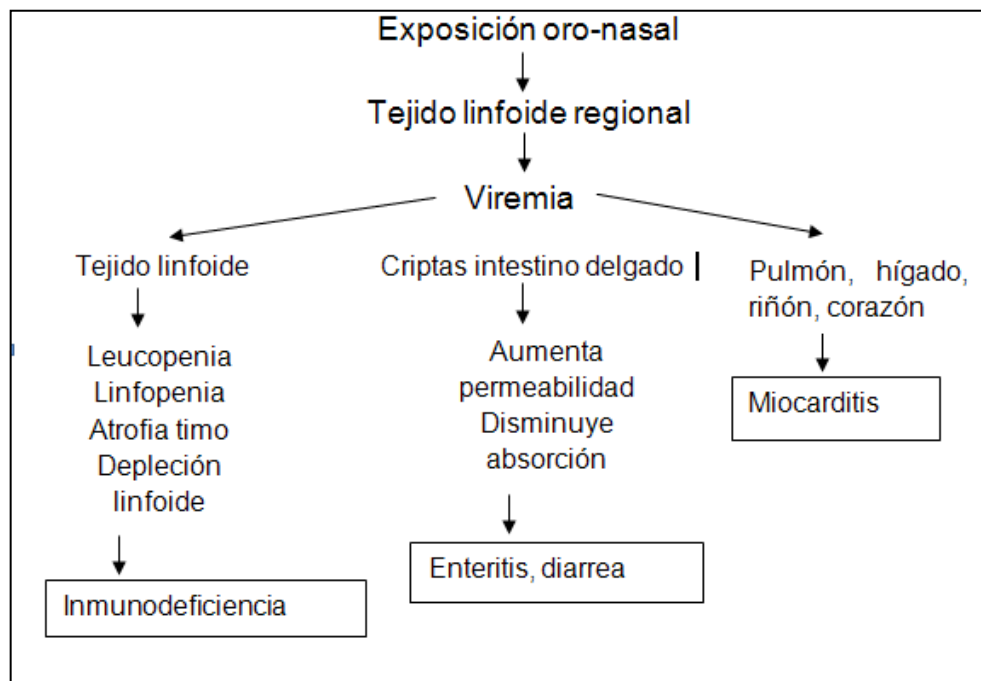


Figura 1.3. Rutas tisulares de infección del virus en el organismo del canino afectado. Tomado y modificado del sitio web <http://www.villaellie.com/parvovirus%20canina.html>.

1.1.6 CPV en Uruguay, antecedentes

Los primeros estudios de CPV en Uruguay comenzaron en nuestro grupo de investigación (Genética de Microorganismos-Sección Genética Evolutiva) en el año 2006. Esta línea de investigación busca diseñar métodos de diagnóstico y caracterización que permiten monitorear la población viral y estudiar la evolución genómica de modo de contribuir al mejoramiento del estatus sanitario del país.

Mediante la implementación de metodologías de detección y caracterización basadas en amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa y posterior diferenciación por Polimorfismo en el Largo de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP) (Buonavoglia et al., 2001), se determinó por primera vez en el país y en toda América la presencia de la variante 2c, con una prevalencia de 97,5% en el año 2006 (Pérez et al., 2007). En los años sucesivos, el análisis de las variantes de CPV reveló que entre los años 2007-2009 la variante 2c fue la única detectada en nuestro territorio (Pérez et al., 2012). Sin embargo, a mediados del 2010 emerge en Uruguay una nueva variante, 2a, que alcanzó en poco tiempo una alta frecuencia, superando en prevalencia incluso a la variante 2c (Pérez et al., 2012). El reemplazo de la variante 2c por una 2a es un evento hasta el momento único en el mundo. El análisis de la variabilidad genética de ambas variantes reveló que eran muy divergentes, probablemente como consecuencia de sus diferentes orígenes geográficos; la variante 2c se habría originado en Europa y la 2a en Asia (Maya et al., 2013) (Figura 1.4). Ambas variantes cocircularon durante 2010-2013 en el territorio, dando lugar a una población heterogénea. Esto generó un escenario epidemiológico particular en el país que justifica desarrollar métodos de diagnóstico más rápidos y la necesidad del continuo monitoreo de la evolución de CPV en Uruguay.

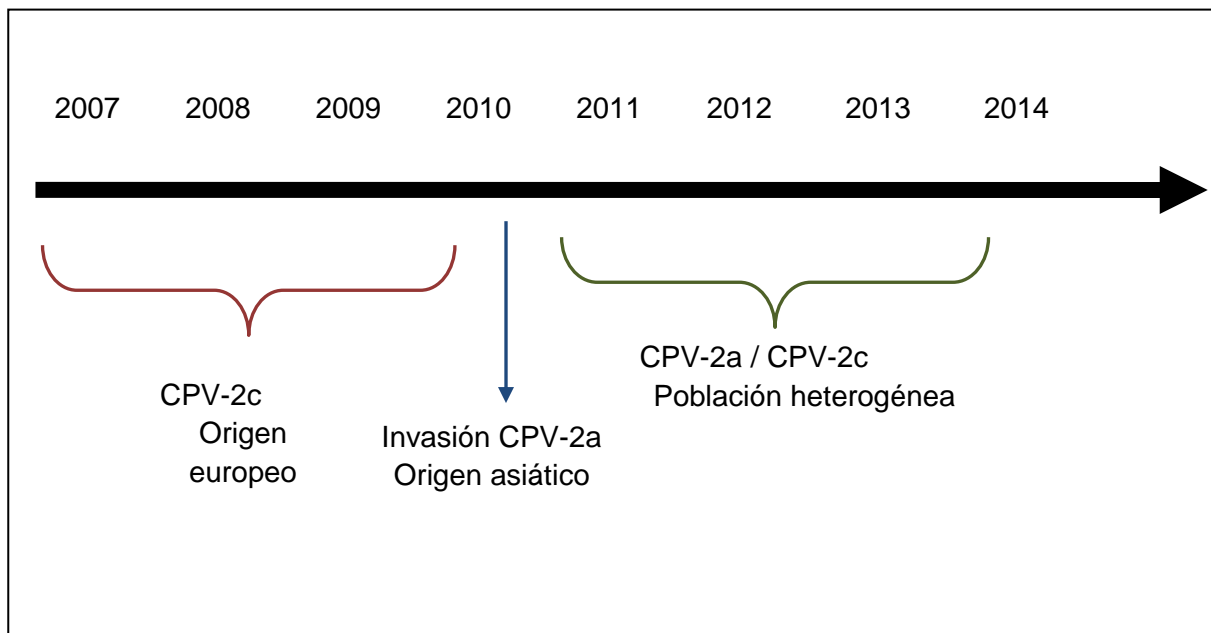


Figura 1.4. Línea de tiempo que describe la evolución de CPV en Uruguay.

Diagnóstico y caracterización de CPV en Uruguay, PCR-RFLP

En la actualidad se utiliza en nuestro laboratorio un método diseñado por Pérez et al. (2012) para el diagnóstico y la caracterización de CPV. Consiste en la amplificación de un fragmento de 1042 pb del gen VP2, una región hipervariable llamada lazo GH que contiene el codón del aminoácido 426. La variante 2c puede ser diferenciada de CPV-2, 2a y 2b al digerir el fragmento amplificado con la enzima de restricción MbolI. El amplicón proveniente de las variantes CPV-2, 2a y 2b contiene un único sitio diana para la enzima, mientras que 2c presenta un sitio de reconocimiento adicional, produciendo patrones de restricción diferenciales (Figura 1.5).

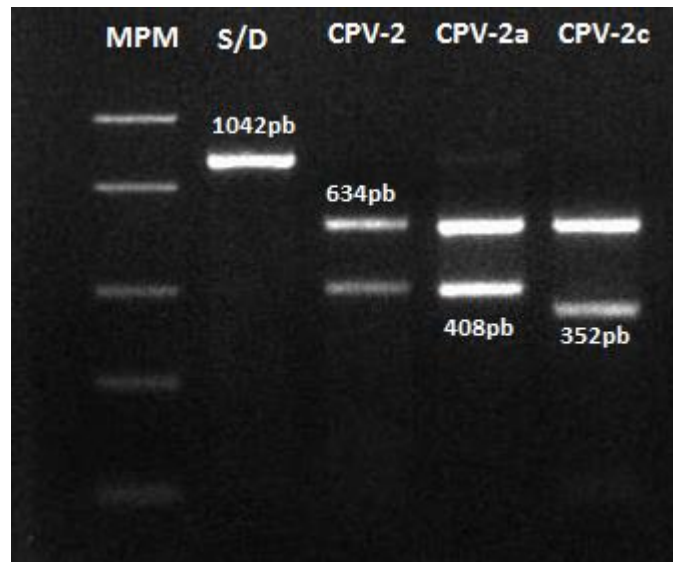


Figura 1.5. Electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Se muestran los resultados obtenidos luego de la digestión por RFLP. Marcador de peso molecular (MPM), fragmento sin digerir (S/D), CPV-2 digerida, CPV-2a digerida y CPV-2c digerida, el fragmento pequeño de 56 pb producto del RFLP de la muestra 2c no se puede apreciar en el gel. Sobre las bandas se indica el tamaño de los fragmentos formados en cada caso.

Si bien el método basado en PCR-RFLP es efectivo y confiable, no es muy rápido y sólo nos permite diferenciar 2c del resto de las variantes (CPV-2, 2a y 2b). Por lo tanto, para confirmar la identidad de una variante 2a es necesario recurrir a la secuenciación del amplicón.

En este trabajo nos propusimos desarrollar un sistema de detección y caracterización en un solo paso basado en Real Time PCR, con el objetivo de diagnosticar y caracterizar de forma rápida y directa las muestras ingresadas en el laboratorio durante el 2014.

1.1 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo general

Analizar la dinámica poblacional del Parvovirus canino durante el 2014.

1.2.2 Objetivos específicos

- Implementar por primera vez en el país una metodología de Real Time PCR para detectar y discriminar las variantes 2c y 2a circulantes en Uruguay.
- Evaluar la efectividad y sensibilidad relativa de la nueva metodología con respecto a la metodología convencional de PCR-RFLP.
- Analizar las variantes circulantes en el país durante el 2014.

1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

1.3.1 Estrategia de investigación

Para el desarrollo de un sistema de detección y caracterización en un solo paso basado en Real Time PCR se realizó un análisis bioinformático en el cual se alineó la región codificante de las VPs correspondientes a las cepas CPV-2a y CPV-2c uruguayas previamente caracterizadas. Se diseñó un par de cebadores capaces de amplificar un fragmento de aproximadamente 100 pb que contiene el codón 426 de VP2 y dos sondas TaqMan MGB® capaces de diferenciar ambas variantes. La metodología fue puesta a punto con muestras previamente caracterizadas y luego se aplicó en las muestras que ingresaron durante el 2014.

1.3.2 Muestras

1.3.2.1 Muestras de campo

Durante el 2014 se recibieron un total de 38 muestras de materia fecal provenientes de canes con sintomatología clínica de Parvovirus (Tabla 1.3). Las muestras se almacenaron a -20°C, cada una acompañada de una ficha técnica con los datos del canino afectado, síntomas clínicos y esquema de vacunación. Uno de los casos (CPV-506) murió y fue necrosado, obteniéndose muestras de hígado, pulmón, corazón, intestino, riñón y cerebro. La necropsia fue llevada a cabo por veterinarios especializados en el marco de una colaboración que nuestro grupo mantiene con el Dr. Alejandro Benech del Hospital Veterinario (Facultad de Veterinaria) (apartado 1.4.3).

Dos muestras positivas previamente genotipificadas por PCR-RFLP y secuenciación completa del genoma, una 2a (CPV461 - JF906814.1), y otra 2c (CPV-467) fueron utilizadas para la estandarización del ensayo y como control positivo. Como control negativo se utilizaron dos muestras negativas del 2013 (CPV-466 y 474).

1.3.2.2 Muestras para el ensayo de especificidad

Se realizaron extracciones del genoma de otros patógenos caninos a partir de una muestra vacunal de Rabia (Canisan R – Laboratorios Santa Helena) y una vacuna combinada de Leptospira canina y Coronavirus (Canisan L6+C – Laboratorios Santa Helena). También se utilizó una muestra de ADN CPV-2b de origen brasilero (apartado 1.4.1.3).

Metodologías para el diagnóstico y la caracterización de CPV

1.3.3 Extracción de ADN viral

1.3.3.1 Extracción de ADN por el método “fast boiling”

Para la extracción del genoma viral se aplicó una variante del método de extracción descrito por Schunck et al. en 1995. Las muestras se homogenizaron en 1mL de 1X PBS (buffer fosfato salino), pH=7,5 y se sometieron a ebullición durante 10 minutos con el fin de liberar los componentes celulares, seguido de un enfriamiento en hielo durante 5 minutos. Luego se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos para precipitar remanentes celulares y otros posibles contaminantes. Los sobrenadantes fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

1.3.3.2 Extracción de ADN con kit Zymo

Para extraer el genoma viral a partir de distintos tejidos y de muestras vacunales, se realizó una extracción utilizando el kit *Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research)* aplicando el protocolo descrito por el fabricante para la extracción de ADN a partir de fluidos corporales o tejidos sólidos según corresponda. El ADN obtenido se eluyó en 50µL de agua libre de ADNasas y se almacenó a -20°C.

1.3.4 Amplificación por Real Time PCR

1.3.4.1 Diseño de cebadores y sondas

En el diseño de esta metodología se contó con el asesoramiento del Mag. Gonzalo Tomás. Los cebadores y sondas fueron diseñados mediante alineamientos de la región codificante de las VPs correspondientes a las cepas 2a y 2c. El alineamiento se llevó a cabo con el algoritmo *ClustalW* utilizando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013). Se determinó la región a amplificar mediante análisis e inspección visual de los alineamientos, esta región se suministró al software *PrimerExpress 3.0 (Applied Biosystems™)* y se obtuvieron diferentes secuencias de posibles cebadores y sondas. Se analizó y comparó la formación de estructuras secundarias y dímeros utilizando el software *OligoAnalyzer 3.1* de IDT (*Integrated DNA Technologies*).

El diseño experimental requiere de dos sondas, cada una marcada con un fluorocromo específico para cada variante. Las sondas emiten señales de fluorescencia a diferentes longitudes de onda para detectar las distintas señales y posibilitar la diferenciación. Para ello se utilizaron sondas de ligando de unión al surco menor TaqMan MGB® (*Minor Groove Binder*). La función principal de esta modificación es aumentar la temperatura de desnaturalización de las sondas (Afonina et al., 1997; Lukhtanov et al., 1997). Esto permite que sean más cortas, y que existan importantes diferencias de temperatura de fusión (T_m) entre las sondas que se aparean perfectamente y las que no lo hacen.

Cada sonda TaqMan MGB® contiene un fluorocromo en el extremo 5' y un *quencher* no fluorescente (NFQ) en su extremo 3' que absorbe la fluorescencia

proveniente del fluorocromo al que está ligado, emitiendo en respuesta, energía en forma de calor.

Las sondas son complementarias a la misma región dentro del amplicón donde hay dos polimorfismos simples que diferencian 2c y 2a. Durante la reacción, cada sonda se hibrida de manera específica con su secuencia complementaria. La polimerasa que se utiliza en este tipo de ensayos, *AmpliAq Gold® DNA Polymerase*, con capacidad exonucleasa, hidroliza las sondas hibridadas al ADN, separando el fluorocromo del *quencher* y permitiendo la emisión de la señal (Figura 1.6). Por el contrario, las sondas que no son perfectamente complementarias no hibridan eficientemente y por lo tanto, no son degradadas por la polimerasa, manteniendo ligados el fluorocromo y su *quencher*.

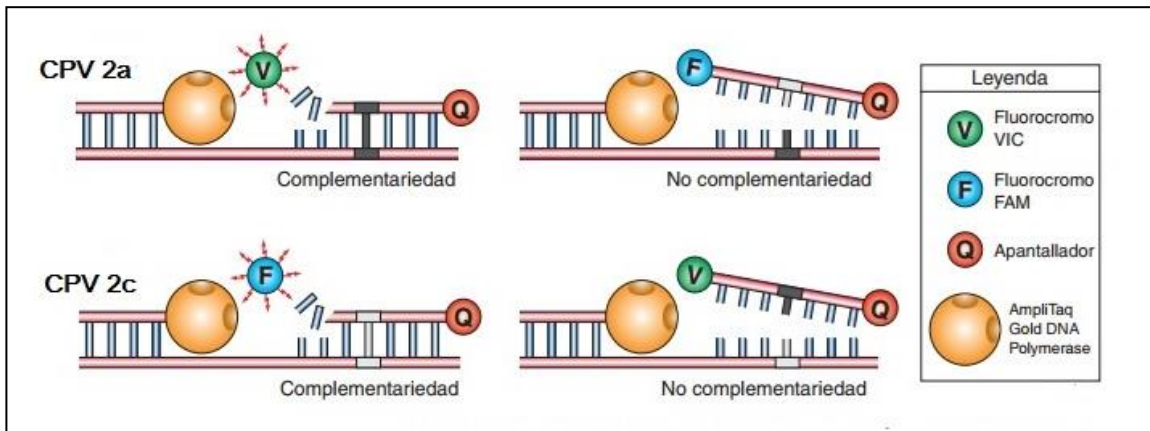


Figura 1.6. Representación esquemática de los resultados de complementariedad y no complementariedad entre las secuencias de variantes y sondas en el experimento de caracterización. Modificada del sitio web

http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_053238.pdf.

1.3.4.2 Reacción de Real Time PCR

Esta reacción fue realizada en un termociclador *7500 Real Time PCR System* (*AppliedBiosystems™*) y analizada con el programa *7500 v2.0.3*.

Cada muestra se realizó por duplicado. El mix de la reacción tiene un volumen final de 25µL. Se utilizó *Master Mix HotRox 2x* (*AppliedBiosystems™*), un mix optimizado de uso directo que contiene todos los componentes necesarios para la reacción (ADN polimerasa Taq, buffer de PCR y 7 mg/mL de MgCl₂), excepto el molde de ADN, sondas y cebadores. También incluye un fluorocromo de referencia (ROX) que se utiliza para normalizar la señal de fluorescencia en el equipo de Real Time PCR.

1.4 RESULTADOS

1.4.1 Metodología de diagnóstico y caracterización basada en Real Time PCR

1.4.1.1 Diseño de cebadores y sondas

Se alinearon 15 secuencias 2a comprendidas entre el 2010-2013, y 40 secuencias 2c del 2006-2012 (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Secuencias uruguayas analizadas en el alineamiento para el diseño de sondas y cebadores (Maya et al., 2013; Pérez et al., 2007).

Año	Variante	Nº de secuencias
2006	2c	5
2007	2c	4
2008	2c	4
2009	2c	6
2010	2a	4
	2c	7
2011	2a	6
	2c	8
2012	2a	4
	2c	6
2013	2a	1

La comparación de las secuencias permitió detectar una región conservada en ambas variantes que se utilizó para el diseño de los cebadores y sondas (Figura 1.7). Los cebadores delimitan un fragmento de 118 pb y su secuencia nucleotídica es la siguiente:

- Cebador directo 5´ GGAAGATATCCAGAAGGAGATTGG 3´
- Cebador reverso 5´ GGAGGTA AACAGGAATTA ACTATACTAA 3´

El amplicón incluye la región donde se encuentran los cambios nucleotídicos del aminoácido 426 de VP2, marcadores de las variantes 2c y 2a (G/A y A/T, respectivamente). En base a ello se diseñaron dos sondas que se diferencian en dos nucleótidos (G/A y A/T) cercanos al extremo 3´, y tienen la siguiente secuencia:

- Sonda 2c: 5´_ CCTTCCTGTAACAGAAG 3´ (Fluorocromo 6-FAM™ 5´, 6-carboxifluoresceína - emisión: 522 nm)
- Sonda 2a: 5´_ CCTTCCTGTAACAAATG 3´ (Fluorocromo VIC® 5´ - emisión: 554 nm)

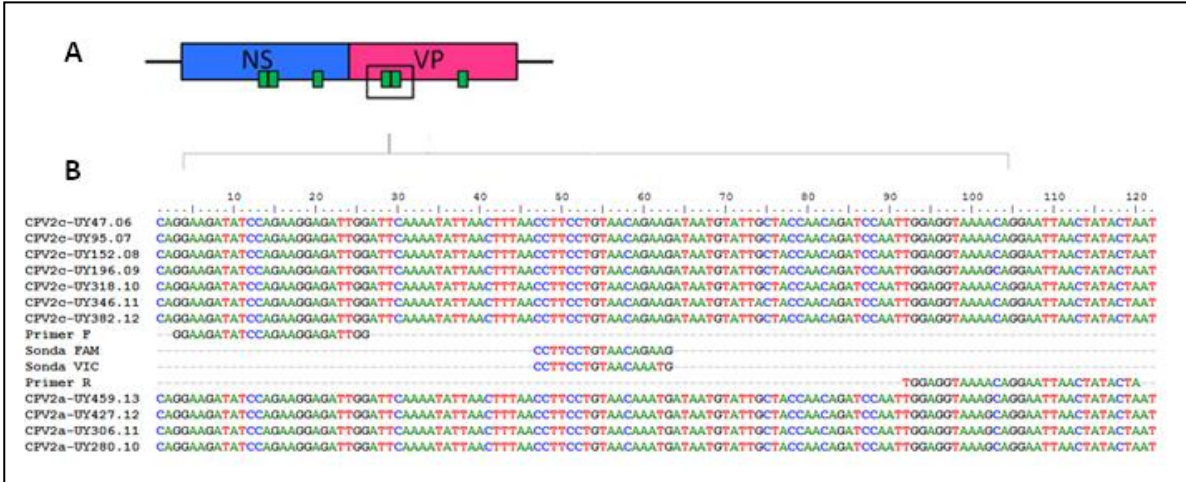


Figura 1.7. A) Esquema general del genoma de CPV, indica la región del genoma a partir del cual se realizaron los alineamientos para el diseño de cebadores y sondas, en verde se representan cambios nucleotídicos entre 2c y 2a. B) Alineamiento de sondas y cebadores con secuencias de distintos años.

Tabla 1.5. Posición nucleotídica en el genoma de referencia CPV (JF906814.1) de los cebadores y sondas diseñados.

Oligo diseñado	Posición en el genoma (pb)
Cebador F	3734 – 3756
Cebador R	3823 – 3850
Sonda 2a/2c	3777 – 3793

1.4.1.2 Estandarización de condiciones de reacción

Se estandarizó el ensayo con dos muestras positivas, una correspondiente a la variante 2a (CPV-461) y otra a la variante 2c (CPV-467). Para ello fue preciso variar las concentraciones de reactivos y molde a utilizar. La concentración de sonda se modificó en un rango de 3-5 μM ; el volumen de ADN molde se varió en un rango de 1-3 μL . Las condiciones que resultaron de la estandarización se muestran en las tablas 1.6a y 1.6b.

Tabla 1.6a. Concentraciones y volúmenes estandarizados para el ensayo de Real Time PCR.

Reactivo	Concentración final (μM)	Volumen (μL)
Master Mix 2x (7mM MgCl ₂)	1x	12,5
Sonda 2a/2c (100 μM)	5	1,25
ADN	--	1
H₂O (Vf)	--	25

Tabla 1.6b. Temperaturas y ciclado estandarizados para el ensayo de Real Time PCR

Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
60	1'	
95	10'	
95	15''	40
62	1'	
60	1'	

La estandarización nos permitió obtener para la muestra 2a un incremento en la fluorescencia de VIC, sin observar incremento inespecífico de la fluorescencia de FAM y de la misma forma, para la muestra 2c se observó únicamente un incremento en la fluorescencia de FAM (Figura 1.8).

Las reacciones en las que se utilizó el ADN de la muestra negativa no mostraron incremento en la fluorescencia de ninguna de las dos sondas, descartando posibles inespecificidades (en presencia del genoma del huésped y el resto del genoma viral). El mismo resultado fue obtenido para todas las reacciones blanco de PCR, descartando las posibles contaminaciones en el ensayo (Figura 1.8).

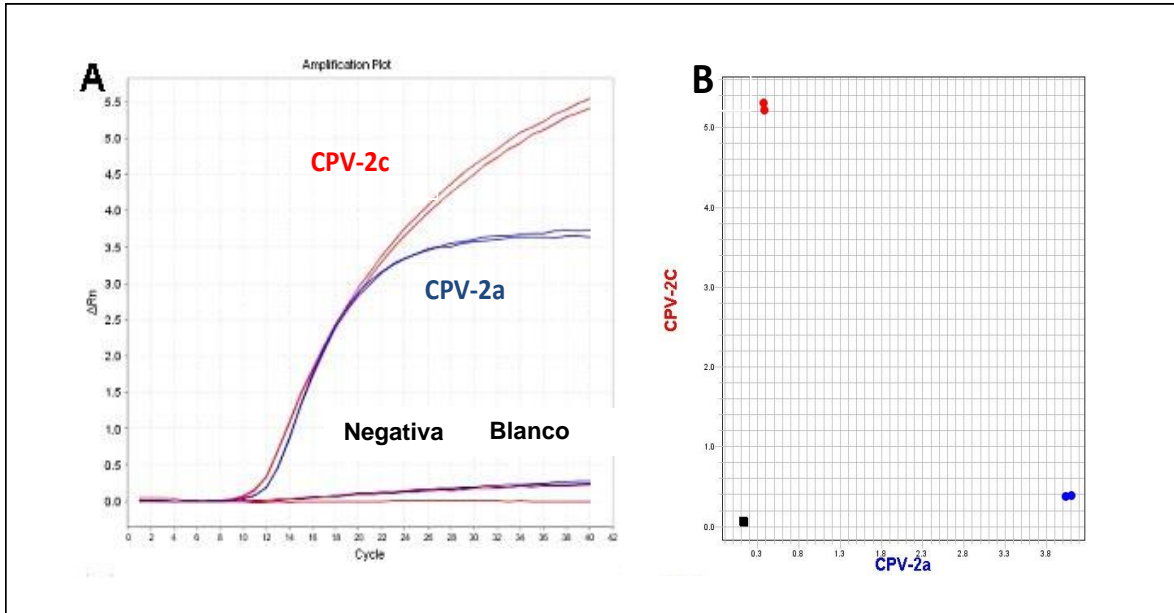


Figura 1.8. A) Gráfica de índice de fluorescencia en función del número de ciclos obtenida en el ensayo de diagnóstico y caracterización por Real Time PCR. Se observan los valores de emisión de fluorescencia obtenidos con las muestras 461 (2a- azul) y 467 (2c- rojo), ambos por duplicado. Ausencia de emisión de fluorescencia observada en una muestra negativa y blanco. B) DOT PLOT indicando las variantes resultantes (2a – azul; 2c – rojo; negativas – negro).

El ensayo diferencia claramente las muestras negativas y positivas, identificando la variante correspondiente a cada muestra positiva. Las muestras 461 y 467 fueron utilizadas posteriormente como controles positivos durante la aplicación del método en las muestras de campo.

1.4.1.3 Determinación de la especificidad del método

Luego de estandarizar las condiciones de reacción se procedió a realizar un ensayo de especificidad utilizando la otra variante de CPV, 2b y muestras vacunales de otros patógenos. El genoma de la variante 2b y las muestras vacunales de Rabia, Coronavirus y Leptospira canina no mostraron incremento de fluorescencia para ninguna de las dos sondas (Figura 1.9).

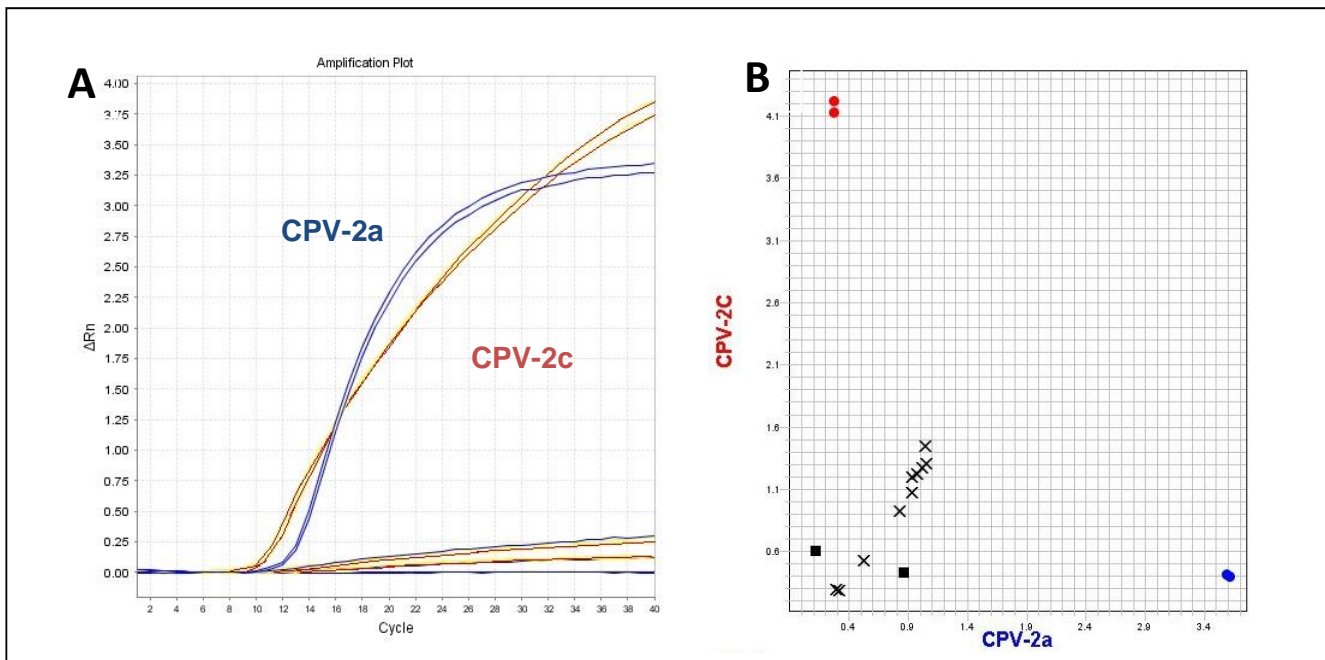


Figura 1.9. A) Gráfica de índice de fluorescencia en función del número de ciclos obtenida en el ensayo de especificidad. Se observan los valores de emisión de fluorescencia de los controles positivos (2a - azul y 2c - rojo, ambos por duplicado). Ausencia de emisión de fluorescencia observada tanto en el blanco como las muestras vacunales y variante 2b. B) *DOT PLOT* indicando las variantes resultantes (2a – azul; 2c – rojo; negativas – negro).

1.4.2 Aplicación del ensayo por Real Time PCR en muestras de campo

Mediante la aplicación de esta técnica estandarizada de Real Time PCR se detectó y caracterizó el genoma viral de CPV en 32 de las 38 muestras que ingresaron en nuestro laboratorio durante el 2014 (Tabla 1.3). Como se observa en la tabla, la totalidad de las muestras positivas analizadas durante este año resultaron ser de la variante CPV-2a.

Tabla 1.3. Se indican las 38 muestras analizadas en el laboratorio y los resultados obtenidos por Real Time PCR. Se detallan algunos datos de la ficha técnica de los canes analizados.

Muestra	Procedencia	Fecha (2014)	Edad (meses)	Última vacunación	Raza	Real Time
484	C. Valdense	Marzo	3	31/1	Cruza	Positiva 2a
485	C. Valdense	Marzo	3	31/1	Caniche	Positiva 2a
486	C. Valdense	Febrero	2	8/2	Labrador	Positiva 2a
487	C. Valdense	Febrero	4	Sin vacunas	Mastín	Positiva 2a
488	Canelones	Marzo	4	7/3	Cruza	Positiva 2a
489	Canelones	Febrero	3	3/2	Pitbull	Positiva 2a
490	Montevideo	Marzo	2	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a
491	Montevideo	Abril	3	Sin datos	Dogo	Negativa
492	C. Valdense	Marzo	4	3/2	Labrador	Positiva 2a
493	Montevideo	Marzo	--	Sin datos	Cruza	Positiva 2a
494	N. helvecia	Marzo	13	15/8	Cruza	Negativa
495	Canelones	Abril	3	Sin datos	Cruza	Positiva 2a
496	Montevideo	Abril	5	21/2	Cimarrón	Positiva 2a
497	Montevideo	Abril	4	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a
498	Montevideo	Abril	2	Sin vacunas	Golden	Positiva 2a
499	Montevideo	Abril	2	Sin vacunas	Golden	Positiva 2a
500	Canelones	Mayo	3	Sin datos	Pitbull	Positiva 2a
501	Canelones	Mayo	8	Sin datos	Cruza	Positiva 2a
502	Montevideo	Abril	7	27/12	Labrador	Positiva 2a
503	Montevideo	Mayo	5	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a
504	Montevideo	Mayo	2	Sin vacunas	Labrador	Positiva 2a
505	Montevideo	Mayo	5	13/3	Cruza	Positiva 2a
506	Rocha	Mayo	4	Sin vacunas	Labrador	Positiva 2a
507	Montevideo	Junio	88	24/4	Cruza	Negativa
508	Canelones	Junio	2	Sin vacunas	Cocker	Positiva 2a
509	Montevideo	Junio	4	20/6	Cruza	Positiva 2a
510	Montevideo	Julio	38	2011	Rottweiler	Negativa
511	Montevideo	Julio	3	3/7	O. alemán	Positiva 2a
512	Montevideo	Agosto	3	Sin datos	Labrador	Positiva 2a
513	Montevideo	Agosto	1	Sin datos	Cruza	Positiva 2a
514	Montevideo	Setiembre	65	17/5	Cruza	Negativa
515	Montevideo	Setiembre	7	9/6	Labrador	Positiva 2a
516	Montevideo	Setiembre	4	25/7	Mastín	Positiva 2a
517	Canelones	Octubre	3	13/9	Cruza	Positiva 2a
518	Montevideo	Octubre	7	24/5	Cruza	Positiva 2a
519	Canelones	Octubre	3	26/9	Cruza	Positiva 2a
520	Colonia	Octubre	5	29/8	O. alemán	Positiva 2a
521	Canelones	Octubre	4	23/8	Caniche	Positiva 2a
522	Canelones	Octubre	4	23/9	Pitbull	Negativa

1.4.3 Aplicación en muestras de distintos tejidos

La muestra de materia fecal CPV-506 procedente de Rocha fue diagnosticada como positiva y caracterizada como 2a. En pocos días, el animal murió y fue sometido a una necropsia. Las muestras de varios tejidos, incluyendo hígado, pulmón, corazón, intestino, riñón y cerebro se sometieron a un ensayo de Real Time PCR, aplicando la metodología recientemente estandarizada. Como resultado se obtuvo para cada matriz un aumento en la emisión de fluorescencia por parte de la sonda con el fluorocromo VIC (correspondiente a la variante 2a) sin interferencia de emisiones inespecíficas (Figura 1.10).

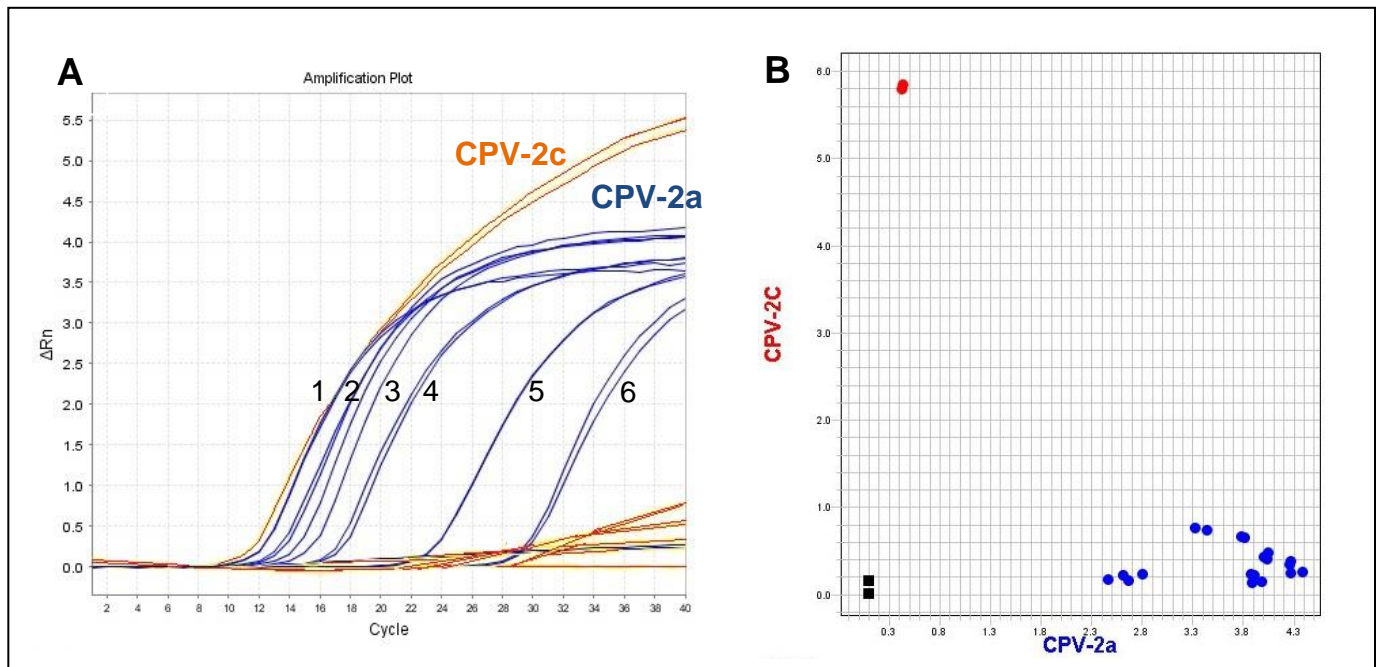


Figura 1.10. A) Gráfica de índice de fluorescencia en función del número de ciclos obtenida a partir de los distintos tejidos. Se observan los valores de emisión de fluorescencia de los controles positivos (2a - azul y 2c - rojo, ambos por duplicado). Se Indica con números la matriz correspondiente a cada curva. 1- Intestino, 2- pulmón, 3-hígado, 4-corazón, 5-riñón y 6-cerebro. No se observó emisión de fluorescencia en el control negativo. B) *DOT PLOT* indicando las variantes resultantes (2a – azul; 2c – rojo; negativas – negro).

1.5 DISCUSIÓN

1.5.1 Parvovirus canino

CPV presenta una dinámica particular en Uruguay que se caracteriza por cambios en la circulación y prevalencia de las variantes. Desde el 2007 hasta el 2010 existió una población homogénea con la circulación de una variante 2c de origen europeo y a partir del 2010 emerge una variante 2a de origen asiático generando una población heterogénea (Pérez et al., 2007; Pérez et al., 2012; Maya et al., 2013). Este escenario evolutivo sustenta el relevamiento constante de CPV en el país y justifica el desarrollo de metodologías rápidas, específicas y sensibles, adaptadas a la realidad nacional.

1.5.2 Metodologías de diagnóstico y caracterización

La metodología de diagnóstico y caracterización empleada en Uruguay se basa en la técnica de PCR-RFLP (Pérez et al., 2012). Esta técnica es efectiva y confiable, ampliamente utilizada a nivel mundial y nos ha permitido realizar un correcto relevamiento durante los años 2006-2014 (Maya et al., 2013; Pérez et al., 2007; Pérez et al., 2012). Este tipo de ensayo, basados en la detección de productos de PCR en tiempo final mediante electroforesis e intercalación con bromuro de etidio, suelen tener menor sensibilidad, rapidez y reproducibilidad que las técnicas de Real Time PCR (Aberham et al., 2001; Gruber et al., 1998). Además, la técnica de Real Time PCR permite realizar una curva de calibración y cuantificar la carga viral.

Han sido desarrolladas diferentes metodologías basadas en Real Time PCR para el estudio de Parvovirus a nivel mundial. Algunas involucran el uso de agentes intercalantes de ADN como el *SYBR-Green*. Este tipo de técnicas fueron aplicadas para la detección y cuantificación del genoma viral de CPV a partir de materia fecal (Kumar and Nandi, 2010). Con la misma química, Lin et al (2014) implementaron un método de detección y diferenciación en simultáneo de genomas de Parvovirus canino, felino (FPV) y porcino (PPV) (Lin et al., 2014).

La técnica de Real Time PCR con sondas de hidrólisis TaqMan fue implementada en primera instancia en el 2005. Se aplicó con el objetivo de diagnosticar el genoma viral de CPV, independientemente de las variantes implicadas (Decaro et al., 2005b). Usando el mismo tipo de sondas, se desarrollaron metodologías para la detección y diferenciación simultánea de Parvovirus canino y Parvovirus felino (Streck et al., 2013).

Otro tipo de sondas de hidrólisis que se han utilizado en este modelo viral son las sondas de discriminación alélica conjugadas con MGB. Una de sus primeras aplicaciones fue dirigida a la caracterización de variantes usando tres sondas (2a, 2b y 2c). El experimento consistió en dos reacciones de Real Time PCR, en la primera se diferencian 2a/2b (4062A→G) y en la otra 2b/2c (4064T→A) (Decaro et al., 2006b). Diseños experimentales similares fueron implementados con el propósito de discriminar

entre la cepa vacunal CPV-2 y las muestras de campo (2a, 2b y 2c), para ello se amplificó una región de VP2 conservada entre las variantes pero que difiere de CPV-2, y se diseñó una sonda específica para cada caso (Decaro et al., 2006a). Otras aplicaciones apuntaron a diferenciar Parvovirus caninos y felinos entre sí (Decaro et al., 2008a); y también con el fin de discriminar entre distintas variantes genéticas dentro de una variante antigénica (CPV-2c con una mutación sinónima/ CPV-2c original) (Decaro et al., 2013) y para detección de coinfecciones de CPV con otros patógenos virales (Gizzi et al., 2014).

Otros desarrollos tuvieron el objetivo de identificar y caracterizar las variantes presentes en un determinado país, como modo de relevamiento y monitoreo rápido y específico de la población viral (Decaro et al., 2008b; Hong et al., 2007; Touihri et al., 2009). Con el mismo objetivo, en este trabajo, se estandarizó una técnica de diagnóstico y caracterización basada en el uso de sondas de hidrolisis TaqMan MGB® adaptada a las cepas circulantes y a la situación epidemiológica en Uruguay. Se diseñaron dos sondas, una para cada variante circulante, que detectan y diferencian 2c y 2a en una única reacción.

Si bien las sondas y cebadores fueron diseñados en base a los alineamientos con secuencias uruguayas, el alineamiento con cepas de 2c y 2a provenientes de otros países sudamericanos (datos nos mostrados), reveló que nuestro diseño experimental podría ser aplicado también en muestras con procedencia de Argentina, Brasil y Ecuador.

Con la finalidad de implementar esta metodología de forma rutinaria para el relevamiento en nuestro laboratorio, realizamos la comparación de este ensayo con la técnica utilizada hasta el momento, PCR-RFLP. El método basado en PCR-RFLP diseñado por Pérez et al. (2012), si bien es confiable y efectivo, requiere de una gran cantidad de pasos (Tabla 1.7). Por otro lado, la metodología basada en Real Time PCR cuenta con la ventaja de ser directa y rápida (Tabla 1.8).

La comparación de los tiempos requeridos entre ambos métodos indica claramente una mayor rapidez del ensayo de Real Time PCR. Este implica un único paso una vez extraído el genoma, y requiere un tiempo total de 3 horas y media, mucho menor al necesario para caracterizar mediante PCR-RFLP (aproximadamente 8-9 horas).

Tabla 1.7. Lista de pasos que incluye el método PCR-RFLP para la caracterización de una muestra, acompañados del tiempo de manipulación e incubación/ciclado estimado para cada uno. Los tiempos pueden variar según el número de muestras que se analiza a la vez.

Pasos	Tiempo estimado (manipulación + incubación y/o ciclado)
Extracción del genoma viral (Fast boiling) y posteriores diluciones 1/5 y 1/10	1 hora y cuarto
Amplificación por PCR tiempo final	3 horas
Visualización del gel de diagnóstico	40 minutos
Digestión con enzimas de restricción	2 horas y media
Visualización del gel de caracterización	1 hora

Tabla 1.8. Lista de pasos que incluye el método Real Time PCR para la caracterización de una muestra, acompañados del tiempo de manipulación e incubación/ciclado estimado para cada uno.

Pasos	Tiempo estimado (manipulación + incubación y/o ciclado)
Extracción del genoma viral (Fast boiling), uso directo	1 hora
Amplificación por Real Time PCR e hibridación de sondas	2 horas y media

Además, se compararon los costos requeridos por cada metodología. Se observó que a pesar de que los tubos y reactivos del ensayo de Real Time PCR son más caros (especialmente las sondas), la forma de visualización de los resultados es mucho más económica. En Real Time PCR los resultados son visualizados bajo la forma de una curva de intensidad de fluorescencia vs número de ciclos. El procesamiento de los datos es realizado de forma automática por el software *AppliedBiosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (AppliedBiosystems™)*. Mientras que el ensayo de PCR-RFLP requiere el uso de una enzima de restricción y la visualización de los resultados mediante dos electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio, lo cual aumenta los costos del ensayo en relación con Real Time PCR. Otra ventaja que surge de la visualización automática de los resultados de Real Time PCR es evitar la exposición del manipulador ante agentes intercalantes de ácidos nucleicos como el bromuro de etidio y se evita la manipulación del producto amplificado post-PCR, lo cual que es una importante fuente de contaminación.

1.5.3 Ensayo de especificidad del método basado en Real Time PCR

Este ensayo confirmó que la metodología desarrollada es específica para la detección de las variantes 2c y 2a, no detectando la variante 2b u otros patógenos caninos (Figura 1.9).

En el ensayo de especificidad aplicado al genoma de otros patógenos caninos no se observó aumento en la fluorescencia de las sondas. Esto descarta las posibles hibridaciones cruzadas o inespecificidades por parte de las sondas en presencia del genoma de otro patógeno viral, evitando falsos positivos. Resultados similares se observaron para la variante 2b, donde no se detectó fluorescencia con ninguna de las dos sondas. Este resultado es un avance con respecto al método de PCR-RFLP, debido a que este último discrimina únicamente entre la variante 2c y las demás (2, 2a y 2b). Por lo tanto, una muestra 2b no puede ser diferenciada de 2a y esto genera la necesidad de recurrir a una técnica complementaria, como secuenciación, para confirmar todas las muestras 2a (84% de las ingresadas este año). Por el contrario, el ensayo de Real Time PCR requiere de la aplicación de una técnica complementaria para confirmar únicamente los resultados negativos (16% este año). De esta forma se logra descartar en un 100% la variante 2b aplicando una metodología alternativa en el mínimo de casos posibles.

1.5.4 Aplicación del ensayo por Real Time PCR en muestras de campo

Una vez estandarizada la metodología, comenzó a aplicarse en todas las muestras previamente genotipificadas por el método convencional, PCR-RFLP. El relevamiento aplicando la metodología de PCR-RFLP durante el 2014 fue realizado en el marco de un proyecto PAIE del cual fui responsable (Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil) financiado por CSIC.

Los resultados obtenidos con ambas metodologías fueron comparados entre sí obteniendo un 100% de concordancia (Tabla 1.9).

Tabla 1.9. Se muestra la comparación de los resultados obtenidos por PCR-RFLP y Real Time PCR. También incluye datos parciales de las fichas técnicas de los perros diagnosticados.

Muestra	Procedencia	Fecha (2014)	Edad (meses)	Última vacunación	Raza	PCR/RFLP	Real Time
484	C. Valdense	Marzo	3	31/1	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
485	C. Valdense	Marzo	3	31/1	Caniche	Positiva 2a	Positiva 2a
486	C. Valdense	Febrero	2	8/2	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
487	C. Valdense	Febrero	4	Sin vacunas	Mastín	Positiva 2a	Positiva 2a
488	Canelones	Marzo	4	7/3	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
489	Canelones	Febrero	3	3/2	Pitbull	Positiva 2a	Positiva 2a
490	Montevideo	Marzo	2	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
491	Montevideo	Abril	3	Sin datos	Dogo	Negativa	Negativa
492	C. Valdense	Marzo	4	3/2	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
493	Montevideo	Marzo	--	Sin datos	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
494	N. helvecia	Marzo	13	15/8	Cruza	Negativa	Negativa
495	Canelones	Abril	3	Sin datos	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
496	Montevideo	Abril	5	21/2	Cimarrón	Positiva 2a	Positiva 2a
497	Montevideo	Abril	4	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
498	Montevideo	Abril	2	Sin vacunas	Golden	Positiva 2a	Positiva 2a
499	Montevideo	Abril	2	Sin vacunas	Golden	Positiva 2a	Positiva 2a
500	Canelones	Mayo	3	Sin datos	Pitbull	Positiva 2a	Positiva 2a
501	Canelones	Mayo	8	Sin datos	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
502	Montevideo	Abril	7	27/12	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
503	Montevideo	Mayo	5	Sin vacunas	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
504	Montevideo	Mayo	2	Sin vacunas	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
505	Montevideo	Mayo	5	13/3	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
506	Rocha	Mayo	4	Sin vacunas	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
507	Montevideo	Junio	88	24/4	Cruza	Negativa	Negativa
508	Canelones	Junio	2	Sin vacunas	Cocker	Positiva 2a	Positiva 2a
509	Montevideo	Junio	4	20/6	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
510	Montevideo	Julio	38	20/11	Rottweiler	Negativa	Negativa
511	Montevideo	Julio	3	3/7	O. alemán	Positiva 2a	Positiva 2a
512	Montevideo	Agosto	3	Sin datos	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
513	Montevideo	Agosto	1	Sin datos	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
514	Montevideo	Setiembre	65	17/5	Cruza	Negativa	Negativa
515	Montevideo	Setiembre	7	9/6	Labrador	Positiva 2a	Positiva 2a
516	Montevideo	Setiembre	4	25/7	Mastín	Positiva 2a	Positiva 2a
517	Canelones	Octubre	3	13/9	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
518	Montevideo	Octubre	7	24/5	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
519	Canelones	Octubre	3	26/9	Cruza	Positiva 2a	Positiva 2a
520	Colonia	Octubre	5	29/8	O. alemán	Positiva 2a	Positiva 2a
521	Canelones	Octubre	4	23/8	Caniche	Positiva 2a	Positiva 2a
522	Canelones	Octubre	4	23/9	Pitbull	Negativa	Negativa

Como se observa en la tabla, el 100% de las muestras positivas fueron 2a. Los resultados positivos de la infección se obtuvieron en perros de diferentes razas y cruza, no se pudo definir ninguna correlación. Por el contrario, sí se observa una correlación negativa entre la infección y la edad. Sólo 4 de las 38 muestras ingresadas correspondieron a perros mayores a un año, y todas resultaron negativas. El 100% de

los casos positivos se detectaron en perros con menos de ocho meses (media \pm desviación estándar, 3.76 ± 1.6 meses). Este hecho es importante porque la Parvovirus es particularmente severa cuando infecta a cachorros, produciendo infecciones a nivel cardíaco. En cachorros de tres a ocho semanas de edad, se observa muchas veces que Parvovirus infecta a las células del miocardio que se encuentran en división activa, lo que puede generar miocarditis. Esto puede inducir en neonatos, arritmia cardíaca, disnea y edema pulmonar, finalizando generalmente en una rápida muerte del animal (Robinson et al., 1979).

Una vez aplicadas las dos metodologías en un total de 38 muestras se procedió a evaluar la especificidad y sensibilidad relativa de la metodología basada en Real Time PCR con respecto a PCR-RFLP. Estos datos se obtienen a partir del cálculo estadístico establecido por Altman & Bland (1994).

- *Especificidad relativa = Positivos / (Positivos + Falsos negativos)*
- *Sensibilidad relativa = Negativos / (Negativos + Falsos positivos)*

Tabla 1.10. Los falsos negativos corresponden a resultados negativos para Real Time, pero positivos para PCR-RFLP; los falsos positivos corresponden a resultados positivos para Real Time, pero negativos para PCR-RFLP.

	Real Time (+)	Real Time (-)	
PCR-RFLP (+)	32	0	32
PCR-RFLP (-)	0	6	6
	32	6	

$$\text{Especificidad relativa} = 32 / (32 + 0) \times 100 = 100$$

$$\text{Sensibilidad relativa} = 6 / (6 + 0) \times 100 = 100$$

Tanto la especificidad como la sensibilidad relativa del método tuvieron un valor de 100%.

1.5.5 Aplicación de Real Time PCR en muestras de distintos tejidos

En este trabajo se logró una correcta caracterización del genoma viral extraído de diversos tejidos del animal (hígado, pulmón, corazón, intestino, riñón y cerebro) aplicando el ensayo de Real Time PCR estandarizado.

Parvovirus ingresa al huésped canino por ruta oro-nasal, seguida de una posterior diseminación a través de tejidos linfoides y torrente sanguíneo, hasta alcanzar la mucosa intestinal y finalmente ser excretado en las heces (Appel and Parrish, 1987). Considerando la patogenia del virus, es esperable encontrar genoma viral en tejidos pertenecientes al sistema digestivo, relacionados al sistema inmune o tejidos muy inervados por vasos sanguíneos. En este estudio se analizaron algunos tejidos que presentan dichas características, tales como intestino, pulmón, hígado, corazón, y riñón. En todos ellos se detectó genoma viral. Dados los valores de Ct (tiempo umbral), y teniendo en cuenta que se utilizaron aproximadamente iguales cantidades de tejido en las extracciones, se puede sugerir una mayor carga de ADN viral en el intestino, y una menor carga en el riñón. Sin embargo, se requiere de la realización de una curva estándar para hacer de este desarrollo un método cuantificable.

Durante mucho tiempo no se encontraron antígenos de CPV en el sistema nervioso central (SNC), lo que llevó a asumir que el virus no tiene acceso a los tejidos que lo componen (Agungpriyono et al., 1999; Url and Schmidt, 2005). Sin embargo, en trabajos posteriores se detectó ADN viral en diferentes tejidos del SNC (cerebro, cerebelo y bulbo), aplicando la metodología de Real Time PCR (Decaro et al., 2007b) o evaluando los títulos de ARNm viral mediante RT-Real Time PCR (Elia et al., 2007). Nuestros resultados confirman esta afirmación debido a que se obtuvo un incremento en la fluorescencia de la sonda 2a en el tejido cerebral.

1.5.6 Análisis de la situación epidemiológica actual en Uruguay

El conjunto de estas dos técnicas permitió, en primera instancia, certificar la alta prevalencia del virus en la población canina uruguaya y, a su vez, realizar un monitoreo representativo, tanto espacial como temporal, de la situación evolutiva de Parvovirus en el país durante el 2014. Sumado a que se contó con la ventaja de que no resultó necesario recurrir a la secuenciación de las muestras caracterizadas como 2a/2b mediante PCR-RFLP, y esto simplificó considerablemente el relevamiento de la población viral durante el 2014

Uruguay presenta un escenario epidemiológico muy particular con la cocirculación de las variantes 2c y 2a entre los años 2010 y 2013. La predominancia de 2a ha ido aumentando considerablemente y a gran velocidad, alcanzando un 26% en el 2010 y un 85% en el 2011 (Pérez et al., 2012). El último registro de la circulación en nuestro territorio de una variante 2c data de julio del 2013. Durante el 2014 todas las muestras fueron caracterizadas como 2a, lo que sugiere que en el 2014 se produjo el

reemplazo completo de la variante 2c, indicando un nuevo escenario epidemiológico en el país (Figura 1.11)

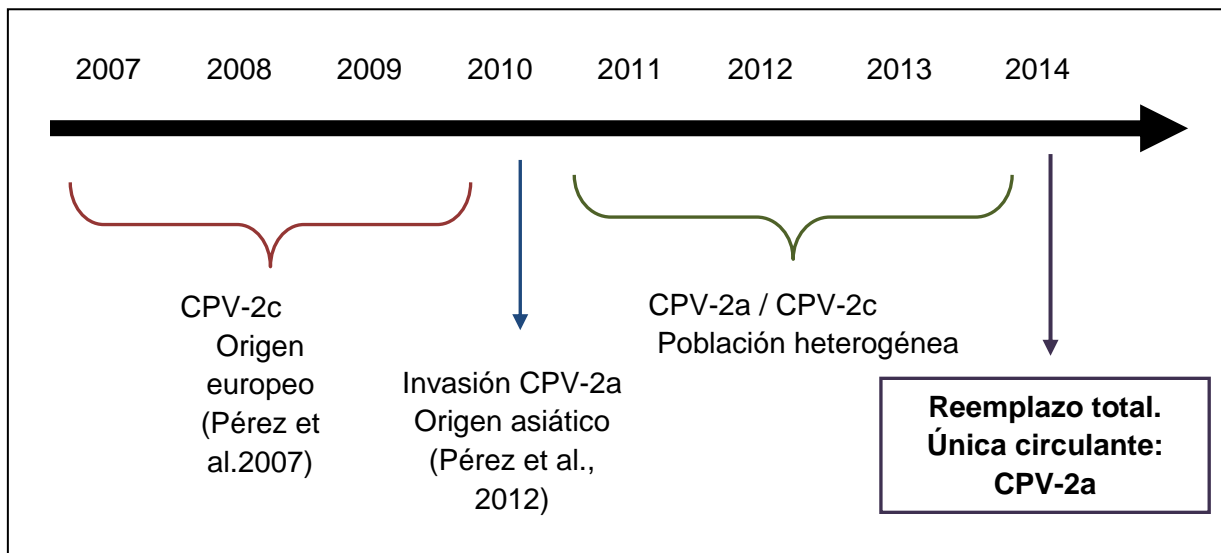


Figura 1.11. Línea de tiempo que describe los acontecimientos evolutivos en Uruguay incluyendo el reemplazo total de la variante 2a revelado en este trabajo.

Este reemplazo ocurrió de forma paulatina, aunque es sorprendente la velocidad en la que se logró desplazar completamente a la variante 2c, teniendo en cuenta que no es un virus de fácil eliminación debido a su gran resistencia ambiental y prevalencia en el entorno en el que se desarrolla la infección. Está demostrado que el virus puede conservar su capacidad infectiva aún luego de permanecer en una muestra de materia fecal durante seis meses a temperatura ambiente (Pollock, 1982). Por este motivo, resulta sorprendente que en menos de cuatro años se haya logrado aparentemente eliminar toda la población viral de CPV-2c.

Si bien el relevamiento realizado aplicando el método de Real Time PCR (y PCR-RFLP) indica que la variante CPV-2c no circula más en nuestro país, no debemos olvidar que durante casi 4 años existió una población heterogénea con la cocirculación de ambas variantes (2c y 2a), generando un ambiente propicio para la ocurrencia de eventos de coinfección y recombinación.

La nueva metodología de Real Time PCR estandarizada nos permitiría detectar casos de coinfección (2c/2a), esperando obtener un incremento en la intensidad de fluorescencia por parte de ambos fluorocromos a la vez.

En cuanto a los casos de muestras recombinantes, primero se debe tener en cuenta que los puntos de recombinación en virus de ADN de cadena simple no suelen ser aleatorios. La mayoría de los sitios de recombinación se encuentran en regiones

intergénicas por permitir recombinaciones menos deletéreas para el organismo (Martin et al., 2011). Se han identificado actualmente recombinantes entre cepas vacunales y cepas de campo o entre CPV y Parvovirus que infectan otros huéspedes como FPV y MEV (Mochizuki et al., 2008; Ohshima and Mochizuki, 2009; Wang et al., 2012).

Nuestro grupo de investigación recientemente implementó metodologías basadas en secuenciación del genoma completo, *deep sequencing* y análisis filogenéticos aplicados en muestras del 2010

-2013 con el fin de detectar cepas recombinantes y coinfectantes. Revelaron la existencia de una cepa coinfectante entre una cepa 2a y una cepa recombinante del tipo NSs-2c/VPs-2a (Pérez et al., 2014).

La metodología de Real Time PCR desarrollada, apunta a identificar las variantes a nivel de la proteína VP2, por tanto, al aplicarla a una muestra recombinante, si la misma fuera del tipo NSs-2c/VPs-2a se detectaría como 2a, y si fuera del tipo NSs-2a/VPs-2c, como 2c. Nuestro relevamiento durante el 2014 indica que ninguna muestra analizada mostró incremento en la fluorescencia de la sonda 2c, esto descarta la presencia de muestras coinfectantes de ambas variantes, y también descarta la presencia de recombinantes del tipo NSs-2a/VPs-2c que deberían ser caracterizadas como 2c.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos sugerir que no hay registros de la variante 2c circulando en la población canina doméstica en Uruguay durante el 2014. Lo que permite reportar el importante evento de reemplazo de la variante 2c europea por la variante 2a asiática, principalmente en la ciudad de Montevideo, origen de la mayoría de las muestras analizadas. Este reemplazo resulta sorprendente debido al corto tiempo transcurrido desde la emergencia de 2a y destaca la ventaja evolutiva que presenta esta variante con respecto a 2c. De todas formas, no nos es posible descartar la variante 2c presente en coinfectantes con una proporción demasiado baja para ser detectada por la metodología; o en huéspedes salvajes no caracterizados, lo que sugiere expandir las investigaciones abarcando huéspedes no domésticos.

1.6 CONCLUSIONES

- Se estandarizó con éxito una metodología basada en Real Time PCR usando sondas de hidrólisis que permiten diagnosticar y caracterizar en una única reacción las muestras biológicas provenientes de caninos con sintomatología clínica de Parvovirus.
- La metodología es rápida, específica y práctica, adaptada a la realidad uruguaya y puede extenderse a toda la región.
- El relevamiento de la población de CPV durante el 2014, reveló que se trata del año de reemplazo total de la variante 2c por parte de la variante 2a, evento nunca antes reportado.
- No se detectaron coinfectantes con proporciones similares de ambas variantes ni recombinantes del tipo NSs 2a/VPs 2c.

1.7 PERSPECTIVAS

- Implementar la técnica de Real Time PCR como método rutinario de diagnóstico y caracterización de CPV en años posteriores.
- Realizar una curva estándar para cuantificar la carga viral con Real Time PCR.
- Evaluar el desarrollo de la infección cuantificando carga viral en los distintos tejidos de un animal infectado.
- Continuar con el análisis de la dinámica evolutiva de Parvovirus canino en Uruguay.

CAPITULO 2

DISTEMPER CANINO

2.1 INTRODUCCIÓN

2.1.1 Virus Distemper canino, agente etiológico

El virus distemper canino (CDV) causa una enfermedad sistémica denominada Distemper canino (CD), Carré, Moquillo o Joven Edad. Junto con la Parvovirus, es una de las infecciones virales con mayor incidencia en canes domésticos, presentando altas tasas de mortalidad y morbilidad (Appel and Summers, 1999). El virus fue aislado por primera vez por Henri Carré a comienzos del siglo XX y actualmente presenta una distribución mundial y ha alcanzado la potencialidad de afectar a todos los carnívoros terrestres (Deem et al., 2000; Appel, 1987). CDV es un virus envuelto que pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, la cual incluye siete géneros con alto impacto en la salud animal y humana, *Aquaparamyxovirus*, *Avulavirus*, *Ferlavirus*, *Henipavirus*, *Morbillivirus*, *Respirovirus* y *Rubulavirus*. CDV pertenece al género *Morbillivirus* (Kerr et al., 2006) que incluye además el virus que produce la enfermedad del sarampión.

2.1.2 Genoma y proteínas virales

El genoma viral de CDV es de ARN de simple cadena, no segmentado, con polaridad negativa y una longitud aproximada de 15.7 Kb. En los extremos 3' y 5' del genoma se localizan regiones no codificantes denominadas *leader* y *trailer* respectivamente, implicadas en las funciones de transcripción y replicación viral (Lamb & Parks, 2007). El genoma contiene seis genes llamados N, P/V/C, M, F, H y L (Figura 2.1), los cuales están separados por regiones intergénicas no codificantes. Cada gen codifica para una única proteína estructural, excepto el gen P/V/C que además de codificar para la proteína estructural denominada fosfoproteína (P), codifica para dos proteínas no estructurales, las proteínas C y V, mediante procesos de corrimiento en el inicio de la transcripción y edición del ARN mensajero, respectivamente. (Bellini et al. 1985; Cattaneo et al., 1989).

El gen N codifica para la proteína nucleocápside, el gen M codifica para la proteína de matriz, el gen F la proteína de fusión, el gen H la proteína hemaglutinina y el gen L la polimerasa viral llamada *large*.



Figura 2.1. Representación esquemática del genoma de CDV indicando los genes que lo componen. (KM280689.1). N (1-1572), P/V/C (1694-3217), M (3325-4332), F (4828-6816), H (6972-8795) y L (8923-15477).

Los genes son transcritos mediante un mecanismo denominado *start-stop* que induce un gradiente transcripcional. El mismo implica el inicio de la transcripción en el primer gen del extremo 3' (N) y luego la interrupción del proceso en cada región intergénica, por escisión de la polimerasa viral. De esta forma los genes próximos al extremo 3' del genoma (N, P/V/C) se transcriben en mayor abundancia que aquellos cercanos al extremo 5' del genoma (H, L) (Anderson and von Messling, 2008).

La proteína nucleocápside (N) se autoensambla sobre el genoma viral (Figura 2.2). Junto con la proteína nucleocápside, se asocian al genoma la polimerasa viral llamada *large* (L) codificada por el gen L, y su cofactor, la fosfoproteína (P) codificada por el gen P/V/S. La proteína matriz (M), codificada por el gen M, se encuentra asociada a la membrana, posicionada por debajo de la envoltura, está implicada principalmente en el ensamblaje de la partícula viral. En la envoltura viral se encuentran dos glicoproteínas transmembrana llamadas hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F) (Figura 2.2) codificadas por los genes H y F respectivamente, que median la interacción, reconocimiento y fusión del virus con la célula huésped. (Lamb & Parks, 2007).

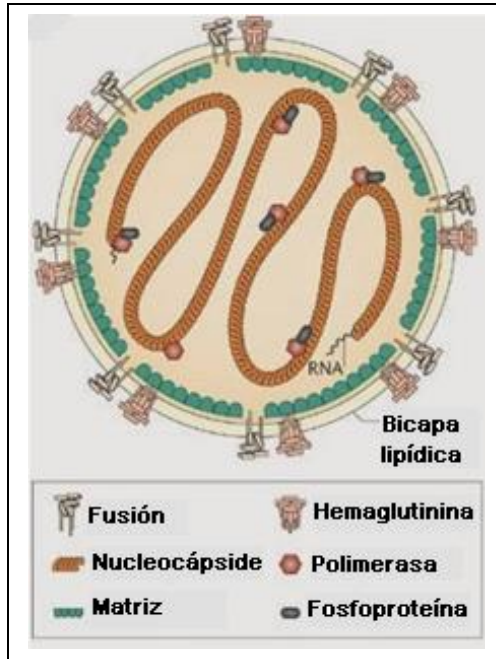


Figura 2.2. Representación esquemática de la estructura viral de CDV indicando las seis proteínas estructurales que lo componen. Modificada de Nature Publishing Group. Nature reviews/Microbiology.

2.1.3 Ciclo viral

El virus reconoce la membrana plasmática de la célula huésped mediante la unión de la hemaglutinina (H) al receptor celular del tipo inmunoglobulina, CD150/SLAM expresado en células del sistema inmunológico (Zipperle et al., 2010).

Luego del reconocimiento y unión con la célula huésped, la proteína H induce cambios conformacionales sobre la proteína F que favorecen su actividad y se desencadena la fusión de la membrana celular con la envoltura viral (Sawatsky and Messling, 2010). Luego de la fusión, las proteínas N, P y L asociadas formando el complejo ribonucleoproteico (RNP) ingresan al citoplasma de la célula huésped, donde comienza la transcripción del genoma viral a partir del extremo 3'. A continuación la ARN polimerasa dependiente de ARN (L) en conjunto con sus cofactores, las fosfoproteínas (P), sintetizan en forma continua los antígenomas que serán utilizados como molde para la producción de nuevos ARN genómicos (Lamb & Parks, 2007). Los genomas virales neosintetizados son encapsidados con las proteínas N, P y L formando nuevamente el complejo RNP y transportados hacia la membrana celular donde se asocian con la proteína M, F y H previamente exportadas a la membrana. Las partículas virales neosintetizadas son liberadas mediante brotación y poseen la capacidad de infectar nuevas células susceptibles (Lamb & Parks, 2007).

2.1.4 Distemper, patogenicidad y cuadro clínico

La principal vía de contagio de Distemper está provocada por la inhalación de aerosoles producto de distintas secreciones de animales infectados. Por lo tanto, tiene acceso en primera instancia al tracto respiratorio donde atraviesa los epitelios para acceder a los órganos linfoides secundarios, y comenzar una etapa de alta proliferación y diseminación a otros tejidos corporales, vía torrente sanguíneo. Alrededor de los primeros diez días post-infección, el virus puede acceder a diversos tejidos corporales, sistema urinario, digestivo y también al sistema nervioso central (SNC) (Figura 2.3) (Appel and Summers, 1999).

La patogenicidad del agente depende, en gran parte, de la intensidad y calidad de respuesta humoral y celular que desarrolla el animal infectado, aspecto que es influido además por su edad y estado de salud.

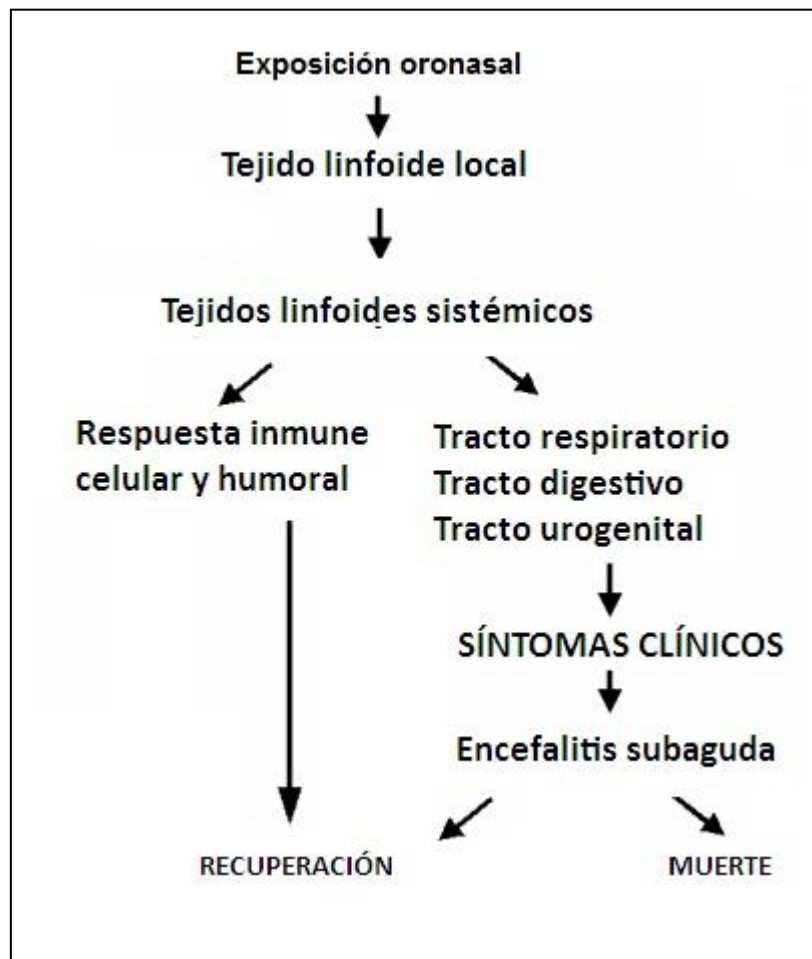


Figura 2.3. Esquema de la patogenicidad de Distemper. Modificado de Appel & Summers (1999).

La aparición y severidad de los síntomas dependen también de la cepa viral, presentando algunas mayor virulencia que otras (Deem et al., 2000). En muchos casos la infección se desarrolla de forma subclínica, sin manifestación de síntomas clínicos o con síntomas más leves, como anorexia, languidez, fiebre y decaimiento. Por otro lado, la forma aguda de la infección compromete principalmente los sistemas respiratorio, gastrointestinal y SNC, con aparición de síntomas clínicos como conjuntivitis, secreciones óculo-nasales, neumonía, diarrea, deshidratación severa y numerosas manifestaciones neurológicas, como rigidez cervical, convulsiones, síntomas vestibulares y cerebrales, ataxia sensorial y mioclonias (Deem et al., 2000).

La inmunosupresión severa asociada a la enfermedad de Distemper aumenta la susceptibilidad a infecciones bacterianas secundarias, lo que contribuye a las elevadas tasas de mortalidad, intensificando muchos síntomas y provocando diferentes cuadros como tos, neumonía, vómitos, diarrea, entre otros (Green et al., 1990).

2.1.5 Variabilidad genética de CDV

La caracterización genética de CDV se basa principalmente en el análisis del gen H, el cual presenta una elevada variabilidad genética, detectándose valores de divergencia aminoacídica de hasta un 10% entre cepas de campo (Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006). En base al análisis de su variabilidad genética se han identificado diferentes linajes circulantes a nivel mundial. El linaje se define como un conjunto de cepas que se agrupan en un mismo clado tras un análisis filogenético y mantienen divergencias aminoacídicas en la proteína H menores al 4% (Martella et al., 2006). Hasta el 2012, se habían identificado ocho linajes circulantes, que mayoritariamente presentan un patrón geográfico, tres en Europa (EU1, EU2 y EU3), dos en Asia (AS1 y AS2), dos en América del norte (NA1 y NA2) y uno en África (África1) (An et al., 2008; V Martella et al., 2006; Woma et al., 2010).

2.1.5.1 Antecedentes del grupo

Nuestro grupo de investigación implementó por primera vez en el país, una metodología de diagnóstico molecular de CD basada en herramientas moleculares. La misma consiste en retrotranscribir el genoma viral (ARN) con cebadores hexaméricos aleatorios (*random primers*) obteniendo así el ADN complementario que se utiliza como molde en una reacción de amplificación por PCR. Para la detección del genoma viral se amplifica un fragmento de 287 pb del gen N (Frisk et al., 1999). La región amplificada es muy conservada, con alta efectividad de amplificación y por lo tanto útil para realizar un diagnóstico confiable y efectivo. Nuestro grupo desarrolló además, una metodología basada en PCR-RFLP que permitió diferenciar entre infecciones por cepas de campo y cepas vacunales (Sarute et al., 2011).

El primer registro de la variabilidad genética de CDV existente en Sudamérica procede de Argentina, donde se analizó la variabilidad genética de un fragmento del

gen H sugiriendo la existencia en ese país de dos posibles genotipos circulantes (Calderón et al. 2007). Posteriormente nuestro grupo, mediante la amplificación del gen H completo confirmó la existencia de dos linajes circulantes en Sudamérica (Panzera et al., 2012). Las cepas uruguayas, argentinas y brasileras están estrechamente relacionadas a las cepas europeas previamente caracterizadas dentro del linaje Europa1 (EU1), el cual fue renombrado como Europa1/Sudamérica1 (EU1/SA1). El segundo linaje, circulante con alta prevalencia únicamente en Argentina, se denominó Sudamérica2 (Panzera et al., 2012).

La caracterización realizada en base al análisis del gen H brinda resultados sólidos y confiables. Sin embargo, el gen H es relativamente largo para su secuenciación automática (1824 pb), tiene bajos niveles de transcripción debido a su posición en el genoma (cerca al extremo 5') y es difícil de amplificar sin previa amplificación en cultivo. Esto llevó a nuestro grupo de investigación a la búsqueda de otras regiones del genoma para ser utilizadas como marcador filogenético. Análisis bioinformáticos permitieron demostrar que un fragmento de 405 pb del gen F que codifica el péptido señal (Fsp) de la proteína de fusión presenta una elevada señal filogenética y puede utilizarse para la caracterización de los linajes (Sarute et al., 2013). Además, por su menor tamaño, este fragmento es más sencillo de amplificar y secuenciar. Basados en el análisis de esta región, nuestro grupo describió un nuevo linaje llamado Sudamérica3 (SA3) presente en muestras de origen ecuatoriano (Sarute et al., 2014a). En el mismo año, basados en el análisis del gen H se determinó la existencia de un cuarto linaje sudamericano circulante en Colombia (Espinal et al., 2014), claramente distinguible de SA1 y SA2. Pocos meses después, basados en el análisis de un fragmento del gen H, nuestro grupo determinó que el linaje colombiano difería además del ecuatoriano (Panzera et al., 2014). Hasta la fecha, los linajes correspondientes a nuestro continente son cuatro, Europa1/Sudamérica1 (EU1/SA1), ampliamente distribuido en Uruguay, Brasil y Argentina; Sudamérica2 (SA2), exclusivo de Argentina; Sudamérica3 (SA3), exclusivo de Ecuador y Sudamérica4 (SA4), exclusivo de Colombia. (Figura 2.4) (Panzera et al., 2014).



Figura 2.4. Mapa político de Sudamérica. Se indican los linajes circulantes en los cinco países en los que se ha realizado la caracterización del virus hasta la actualidad.

Estos estudios revelan que Sudamérica es el continente de mayor diversidad genética con tres linajes propios de la región y uno intercontinental (Panzera et al., 2014). Esta diversidad podría ser aún mayor, considerando que se han realizado caracterizaciones genéticas en tan solo cinco países del continente y la gran mayoría de los estudios se limitan a huéspedes domésticos. De esta forma se destaca la importancia de expandir los estudios de caracterización y extender dichos estudios a otros huéspedes silvestres.

En este proyecto nos propusimos realizar el diagnóstico molecular y la caracterización de CDV utilizando técnicas de RT-PCR de forma de evaluar la situación actual de Distemper en el país.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Análisis de la dinámica evolutiva de CDV en Uruguay durante el 2014.

2.2.2 Objetivos específicos

- Diagnosticar muestras provenientes de animales con sintomatología clínica de Distemper ingresadas durante el 2014.
- Realizar la caracterización genética de muestras positivas.
- Evaluar la situación epidemiológica en el país durante el 2014.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Estrategia de investigación

La extracción del ARN viral se realizó a partir de muestras provenientes de canes con síntomas presuntivos de Distemper. El ARN fue sometido a retrotranscripción y posterior PCR para el diagnóstico y la caracterización. Para el diagnóstico molecular se amplificó un fragmento del gen N (Sarute et al. 2011) y la caracterización genética se llevó a cabo mediante al amplificación de un fragmento del gen F (Fsp) (Sarute et al., 2013). Los amplicones obtenidos fueron enviados a secuenciar y mediante el uso de herramientas informáticas se realizó la edición y ensamblado de las secuencias nucleotídicas. Estas se compararon entre sí y con las secuencias de cepas nacionales y mundiales.

2.3.2 Muestras de campo

Durante el 2014 ingresaron al laboratorio 36 muestras tomadas de canes con sintomatología de la enfermedad (Tabla 2.1). La obtención de las muestras estuvo a cargo de veterinarios especializados con los cuales nuestro grupo mantiene colaboraciones.

2.3.3 Extracción de ARN con kit Zymo

El genoma viral fue extraído a partir de muestras de orina o secreciones óculo-nasales utilizando un kit Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo research) siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Se eluye el ARN en 35 μ L de buffer de elución libre de ARNasas y se conserva a -80°C hasta su uso.

2.3.4 Retrotranscripción

El ARN extraído se sometió a una reacción de retrotranscripción con el fin de obtener el ADN complementario a utilizar como molde en las reacciones de PCR. Se utilizó el kit *RevertAid M-M μ LV Reverse Transcriptase (Fermentas)* usando cebadores hexaméricos aleatorios, (*random primers*) (*Integrated DNA Technologies*).

A continuación se detallan las concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Vol (μ L) /tubo
ARN	--	--	10
R. primers	10 μ M	0.1 μ M	2

Se incubaron durante 5 minutos a 70°C y luego se añadieron los reactivos que se especifican a continuación y se incubó a 42°C por 60 minutos y a 70°C durante 10 minutos.

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Vol (μ L)/ tubo
Buffer	5X	1X	4
dNTPs	10 μ M	1 mM	2
Ribolock	40 U/ μ L	40 U	1
RT	200 U/ μ L	200 U	1

2.3.5 Amplificación por PCR en tiempo final

Metodología de diagnóstico, gen N.

Para la amplificación de un fragmento de 287 pb correspondiente a una región conservada del gen N se utilizaron los cebadores 'Dist F' (directo): 5' ACAGGATTGCTGAGGACCTAT (posición 769-789) y 'Dist R' (reverso): 5' CAAGATAACCATGTACGGTGC (posición 1055-1035) (Frisk et al., 1999). Las concentraciones y volúmenes utilizados para la reacción de PCR fueron los siguientes (de acuerdo a Sarute et al. 2011):

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Vol (μ L) /tubo
Agua (Vf)	--	--	10
Buffer	10x	1x	1
MgCl ₂	25 mM	2 mM	0.8
dNTPs	10 μ M	0.2 μ M	0.2
Dist F	10 μ M	0.3 μ M	0.3
Dist R	10 μ M	0.3 μ M	0.3
Taq	5 U/mL	1 U/mL	0.2
ADN	--	--	1-3

La reacción se realizó en el termociclador *2720 Thermal Cycler* (*AppliedBiosystemsTM*) con el protocolo de ciclado que se especifica a continuación:

Etapa	Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
1 ^a Desnaturalización	94	3'	
Desnaturalización	94	30''	
Hibridación	49	45''	35
Extensión	72	45''	
Extensión final	72	7'	

Metodologías de caracterización, gen F

Para la amplificación de un fragmento de 681 pb del gen F se utilizaron los cebadores 'F4854' (directo): 5'_TCCAGGACATAGCAAGCCAACA (posición 4854-4876) y 'R5535' (reverso): 5'_GGTTGATTGGTTCGAGGACTGAA (5512-5535). Las concentraciones y volúmenes utilizados para la reacción de PCR son los siguientes (de acuerdo a Sarute et al. 2013):

Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Vol (µL) /tubo
Agua (Vf)	--	--	25
Buffer de reacción	10x	1x	2.5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2
dNTPs	10 µM	0.2 µM	0.5
F4854	10 µM	0.4 µM	1
R5535	10 µM	0.4 µM	1
Taq polimerasa	5 U/mL	1 U/mL	0.5
ADN	--	--	5

Se utilizó el siguiente protocolo de ciclado:

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1 ^{ra} Desnaturalización	94	3'	
Desnaturalización	94	30''	
Hibridación	58	45''	35
Extensión	72	45''	
Extensión final	72	7'	

2.3.6 Visualización de productos de PCR

Los amplicones se visualizaron en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x (Tris, Acetato, EDTA). Se utilizó como agente intercalante bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y luego se visualizó en un transiluminador con luz UV. Como buffer de electroforesis se utilizó TAE 1x (Tris, Acetato, EDTA) y la corrida electroforética se realizó a 90 volts y 150 mA durante 15-20 minutos.

2.3.7 Secuenciación

Los amplicones de 681 pb correspondientes a la región Fsp seleccionados para los análisis de caracterización fueron purificados utilizando el kit Zymo *DNA Clean & Concentrator*TM-5, siguiendo el protocolo determinado por el fabricante para purificación de productos de PCR. Los amplicones purificados se cuantificaron utilizando el espectrofotómetro *NanoDrop2000* (Thermo) y fueron secuenciados en la empresa MacroGen o el servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

2.3.8 Análisis bioinformáticos

2.3.8.1 Alineamiento y comparación de secuencias

Las secuencias parciales del gen de la proteína de fusión obtenidas se editaron y corrigieron utilizando el programa *SeqMan* del paquete *Lasergene 7.0 (DNASTAR)*. El análisis se limitó al fragmento de 405 pb del péptido señal Fsp. Las secuencias se alinearon con el software MEGA6 (Tamura et al., 2013) usando el algoritmo ClustalW y se analizaron las distancias nucleotídicas y aminoacídicas (p-distance) entre ellas y con respecto al resto de las secuencias uruguayas de años anteriores.

2.3.8.2 Análisis filogenéticos

Previo al desarrollo de los análisis filogenéticos se realizó una búsqueda de todas las secuencias disponibles en la base de datos GenBank (*National Center for Biotechnology Information, ncbi.nlm.nih.gov*) bajo el nombre de búsqueda “*Fusion protein canine Distemper*”. Se obtuvieron 336 secuencias provenientes de todo el mundo y se alinearon junto con las obtenidas en este estudio con el software MEGA6 (Tamura et al., 2013), usando el algoritmo ClustalW. Las relaciones filogenéticas se establecieron mediante la construcción de un árbol filogenético de máxima verosimilitud usando el software MEGA6 (Tamura et al., 2013). El modelo de sustitución que mejor se adaptó a este conjunto de datos fue Kimura2 con distribución gamma (G). El soporte estadístico fue calculado usando 500 replicaciones. Se analizó la distribución de los linajes circulantes a nivel mundial y en base a ese análisis preliminar, se seleccionó un número más acotado de secuencias representativas de cada linaje. Estas secuencias se emplearon para realizar un segundo árbol filogenético, más reducido y visualmente legible para la presentación de los resultados

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Aplicación de herramientas moleculares para el diagnóstico de CD

Las 36 muestras de orina o secreciones óculo-nasales que fueron ingresadas al laboratorio, se sometieron a la metodología de RT-PCR para el diagnóstico de CD.

Mediante la amplificación de un fragmento de 287 pb del gen N y visualización por electroforesis en gel de agarosa (Figura 2.5), se detectó la presencia del genoma viral en 16 muestras de las 36 analizadas, lo que representa un 44% del total (Tabla 2.1).

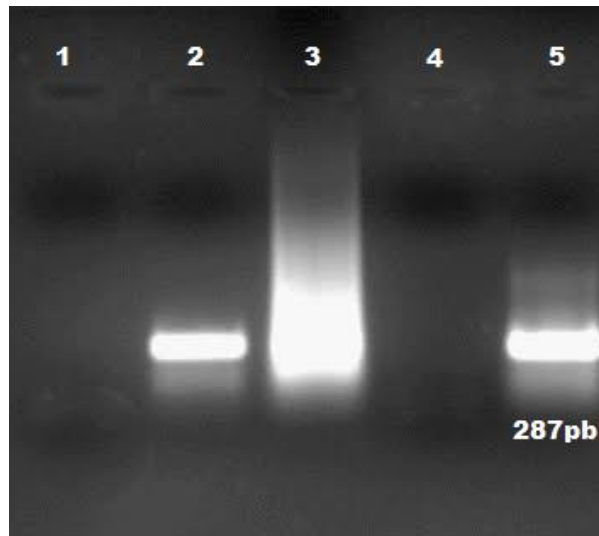


Figura 2.5. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Resultado del diagnóstico de dos muestras positivas de CDV. 1- Blanco, 2-CDV 284, 3-CDV285, 4-CDV286, 5-Control positivo.

Se analizaron las 16 muestras positivas en relación con la edad y raza de los canes infectados. Las 16 muestras positivas correspondían a perros de entre 3 meses y 16 años (media \pm desviación estándar; 7 ± 72 meses). En cuanto a las razas, 8 correspondían a cruzas, 7 eran de raza (pitbull, cimarrón, labrador y cocker) y una de las muestras biológicas carecía de datos al respecto.

Tabla 2.1. Muestras analizadas en el laboratorio. Se indican algunos de los datos del animal y el resultado del diagnóstico. Se resaltan con asterisco las muestras seleccionadas para análisis filogenéticos posteriores.

Muestra	Procedencia	Fecha (2014)	Edad	Raza	Diagnóstico
270	Montevideo	Enero	3 años	Cruza	Negativa
271	Montevideo	Enero	2 años	Cimarrón	Negativa
*272	Montevideo	Febrero	8 meses	Cruza	Positiva
*273	Montevideo	Febrero	SD	Labrador	Positiva
*275	Montevideo	Marzo	SD	Cruza	Positiva
276	Montevideo	Marzo	8 años	Cruza	Negativa
277	Montevideo	Marzo	4 años	Cruza	Negativa
278	Montevideo	Marzo	9 años	Cruza	Negativa
279	Montevideo	Marzo	SD	Cruza	Negativa
280	Montevideo	Abril	4 años	Cruza	Negativa
281	Colonia	Abril	2 años 3m	Bóxer	Negativa
282	Canelones	Abril	SD	Cruza	Positiva
283	Montevideo	Abril	2 años 2m	Rottweiler	Negativa
284	Montevideo	Abril	SD	Cruza	Positiva
285	Montevideo	Abril	10 meses	Cocker	Positiva
286	Montevideo	Abril	7 años	Cruza	Negativa
287	Montevideo	Abril	2 años	Cruza	Negativa
288	Montevideo	Abril	3 años	Cruza	Negativa
289	Montevideo	Abril	5 años	Cruza	Positiva
290	Montevideo	Mayo	6 años	Cruza	Negativa
292	Montevideo	Mayo	SD	Cruza	Negativa
293	Montevideo	Mayo	8 años	Labrador	Negativa
294	Montevideo	Mayo	11 años	Cimarrón	Positiva
295	Montevideo	Mayo	SD	Cimarrón	Positiva
296	Montevideo	Mayo	SD	Cimarrón	Positiva
*297	Canelones	Mayo	3 meses	Cruza	Positiva
298	Maldonado	Mayo	5 años	Cruza	Negativa
*300	Montevideo	Junio	1 año 1m	Pitbull	Positiva
301	Montevideo	Junio	5 meses	Pitbull	Positiva
302	Montevideo	Junio	5 años	Cruza	Negativa
303	Montevideo	Setiembre	SD	SD	Negativa
304	Montevideo	Setiembre	SD	Mastín	Negativa
305	Montevideo	Setiembre	SD	Caniche	Negativa
306	Montevideo	Setiembre	6 meses	Cocker	Negativa
307		Octubre	SD	Cruza	Positiva
308	Montevideo	Diciembre	2 meses	Bull terrier	Negativa
*309	Montevideo	Diciembre	16 años	Cruza	Positiva

2.4.2. Caracterización genética de CDV

Del total de las 16 muestras en donde se detectó la presencia del genoma viral se seleccionaron 6, colectadas en distintas etapas y estaciones del año para ser analizadas filogenéticamente (Tabla 2.1). El ADNc previamente obtenido se sometió a PCR para la amplificación del fragmento de 681 pb de la región codificante del gen F, obteniéndose dicha región en las seis muestras seleccionadas (Figura 2.6).

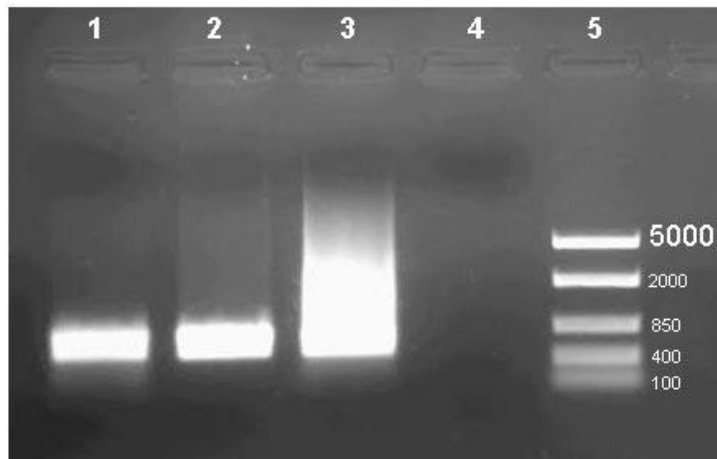


Figura 2.6. Electroforesis en gel de agarosa 0,8%. Se muestran los fragmentos de 681 pb del gen F obtenidos por amplificación. 1-CDV-300, 2-CDV-309, 3-Control positivo 4- Blanco, 5- Marcador de peso molecular *middle range* de *Fermentas*.

2.4.2.1 Análisis bioinformáticos

2.4.2.1.1 Análisis de secuencias

Los amplicones obtenidos se purificaron, cuantificaron y enviaron a secuenciar. Las seis secuencias de 681 pb obtenidas fueron editadas y corregidas. El análisis se limitó al fragmento Fsp de 405 pb. A continuación fueron alineadas entre sí y comparadas a nivel nucleotídico y aminoacídico (aa) (Figura 2.7 y 2.8). El análisis de las seis secuencias mostró un total de 31 cambios nucleotídicos y 16 cambios aa. De los cuales 10 cambios aa diferencian claramente dos secuencias (272 y 273) de las cuatro restantes (297, 275, 300 y 309) (Tabla 2.2). Se calcularon los valores de distancia nucleotídica y aminoacídica para las cepas del 2014 (2,6% y 4,7% respectivamente) y para las secuencias uruguayas de años anteriores (3,2% y 6,2% respectivamente).

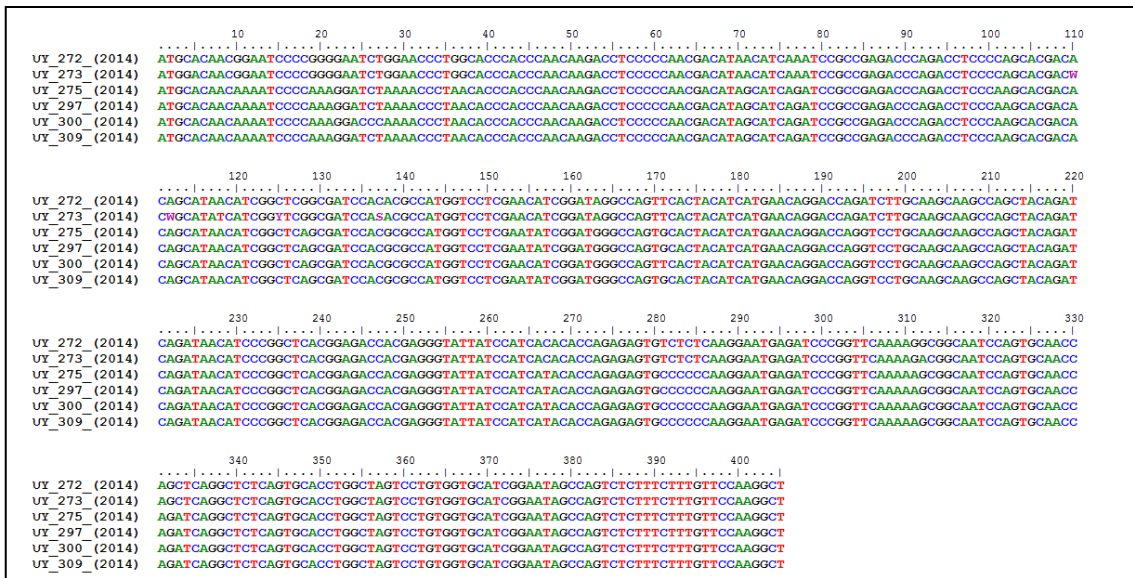


Figura 2.7. Alineamiento nucleotídico de las seis secuencias obtenidas en el 2014.

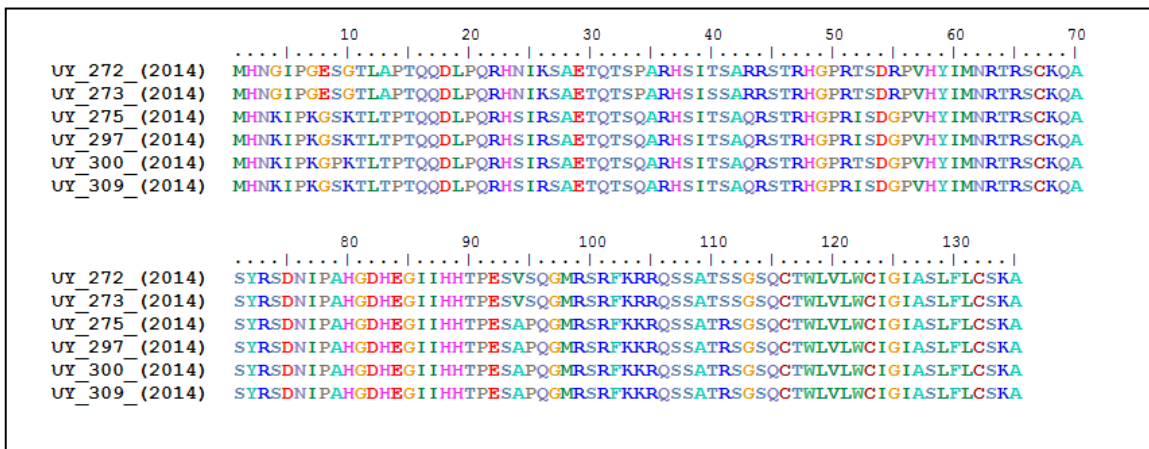


Figura 2.8. Alineamiento aminoacídico de las seis secuencias obtenidas en este trabajo.

Tabla 2.2. Se indican los cambios aminoacídicos que separan las secuencias del 2014 en dos grupos, Grupo1 (272 y 273) y Grupo 2 (275, 297, 300 Y 309).

Posición aa en Fsp	Grupo 1 (aa)	Grupo 2 (aa)
4	G	K
7	G	K
8	E	G
10	G	K
34	P	Q
43	R	Q
55	R	G
94	V	A
95	S	P
111	S	R

2.4.2.1.2 Análisis filogenéticos

El análisis filogenético incluyó las 6 secuencias uruguayas obtenidas de muestras del 2014, y 59 obtenidas de la base de datos. Estas últimas incluyen secuencias pertenecientes a 3 linajes de Sudamérica (EU1/SA1, SA2 y SA3), y secuencias representantes de 6 linajes circulantes en el mundo (AS1, AS2, NA1, NA2, EU2 y EU3). Este análisis mostró que todas las secuencias obtenidas en el 2014 se agrupan con un soporte estadístico de 98% en un mismo linaje, EU1/SA1, junto con secuencias uruguayas, brasileras, argentinas y europeas.

Dentro del linaje EU1/SA1 se observa una subdivisión en cinco grandes subclados, que se asocian principalmente al país de procedencia (Figura 2.9). Las cepas uruguayas se subdividen en dos subclados que denominamos Subclado1 (SC1), con distancias nucleotídicas y aminoacídicas de 0,4% y de 0,8% respectivamente, y Subclado2 (SC2), con distancias de 0,6% y 2,7% respectivamente. Ambos tienen altos soportes estadísticos (78% y 99%), y las secuencias entre los subclados se separan con distancias nucleotídicas de 4,5% y aa de 8,8%.

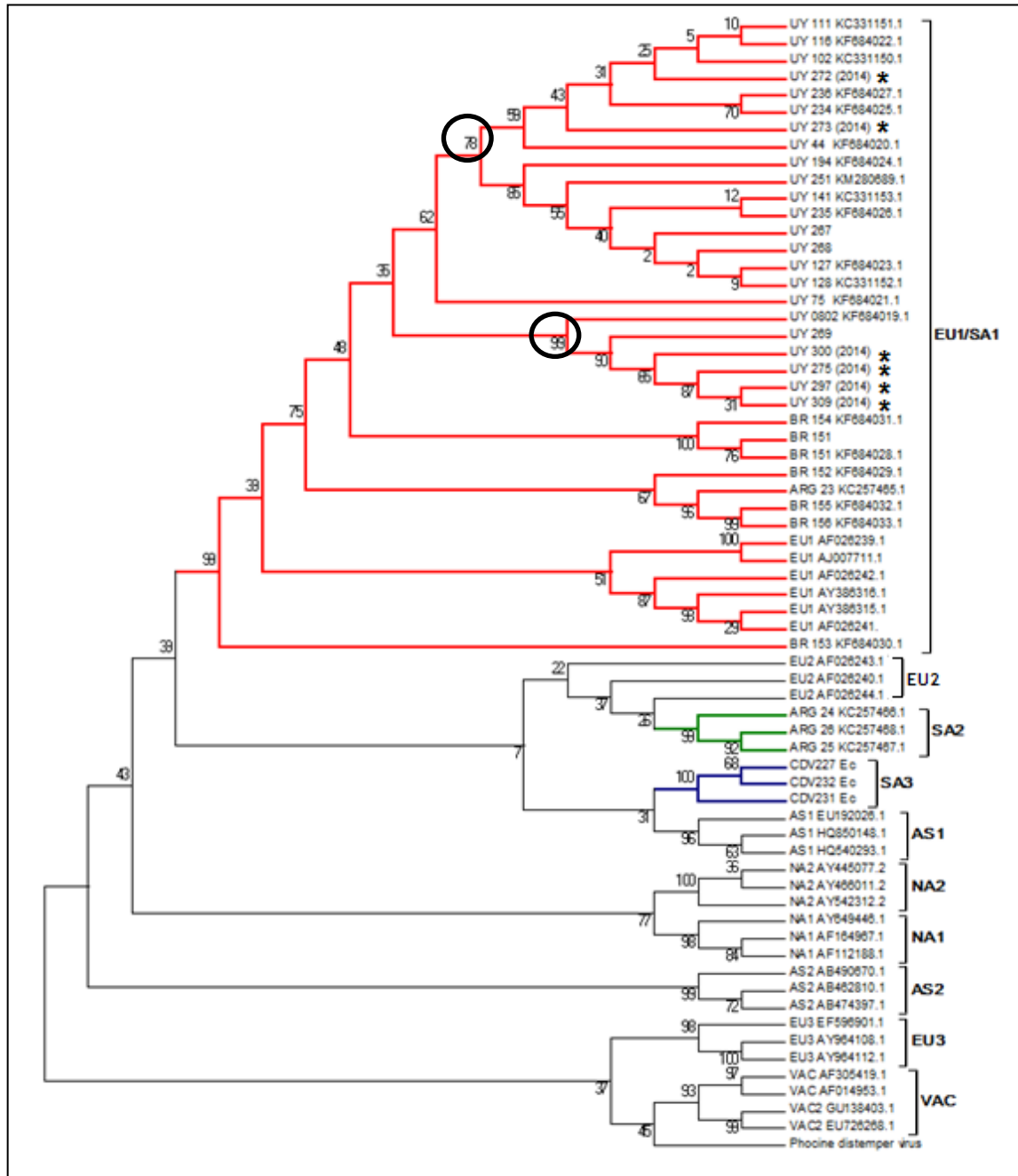


Figura 2.9. Reconstrucción filogenética por máxima verosimilitud basada en la secuencia nucleotídica de Fsp. El modelo evolutivo de sustitución que mejor se ajustó a este grupo de datos fue el K2+G. Se indica con llaves los distintos linajes (EU1/SA1- Europa 1/Sudamérica 1, EU2- Europa 2, SA2- Sudamérica 2, SA3- Sudamérica 3, AS1- Asia 1, NA2- Norteamérica 2, NA1- Norteamérica 1, AS2- Asia 2, EU3- Europa 3 y VAC- vacunal). Se destaca con colores los clados sudamericanos, con asteriscos las secuencias obtenidas en este trabajo y con círculos los soportes estadísticos correspondientes al Subclado 1 y Subclado 2.

2.5 DISCUSIÓN

La enfermedad provocada por el virus distemper canino (CDV) tiene altos impactos económicos y sanitarios, principalmente por la alta incidencia en caninos domésticos. Además, representa una amenaza para la fauna silvestre debido a su amplio rango de huéspedes. CDV es capaz de infectar a todas las familias de carnívoros terrestres a nivel mundial, algunos mamíferos acuáticos y primates no homínidos (Deem et al. 2000, de Vries et al. 2014; Sakai et al. 2013; Sun et al. 2010). Se suma el hecho de que presenta una tasa evolutiva rápida debido a la naturaleza de su genoma de ARN. Dadas estas circunstancias, es de gran importancia realizar un monitoreo constante de la situación epidemiológica en el país y en el mundo y ampliar los estudios a diversos huéspedes.

2.5.1 Aplicación de herramientas moleculares para el diagnóstico de CD

El diagnóstico molecular se realizó mediante una metodología por RT-PCR en la que se amplifica un fragmento conservado del gen N (Sarute et al., 2011), detectándose el genoma viral en 16 de las 36 muestras ingresadas durante el 2014. Esto representa el 44% de las muestras ingresadas al laboratorio con sospecha de Distemper basada en diagnósticos clínicos. Es un porcentaje sorprendentemente bajo en comparación con los obtenidos en estudios de años anteriores, 86% en el estudio realizado por Sarute et al. (2011). Con el fin de encontrar el motivo de esta baja en el porcentaje se analizaron en mayor detalle las muestras que ingresaron durante el 2014. Encontramos que 9 muestras corresponden a perros con un único síntoma muy poco específico (tos, fiebre, mocos o conjuntivitis) o perros sin síntomas en los cuales se sospechaba un posible contagio por convivir en cercanía con un perro infectado. Estas 9 muestras resultaron negativas, por lo tanto no han de ser consideradas en el total, como muestras de presuntiva infección por Distemper. Descartándolas, se obtendría un porcentaje aproximado del 60% de resultados positivos, este valor no es tan alarmante en comparación con años anteriores, aunque continua siendo una cifra inferior. En este caso, la baja en el porcentaje se adjudica al tipo de enfermedad con la que se está tratando, CD presenta síntomas muy variables y además frecuentes en otras enfermedades (Deem et al., 2000), lo que puede dificultar el diagnóstico clínico específico. Por estos motivos, en muchos casos, a pesar de que la sintomatología es poco informativa, no es seguro descartar Distemper durante el diagnóstico clínico y disminuyen las probabilidades de que la muestra ingresada contenga el virus. Por ello los análisis moleculares son fundamentales para confirmar o descartar la presencia de genoma viral y obtener un diagnóstico certero de la infección.

La aplicación de la metodología de RT-PCR como modo de relevamiento permitió confirmar la circulación del virus en la población canina del país, tanto en perros vacunados como sin vacunar, lo que resalta la importancia de la aplicación de

métodos más confiables, como los moleculares, para el diagnóstico. El análisis de los resultados obtenidos en cuanto a la edad de los canes infectados reveló que no presenta ninguna tendencia o correlación entre la edad del animal y la enfermedad. Las 16 muestras positivas fueron colectadas de perros de entre 3 meses y 16 años (media \pm desviación estándar; 7 ± 72 meses). Tampoco se encontró correlación entre canes de raza o cruza.

2.5.2 Caracterización genética durante el 2014

Se seleccionaron seis muestras positivas para la caracterización genética de CDV en función del mes de la toma, abarcando diferentes estaciones del año (Tabla 2.1) en las cuales se amplificó y secuenció el fragmento Fsp para ser utilizado como marcador filogenético. El análisis de las secuencias reveló una distancia aminoacídica (aa) entre ellas de 4,7% y un valor levemente superior en comparación con las uruguayas de años anteriores (6,2%). Ambos valores están contenidos dentro del rango establecido por Sarute et al. (2013), que definió linaje como un conjunto de cepas que agrupan en un clado y presentan una divergencia aminoacídica en Fsp menor al 19%.

Las seis secuencias del 2014 se analizaron filogenéticamente junto con otras 59 que abarcan los linajes europeos, asiáticos y americanos. Se logró identificar correctamente los distintos linajes circulantes, agrupados con valores de apoyo estadístico superiores al 96%.

La totalidad de las secuencias del 2014 obtenidas en el marco de este trabajo se agrupan dentro del linaje EU1/SA1 previamente caracterizado en el país. El análisis más detallado de las secuencias uruguayas dentro del clado EU1/SA1 muestra que las mismas se agrupan en dos subclados, que llamamos SC1 y SC2 (Figura 2.9). El subclado 1 está compuesto por 14 secuencias uruguayas del 2007-2013 y dos secuencias del 2014 (272 y 273) que fueron colectadas en febrero de dicho año. Las cepas agrupadas en el SC1 revelaron distancias nucleotídicas y aa de 0,4% y 0,8% respectivamente. El segundo subclado, SC2, contiene gran parte de las secuencias obtenidas en el 2014 (275, 297, 300 y 309) y otras dos secuencias uruguayas anteriores (269 y 0802). Las cepas que agruparon en SC2 revelaron distancias nucleotídicas y aa de 0,6% y 2,7% respectivamente y se separan del SC1 con distancias de 4,5% y 8,8%. El alineamiento aminoacídico reveló diez cambios aa que diferencian a las secuencias de cada subclado. Estos cambios fueron analizados con respecto al resto de las secuencias uruguayas de años anteriores que componen los dos subclados y se encontró que tres de ellos son marcadores aminoacídicos para la diferenciación de subclados, dado que se conservan de forma idéntica entre las secuencias de SC1 y SC2.

Estudios recientes basados en el análisis del gen H han sugerido una subdivisión dentro del linaje EU1/SA1 determinando 8 subgenotipos (Budaszewski et

al., 2014). Las cepas europeas se agrupan en un solo subgenotipo denominado H, las cepas brasileras mostraron una mayor diversidad agrupándose en seis subgenotipos, denominados A, B, D, E, F y G; y las cepas uruguayas se agruparon en un solo subgenotipo denominado C. El subgenotipo C está compuesto exclusivamente por secuencias uruguayas del 2007-2009 (111, 102, 109, 128 y 141). Estas cepas están incluidas en nuestro análisis y forman parte del subclado denominado por nosotros como SC1.

La inclusión en nuestro análisis de un número mayor de secuencias uruguayas reveló la existencia del segundo subclado, SC2. Estos resultados indican que las cepas uruguayas se podrían agrupar en dos subgenotipos que se diferencian claramente por las distancias genéticas entre ellos, revelando una mayor diversidad genética en las cepas uruguayas de CDV en comparación con la reportada hasta la fecha.

2.5.3 Estudio de la variabilidad de CDV en Uruguay en el 2014

Los datos obtenidos con respecto a las relaciones filogenéticas son un indicador de que, a pesar de la gran diversidad evolutiva reportada en nuestro continente (cuatro linajes circulando en distintos países), en Uruguay continúa circulando únicamente en el país el linaje, EU1/SA1 (Panzera et al., 2012). Otro factor importante a considerar es la posible circulación de linajes variables en la fauna silvestre. Está muy poco estudiada y hay escasos reportes de su estado sanitario, en Argentina y Brasil se han descrito algunos casos de infecciones naturales en felinos y zorros salvajes (Nava et al. 2008; Ferreyra et al. 2009; Megid et al. 2009; Furtado et al. 2013), sin embargo, en Uruguay aún no hay estudios de CDV enfocados en la fauna silvestre. Por estos motivos es de gran importancia continuar y expandir el monitoreo de la población viral en el país.

2.6 CONCLUSIONES

- Se aplicó con éxito la metodología RT-PCR y se logró detectar el genoma viral en 16 muestras ingresadas durante el año 2014.
- Las cepas uruguayas circulantes en el 2014 se agrupan en el clado correspondiente al linaje EU1/SA1.
- Las cepas uruguayas que se agrupan dentro del linaje EU1SA1 están subdivididas en dos subclados diferenciados por tres marcadores aminoacídicos.

2.7 PERSPECTIVAS

- Continuar con el relevamiento de la población viral de CDV en el país.
- Expandir los estudios filogenéticos a otros países del continente
- Expandir los estudios filogenéticos a huéspedes salvajes.

3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberham, C., Pendl, C., Gross, P., et al. 2001. A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J. Virol. Methods* 92, 183–91.
- Afonina, I., Zivarts, M., Kutuyavin, I., et al. 1997. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res.* 25, 2657–60.
- Agungpriyono, D.R., Uchida, K., Tabaru, H., et al. 1999. Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. *Vet. Pathol.* 36, 77–80.
- Altman, D.G., Bland, J.M. 1994. Diagnostic tests. 1: Sensitivity and specificity. *BMJ Br. Med. J.* 308, 1552.
- An, D.J., Yoon, S.H., Park, J.Y., et al. 2008. Phylogenetic characterization of canine distemper virus isolates from naturally infected dogs and a marten in Korea. *Vet. Microbiol.* 132, 389–95.
- Anderson, D.E., von Messling, V. 2008. Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. *J. Virol.* 82, 10510–8.
- Appel, M. 1987. Canine distemper virus, in: Appel, M. (Ed.), *Virus Infections of Carnivores*. Elsevier, Amsterdam, pp. p. 133–59.
- Appel, M., Cooper, B. 1978. Status report: canine viral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 1516–1518.
- Appel, M., Parrish, C. 1987. Canine parvovirus type 2. In: Appel, M.J. (Ed.), *Virus Infections of Carnivores*, vol. 1. Elsevier, New York, pp. 69–92.
- Appel, M., Summers, B.A. 1999. Canine Distemper: Current Status, Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael, L.E. Ed. *International Veterinary Information Service*.
- Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., et al. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J. Virol.* 53, 908–19.
- Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., et al. 1970. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect. Immun.* 1, 503–8.
- Bolt, G., Jensen, T.D., Gottschalck, E., et al. 1997. Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J. Gen. Virol.* 78 (Pt 2), 367–72.
- Budaszewski, R.D.F., Pinto, L.D., Weber, M.N., et al. 2014. Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Res.* 180, 76–83.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., et al. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 82, 3021–5.

- Calderón, M.G., Remorini, P., Periolo, O., et al. 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341–9.
- Carmichael, L.E. 2005. An annotated historical account of canine parvovirus. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 52, 303–11.
- Carmichael, L.E., Schlafer, D.H., Hashimoto, A. 1994. Minute virus of canines (MVC, canine parvovirus type-1): pathogenicity for pups and seroprevalence estimate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 165–74.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., et al. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759–64.
- De Vries, R.D., Ludlow, M., Verburgh, R.J., et al. 2014. Measles vaccination of nonhuman primates provides partial protection against infection with canine distemper virus. *J. Virol.* 88, 4423–33.
- Decaro, N., Buonavoglia, C. 2012. Canine parvovirus a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet. Microbiol.* 155, 1–12.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., et al. 2007a. The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1222–4.
- Decaro, N., Desario, C., Amorisco, F., et al. 2013. Detection of a canine parvovirus type 2c with a non-coding mutation and its implications for molecular characterisation. *Vet. J.* 196, 555–557.
- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., et al. 2005a. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 133–8.
- Decaro, N., Desario, C., Lucente, M.S., et al. 2008a. Specific identification of feline panleukopenia virus and its rapid differentiation from canine parvoviruses using minor groove binder probes. *J. Virol. Methods* 147, 67–71.
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., et al. 2006a. A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 136, 65–70.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., et al. 2006b. Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J. Virol. Methods* 133, 92–99.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., et al. 2005b. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet. Microbiol.* 105, 19–28.
- Decaro, N., Lui, A., Muller, A., et al. 2008b. Canine parvovirus 2c infection in central Portugal Maria Joa ~ o Vieira , Eliane Silva , Joa 491, 488–491.

- Decaro, N., Martella, V., Elia, G., et al. 2007b. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet. Microbiol.* 121, 39–44.
- Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A., et al. 2000. CANINE DISTEMPER IN TERRESTRIAL CARNIVORES: A REVIEW. *J. Zoo Wildl. Med.* 31, 441–451.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., et al. 2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* 126, 179–85.
- Domingo, E., Baranowski, E., Nunez, J. I., et al. 2000. [Quasispecies and molecular evolution of viruses]. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics*, 19(1), 55-63.
- Elia, G., Cavalli, A., Desario, C., et al. 2007. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 146, 202–8.
- Espinal, M. a., Díaz, F.J., Ruiz-Saenz, J., 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Vet. Microbiol.* 172(1), 168-176.
- Ferreya, H., Calderón, M.G., Marticorena, D., et al. 2009. Canine distemper infection in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) from Argentina. *J. Wildl. Dis.* 45, 1158–62.
- Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634–43.
- Furtado, M.M., de Ramos Filho, J.D., Scheffer, K.C., et al. 2013. Serosurvey for selected viral infections in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic carnivores in Brazilian Cerrado, Pantanal, and Amazon. *J. Wildl. Dis.* 49, 510–21.
- Gizzi, A.B.D.R., Oliveira, S.T., Leutenegger, C.M., et al. 2014. Presence of infectious agents and co-infections in diarrheic dogs determined with a real-time polymerase chain reaction-based panel. *BMC Vet. Res.* 10, 23.
- Gruber, F., Falkner, F.G., Dorner, F., et al. 1998. Precise quantitation of human parvovirus B19 DNA in biological samples by PCR. *Biologicals* 26, 213–6.
- Harrison, L.R., Styer, E.L., Pursell, A.R., et al. 1992. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 19–22.
- Hoelzer, K., Parrish, C.R., 2010. The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.* 41, 39.
- Hoelzer, K., Shackelton, L. a, Parrish, C.R., et al. 2008. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2280–9.
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., et al. 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 535–539.

- Hueffer, K., Parker, J.S.L., Weichert, W.S., et al. 2003. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77, 1718–26.
- Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., et al. 2006. Parvoviruses.
- Kumar, M., Nandi, S., 2010. Development of a SYBR Green based real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus in faecal samples. *J. Virol. Methods* 169, 198–201.
- Lamb, R., Parks, G., 2007. Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication, in: *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Lin, C.N., Chien, C.H., Chiou, M.T., et al. 2014. Development of Sybr Green-Based Real-Time Pcr for the Detection of Canine, Feline and Porcine Parvoviruses. *Taiwan Vet. J.* 40, 1–9.
- Lukhtanov, E.A., Mills, A.G., Kutayin, I., et al. 1997. Minor groove DNA alkylation directed by major groove triplex forming oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 25, 5077–84.
- Martella, V., Cirone, F., Elia, G., et al. 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet. Microbiol.* 116, 301–9.
- Martella, V., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2006. Evolution of CPV-2 and implication for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes* 33, 11–3.
- Martin, D.P., Biagini, P., Lefeuvre, P., et al. 2011. Recombination in eukaryotic single stranded DNA viruses. *Viruses* 3, 1699–738.
- Maya, L., Calleros, L., Francia, L., et al. 2013. Phylodynamics analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Arch. Virol.* 158, 1133–41.
- Megid, J., Feijo, V.A., Souza, D., et al. 2009. Canine Distemper Virus in a Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Brazil: Case Report and Phylogenetic Analyses 45, 527–530.
- Mochizuki, M., Ohshima, T., Une, Y., et al. 2008. Recombination between vaccine and field strains of canine parvovirus is revealed by isolation of virus in canine and feline cell cultures. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 1305–14.
- Nava, A.F.D., Cullen, L., Sana, D.A., et al. 2008. First evidence of canine distemper in Brazilian free-ranging felids. *Ecohealth* 5, 513–8.
- Ohshima, T., Mochizuki, M., 2009. Evidence for recombination between feline panleukopenia virus and canine parvovirus type 2. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 403–8.
- Panzer, Y., Aldaz, J., 2014. Genetic Diversity of Canine Distemper Virus in South America. *British J. Virol.* 1(2), 48-53.

- Panzerá, Y., Calderón, M.G., Sarute, N., et al 2012. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res.* 163, 401–404.
- Parker, J.S.L., Murphy, W.J., Wang, D.A.I., et al. 2001. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J. Virol.* 75, 3896–902.
- Parrish, C.R., 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183, 195–205.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., et al. 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J. Virol.* 65, 6544–52.
- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., et al. 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J. Gen. Virol.* 69 (Pt 5), 1111–6.
- Parrish, C.R., O’Connell, P.H., Evermann, J.F., et al. 1985. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046–8.
- Pérez, R., Bianchi, P., Calleros, L., et al. 2012. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet. Microbiol.* 155, 214–219.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., et al. 2014. Phylogenetic and Genome-Wide Deep-Sequencing Analyses of Canine Parvovirus Reveal Co-Infection with Field Variants and Emergence of a Recent Recombinant Strain. *PLoS One* 9, e111779.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., et al. 2007. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet. Microbiol.* 124, 147–52.
- Pollock, R. V., 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103–19.
- Reed, A.P., Jones, E. V, Miller, T.J., 1988. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J. Virol.* 62, 266–76.
- Rhode, S.L., 1985. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J. Virol.* 54, 630–3.
- Robinson, W.F., Wilcox, G.E., Flower, R.L., et al. 1979. Evidence for a parvovirus as the aetiologic agent in the myocarditis of puppies. *Aust. Vet. J.* 55, 294–5.
- Sakai, K., Yoshikawa, T., Seki, F., et al. 2013. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys can readily adapt to use human receptors. *J. Virol.* 87, 7170–5.
- Sarute, N., Calderón, M.G., Pérez, R., et al. 2013. The Fusion Protein Signal-Peptide-Coding Region of Canine Distemper Virus: A Useful Tool for Phylogenetic Reconstruction and Lineage Identification. *PLoS One* 8, 1–6.
- Sarute, N., Delgado, M. V, Carrau, L., et al. 2014a. First genome sequence of a canine distemper virus strain from South America. *Genome Announc.* 2(5), e01009-14.

- Sarute, N., Pérez, R., Aldaz, J., et al. 2014b. Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes* 48, 474–8.
- Sarute, N., Pérez, R., Francia, L., et al. 2011. Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del virus Distemper Canino en Uruguay. *Veterinaria* 47, 7–13.
- Sawatsky, B., Messling, V. Von, 2010. Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *J. Virol.* 84(6), 2753-2761.
- Schunck, B., Kraft, W., Truyen, U., 1995. A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J. Virol. Methods* 55, 427–33.
- Shackelton, L. a, Parrish, C.R., Truyen, U., et al. 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 379–84.
- Streck, A.F., Rüster, D., Truyen, U., et al. 2013. An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *J. Virol. Methods* 193, 6–8.
- Sun, Z., Li, A., Ye, H., Shi, Y., et al. 2010. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Vet. Microbiol.* 141, 374–8.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., et al. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–9.
- Tattersall, P., Ward, D.C., 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* 263, 106–9.
- Touihri, L., Bouzid, I., Daoud, R., et al. 2009. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes* 38, 249–258.
- Truyen, U., Evermann, J.F., Vieler, E., et al. 1996. Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* 215, 186–189.
- Url, A., Schmidt, P., 2005. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. *Res. Vet. Sci.* 79, 57–9.
- Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W.S., et al. 2002. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J. Virol.* 76, 1884–91.
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., Parrish, C.R., 2000. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J. Virol.* 74, 4853–9.
- Wang, J., Cheng, S., Yi, L., et al. 2012. Evidence for natural recombination between mink enteritis virus and canine parvovirus. *Virol. J.* 9, 252.

- Woma, T.Y., Vuuren, M. Van, Bosman, A., et al. 2010. Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa : Lineage Africa. *Vet. Microbiol.* 1–7.
- Zipperle, L., Langedijk, J.P.M., Orvell, C., et al. 2010. Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *J. Virol.* 84, 9618–24.