



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS DE PARVOVIRUS
Y VIRUS DISTEMPER CANINO PROVENIENTES DE PERROS
DOMESTICOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS DE LA
ARGENTINA.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica.

Marina Gallo Calderón

Director de tesis: Dr. José La Torre
Director Asistente: Dra. Nora Mattion
Consejero de Estudios: Dra. Susana Mersich

Lugar de trabajo: Centro de Virología Animal (CEVAN)-Instituto de Ciencia y Tecnología Dr César Milstein-CONICET.

Buenos Aires, 2008

CARACTERIZACION MOLECULAR DE CEPAS DE PARVOVIRUS Y VIRUS DISTEMPER CANINO PROVENIENTES DE PERROS DOMESTICOS VACUNADOS Y NO VACUNADOS DE LA ARGENTINA

Entre los años 2003 y 2008, se recibieron en el laboratorio 123 muestras de sangre de perros, con fines diagnósticos. De acuerdo a los signos clínicos, la infección por VDC se había sospechado en un 79% de estos casos.

Del total de las muestras analizadas, se detectó por RT-PCR, un fragmento de 287 pares de bases del gen de la NP de VDC en 82 muestras.

Junto con la muestra remitida al laboratorio, se solicitó una ficha completa con la historia clínica del animal.

Para caracterizar posteriormente las cepas de VDC presentes en nuestro país, se amplificó, clonó y secuenció un fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de VDC. Se obtuvo una alta identidad a nivel aminoacídico entre las cepas locales, las cuales mostraron ser genéticamente distantes de las cepas presentes en las vacunas.

Para una de las cepas, se logró además de la amplificación del gen completo de la H, el aislamiento en células en cultivo.

Por otro lado, para el caso de PVC, se analizaron 43 hisopados rectales y en 32 de ellos se detectó por PCR un fragmento de 681 pb del gen de la VP2. Se analizaron secuencias de las cepas circulantes locales, detectándose la variante “PVC-2c” presente en la población canina del mundo desde el año 2000.

Este estudio, representa el primer análisis a nivel molecular de cepas locales tanto de VDC como PVC.

Palabras claves: Moquillo canino, Virus Distemper Canino, Parvovirus Canino, diagnostico molecular, secuenciamiento.

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CANINE PARVOVIRUS AND
CANINE DISTEMPER VIRUS STRAINS RECOVERED FROM VACCINATED
AND NON VACCINATED DOMESTIC DOGS IN ARGENTINA**

Between 2003 and 2008, we received in our laboratory 123 blood samples taken from dogs for diagnosis purposes. According to clinical signs, the infection with CDV was suspected in 79% of them.

A 287 base pairs fragment of the NP gene of CDV was detected by RT-PCR in 82 of the analyzed samples.

Clinical veterinarians were asked to send together with the samples, a complete medical report with clinical information about the patients.

To later characterize strains circulating in Argentina, we cloned and sequenced an 871 bp fragment of the CDV hemagglutinin gene.

We found a high degree of identity among local strains and a lower degree of identity when compared with vaccine strains.

We amplified the complete H gene of two local strains and one of them was isolated in cell culture.

On the other hand, we analyzed 43 rectal swabs and we detect CPV DNA in 32 of them. The obtained PCR fragments were cloned and sequenced, and we found the CPV2c strain, detected in the worldwide canine population since the year 2000.

This study was based primarily on the molecular characterization of relevant genomic CDV and CPV sequences and the results obtained herein confirm and extend those previously reported in other regions of the world.

Key words: strains identification, Canine Distemper Virus, Canine Parvovirus, Molecular diagnosis, sequencing.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a:

Al CONICET, Kam-biotec y Tecnovax por el sustento económico.

Al Dr. José La Torre por haberme permitido trabajar en el laboratorio estos años.

A Patricia Remorini, por ser mi guía durante los primeros años de este trabajo.

A Nora Mattion por su gran apoyo.

A Marcela Iglesias y Osvaldo Periolo como iniciadores del tema.

A Cari Romanutti por su hermosa amistad.

A mi “Dra Queen” Alejandra D’ Antuono “Alita” por todo su tiempo y paciencia.

Al Dr Marcelo González por su valentía y fuerza.

A Irma y Gilda por ayudarme generosamente con las células.

A Blanca Robiolo por ayudarme con la base de datos.

A Mónica Giacomodonato, Lore Boado y Paula Alvarez, por haber traído a este mundo a Santino, Santiago y Anita que llenaron de ternura el 2008.

A Lore Ogas, Dani Ruspi, Max Wilda, Euge Loureiro, Jess Levingston Mc Leod, Juan Cruz Casabona, Norita Lopez, Adri Guiraldez, Carlitos “Charly” Palacios, Vero Poggio, Gabi Otero, Sebas Aguirre; todos los chicos del CEVAN por hacer que todos estos días de trabajo hayan pasado realmente muy rápido.

A las chicas del lavadero y administración por las pilas y buenos deseos.

A Caro Pustovrh por su Amistad y sus consejos.

A todas las personas que conozco que me influyeron de alguna manera como para que hoy, yo sea lo que soy.

A mis amigos por haberme hecho crecer.

A mis viejos por darme siempre confianza y mucha libertad.

A Sil por estar.

Gracias Totales.

Los resultados presentados en esta Tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina.

Marina Gallo Calderon, Patricia Remorini, Osvaldo Periolo, Marcela Iglesias, Nora Mattion, José La Torre.

Vet Microbiol. 2007 Dec 15; 125(3-4):341-9.

Canine Distemper in crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in National Park "El Palmar", Entre Ríos, Argentina.

Hebe Ferreira, Marina Gallo Calderón, Damián Marticorena, Carolina Marull, Leonardo Barrios Caro.

Journal of Wildlife Diseases 2008

Manuscrito enviado para su publicación.

Molecular Characterization of Canine Parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs.

Marina Gallo Calderón, Patricia Remorini, Danilo Buscafusco, Osvaldo Periolo, Marcela Iglesias, Nora Mattion, José La Torre.

Journal of Virological Methods 2008

Manuscrito enviado para su publicación.

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

ADN: ácido desoxirribonucleico
ADN ligasa: enzima que forma enlaces covalentes entre el extremo 5' de una cadena polinucleotídica y el extremo 3' de otra cadena polinucleotídica.
Antisense: primer reverso
ARN: ácido Ribonucleico
ARNm: ácido Ribonucleico mensajero
ATCC: american Type Culture Collection
AVC: Adenovirus Canino
aa: aminoácidos
B95a: línea celular linfoblastoide B de tití, transformada por el virus Epstein-Barr.
BPIV: Bovine parainfluenza Virus. Virus Parainfluenza bovino
BRSV: Bovine respiratory syncytial Virus. Virus sincicial respiratorio bovino
Buffer: solución de sustancias químicas que mantienen constante su pH
Buffy coat: capa leuco-plaquetaria que se observa después de la centrifugación ó de la sedimentación de la sangre total entre el plasma y los glóbulos rojos.
°C: grados centígrados
CMV: Cetacean Morbillivirus. Morbillivirus de los Cetáceos
CO₂: dióxido de carbono
CPN: complejo del poro nuclear
CPV: Canine Parvovirus. Parvovirus Canino
CRFK: Crandell Ress Feline Kidney. Células de riñón de gato.
DAB: ácido diamino benzoico
DC: Distemper Canino
DI: Dosis infectivas
DICT: Dosis infectivas en Cultivo de Tejidos
DMV: Dolphin Morbillivirus. Morbillivirus del delfín
DMEM: medio esencial mínimo de Dulbecco
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNAsas: enzimas que degradan el ADN
dNTPs: deoxinucleótidos
D.p.i.: días post infección
Drift Antigénico: cambios ó mutaciones menores que producen nuevas cepas.
EDTA: ácido etilendiamino tetracético
ELISA: “Enzyme-linked immunosorbent assay”. Ensayo inmunoenzimático por adsorción.
Escherichia Coli DH5α: Bacterias de la cepa DH5α
F: Fusión (Proteína de Fusión)
f: forward primer
g: gramo
G418: aminoglycosido. Antibiótico Geneticina 418
H: Hemagglutinina (proteína)
HA: Hemoaglutinación
Hepes: ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
HeV: Hendra Virus
HI: herd immunity
HN: Hemagutinina Neuraminidasa
HPIV: Human Parainfluenza Virus. Virus Parainfluenza Humano
HRSV: Human Respiratory Syncytial Virus. Virus Respiratorio Sincicial Humano
IF: inmunofluorescencia
IgM: Immunoglobulina de tipo M

IHA: inhibición de la hemoaglutinación
IPTG: isopropil-Beta-D-Tiogalactopiranosido
Kb: kilo base
Kda: kilo daltons
l: litro
L: Large (proteína grande)
LB: Luria-Bertani, medio rico nutricional utilizado para el crecimiento de bacterias.
LCR: líquido cefaloraquídeo
M: Matrix (proteína de matriz)
M: Molar
mAbs: anticuerpos monoclonales
mARN: ácido ribonucleico mensajero
MEM: medio esencial mínimo
MDCK: Madin Darby Canine Kidney. Células de riñón de perro.
MgCl₂: cloruro de magnesio
μl: microlitro
μM: micromolar
mg: miligramo
ml: mililitro
mM: milimolar
MuV: Mumps virus.
MV: Measles Virus. Virus Sarampión
MVC: (Minute Virus of Canine) Virus diminuto de los caninos.
N: Normal
nm: nanómetro
NDV: Newcastle Disease Virus
NiV: Nipah Virus
NP: Nucleoproteína
NS non-structural proteins. (Proteínas no estructurales)
Nt: nucleótidos
ORSV: Ovine Respiratory Syncytial Virus. Virus Respiratorio Sincicial Ovino.
Pb: pares de bases
P: Phosphoproteína (proteína)
PBMC: "Peripheral Blood Mononuclear Cells". Células mononucleares de sangre periférica
PBS: phosphate buffered saline: solución salina de fosfatos
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PDV: Phocine Distemper Virus
Pellet: precipitado luego de la centrifugación
pH: logaritmo de la inversa de la concentración de protones
p.i.: post infección
Pmol: picomoles
PMV: Porpoise Morbillivirus. Morbillivirus de la Marsopa
PPRV: Peste des Petits Ruminants Virus
"primers": oligonucleótidos iniciadores
PV: Partículas Virales
PVC: Parvovirus Canino
PVM: Pneumonia Virus of Mice. Virus de la Neumonía del Ratón
PVM: Parvovirus del Mapache. Raccoon Parvovirus, RPV
r: reverse primer

RE: retículo endoplasmático
RFLP: “Restriction fragment length polymorphism”. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
RNasa: ribonucleasa A: enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN
rpm: revoluciones por minuto
RPV: Rinderpest Virus
RTf: receptor de transferrina
RT-PCR: Transcripción Reversa-Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS: dodecyl sulfato de sodio. Detergente de acción desnaturalizante
Sense: primer forward
SeV: Sendai Virus
SFB: Suero Fetal Bovino
SLAM: “Signaling lymphocytic activation molecule” (SLAM, CD150). Molécula activadora de la señalización del linfocito también conocida como CD150.
SNC: Sistema Nervioso Central
SPF: “Specific Pathogen Free” (libre de patógenos específicos)
SV41: Simian Parainfluenza Virus 41. Virus Parainfluenza de los Simios
SV5: Simian Virus 5
Tf: transferrina
TRTV: Turkey rhinotracheitis Virus. Virus de la rinotraqueitis de los pavos.
UTR: Untranslated region. Región no codificante
UV: luz Ultravioleta
VDC: Virus Distemper Canino
Vero: células epiteliales de riñón de mono verde Africano
Vero/SLAM: células Vero que expresan por transfección la molécula activadora de la señalización del linfocito
VEV: Virus de la Enteritis del Visón. Mink Enteritis Virus, MEV
VP: polipéptido viral
VPF: Virus de la Panleucopenia Felina. Feline Panleukopenia Virus, FPV
VVM: Vacunas a Virus Vivo Modificado
X-gal: (5-bromo-4-cloro-3-indoyl- β -D-galactopyranosido) (cromógeno).

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
PUBLICACIONES.....	IV
ABREVIATURAS Y DEFINICIONES.....	V
INDICE GENERAL.....	VIII

CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE LA SITUACION EPIDEMIOLOGICA DE 2 IMPORTANTES VIROSIS CANINAS DE LA REPUBLICA ARGENTINA ENTRE LOS AÑOS 2003-2008.....	IVX
--	-----

OBJETIVOS.....	XVI
----------------	-----

CAPITULO I: Estudios relacionados con el Virus Distemper Canino

INDICE DE TABLAS VDC.....	i
INDICE DE FIGURAS VDC.....	ii

1. INTRODUCCION

1.1. Historia del VDC.....	1
1.2. Clasificación del Virus.....	2
1.3. Las proteínas virales.....	5
1.3.1. Nucleoproteína (NP)	
1.3.2. Proteínas codificadas por el gen P (P, C, V)	
1.3.3. Proteína de matriz (M)	
1.3.4. Proteína de fusión (F)	
1.3.5. Proteína de unión (H)	
1.3.6. Proteína Large (L)	
1.4. Ciclo replicativo de VDC.....	8
1.4.1. Unión del virus y penetración en la célula hospedadora	
1.4.2. Transcripción y replicación	
1.4.3. Encapsidación del genoma y brotación	
1.5. Propiedades físicas de VDC.....	10
1.6. Patogenésis y cuadro clínico.....	10
1.7. Confirmación de laboratorio de la sospecha clínica de DC.....	12
1.7.1. Diagnóstico molecular	
1.7.2. Aislamiento Viral	
1.7.3. Serología	
1.7.4. Hemograma	
1.8. Epidemiología.....	15
1.8.1. Determinantes intrínsecos de los hospedadores y del agente viral	
1.8.2. Interacción hospedador-agente en la enfermedad	
1.9. Transmisión de VDC.....	17
1.9.1. Ocurrencia y rango de huésped	
1.10. Prevención de DC.....	19
1.10.1. Vacunas contra Distemper	
1.10.1.1. Vacunas a virus vivo modificado (atenuadas)	
1.10.1.2. Vacunas recombinantes y a ADN	

- 1.10.2. Respuesta a la vacunación a nivel individual y poblacional
 - 1.10.2.1. Nivel Individual
 - 1.10.2.2. Inmunidad poblacional
 - 1.10.2.3. Cobertura vacunal y brotes de DC
 - 1.10.2.4. Fallas vacunales ó de la vacunación

2. MATERIALES Y METODOS

- 2.1. Vacunas comerciales y muestras clínicas.....27**
- 2.2. Técnicas de Biología Molecular aplicadas a cepas vacunales y muestras clínicas.....28**
 - 2.2.1. Extracción del ARN de VDC
 - 2.2.2. Detección de VDC por RT-PCR
 - 2.2.2.1. Amplificación de un fragmento de **287** pb del gen de la **NP**
 - 2.2.2.1.1. Límite de sensibilidad para la detección del fragmento de **287** pb del gen de la **NP**
 - 2.2.2.2. Amplificación de un fragmento de **871** pb del gen de la Hemaglutinina
 - 2.2.2.2.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H de VDC
 - 2.2.2.3. Amplificación de un fragmento de **347** pb del gen de la **H**
 - 2.2.2.4. Amplificación de un fragmento de **174** pb del gen de la **H**
 - 2.2.2.5. Amplificación del gen completo de la **H**
 - 2.2.3. Purificación de ADN amplificado
 - 2.2.4. Clonado en PGEM-T easy vector de los fragmentos amplificados por RT-PCR
 - 2.2.5. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina
 - 2.2.6. Secuenciación de los fragmentos amplificados por RT-PCR
 - 2.2.7. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas
 - 2.2.8. Secuencias de VDC obtenidas y analizadas
 - 2.2.8.1. Fragmento de 287 pb del gen de la Nucleoproteína
 - 2.2.8.2. Fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina
 - 2.2.8.3. Fragmento de 347 pb del gen de la Hemaglutinina
 - 2.2.8.4. Fragmento de 174 pb del gen de la Hemaglutinina
 - 2.2.8.5. Gen completo de la Hemaglutinina
- 2.3. Células.....39**
 - 2.3.1. Purificación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de animales infectados con VDC
 - 2.3.2. Cultivo de células B95a
 - 2.3.2.1. Infección de células B95a
 - 2.3.3. Cultivo de células Vero
 - 2.3.3.1. Infección de células Vero
 - 2.3.3.2. Titulación de VDC en células Vero por dilución terminal
 - 2.3.4. Cultivo de Células VeroSLAM
 - 2.3.4.1. Infección de cultivos de células VeroSLAM con cepas salvajes Argentinas de VDC
 - 2.3.4.2. Detección de VDC en células VeroSLAM por el test de Inmunoperoxidasa

2.3.4.3. Detección de proteínas de VDC por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE) y electrotransferencia (Western blot)	
2.4. Medidas de bioseguridad.....	46
3. RESULTADOS	
3.1. Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC.....	47
3.1.1. En vacunas comerciales de Argentina	
3.1.2. En muestras de sangre de perros de Argentina	
3.2. Análisis de las muestras.....	48
3.3. Límite de sensibilidad para la detección por RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC.....	49
3.4. Análisis de secuencias del fragmento de 287 pb de la NP de VDC de 6 muestras clínicas y una vacuna comercial.....	49
3.5. Detección por RT-PCR del gen de la Hemaglutinina de VDC.....	50
3.5.1. Amplificación de un fragmento de 871 pb en muestras de sangre de animales infectados y en vacunas comerciales	
3.5.1.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H	
3.5.2. Amplificación de un fragmento de 347 pb del gen de la hemaglutinina en muestras de sangre de animales infectados y en una vacuna comercial	
3.5.3. Amplificación de un fragmento de 174 pb del gen de la hemaglutinina en cepas locales de VDC	
3.5.4. Amplificación del gen completo de la Hemaglutinina en dos cepas locales de VDC	
3.6. Análisis de secuencias de VDC del gen de la Hemaglutinina de VDC.....	55
3.6.1. Análisis de las secuencias del fragmento de 871 pb	
3.6.2. Análisis de las secuencias del fragmento de 347 pb	
3.6.3. Análisis de las secuencias del fragmento de 174 pb	
3.6.4. Análisis de las secuencias del gen completo de la hemaglutinina	
3.6.5. Localización de sitios potenciales de glicosilación en cepas locales de VDC	
3.7. Intento de aislamiento de una cepa de VDC local en células B95a.....	68
3.8. Cultivo de una cepa salvaje de VDC en células VeroSLAM.....	69
3.9. Ensayo de Inmunoperoxidasa (IPA).....	70
3.10. Ensayo de Westernblot.....	71
3.11. Análisis de secuencias nucleotídicas del fragmento de 871 pb de la hemaglutinina de VDC de la cepa Bruno aislada en células VeroSLAM...71	71
3.12. Parámetros epidemiológicos y sanitarios de los casos analizados.....	73
3.12.1. Localización geográfica de las muestras positivas para VDC	
3.12.2. Distribución temporal de las muestras analizadas	
3.12.3. Relación entre el estado de vacunación y el diagnóstico de VDC por RT-PCR	
3.12.4. Relación entre la presencia de sintomatología clínica y el diagnóstico de VDC por RT-PCR	
3.12.4.1. En animales vacunados	
3.12.4.2. En animales no vacunados	
3.12.4.3. En todos los animales sin diferenciación del estado de vacunación	
3.12.5. Distribución de edades de los animales infectados con VDC	

3.12.6. Estado de vacunación en diferentes grupos de edades

Apartado “Detección de Distemper Canino en Zorros Silvestres”

A1. Detección de VDC en una muestra de un zorro silvestre.....	81
A2. Análisis de secuencia del fragmento de 871 pb de la Hemaglutinina de VDC proveniente del zorro.....	82
A3. Conclusiones.....	83
4. DISCUSION.....	84
5. BIBLIOGRAFIA.....	95

CAPITULO II: Estudios relacionados con el Parvovirus Canino

INDICE DE TABLAS PVC.....	i
INDICE DE FIGURAS PVC.....	ii

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia del PVC.....	1
1.2. Agente etiológico.....	2
1.3. Entrada y ruta de infección de PVC.....	5
1.4. Aislamiento y evolución del PVC.....	6
1.5. Distribución Europea de PVC.....	9
1.6. Animales susceptibles.....	9
1.7. Transmisión y patogénesis.....	10
1.8. Signos Clínicos.....	12
1.8.1. Forma entérica	
1.8.2. Forma cardíaca	
1.9. Patología.....	14
1.10. Diagnóstico.....	15
1.10.1. Diagnóstico clínico	
1.10.2. Diagnóstico diferencial	
1.10.3. Diagnóstico de laboratorio	
1.10.3.1. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (HA-IHA)	
1.10.3.2. Neutralización	
1.10.3.3. Técnica de Inmunofluorescencia	
1.10.3.4. Aislamiento de Parvovirus	
1.10.3.5. Microscopía electrónica	
1.10.3.6. PCR	
1.11. Tratamiento sintomático.....	19
1.12. Respuesta inmunológica e inmunización.....	19
1.12.1. Respuesta a la infección	
1.12.2. Inmunización	
1.12.2.1. Vacunas vivas atenuadas de PVC	
1.12.2.2. Los anticuerpos maternos y su interferencia con la vacunación	

2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Vacunas comerciales y muestras clínicas.....	23
2.2. Técnicas de Biología Molecular aplicadas a cepas vacunales y muestras clínicas.....	23
2.2.1. Extracción de ADN de PVC	
2.2.2. Detección por PCR de 2 fragmentos del gen de la VP2 de PVC	
2.2.3. Clonado en pGEM®-T Easy Vector de los fragmentos amplificados por PCR	
2.2.4. Análisis de las secuencias del fragmento de 681 pb y de 427 pb de la VP2 de PVC	
2.2.5. Detección por PCR del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC	
2.2.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 583 pb	
2.2.7. Secuenciamiento del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC	
2.2.8. Detección por PCR del gen completo de la VP2 de PVC	
2.3. Células.....	29
2.3.1. Cultivo e infección de células CRFK	
2.3.2. Test de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH). Tipificación con anticuerpos monoclonales (mAbs.)	
3. RESULTADOS	
3.1. Detección por PCR de 2 fragmentos del gen de la VP2 de PVC en vacunas comerciales de la Argentina.....	31
3.2. Determinación del límite de sensibilidad para la detección de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC.....	32
3.3. Análisis de las secuencias obtenidas con los primers P2, en vacunas comerciales.....	33
3.4. Análisis de la secuencia completa del gen de la VP2 en una vacuna comercial.....	34
3.5. Detección por PCR de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en hisopados rectales de perros de Argentina. Estudio de los casos analizados.....	35
3.6. Tipificación con anticuerpos monoclonales (mAbs).....	36
3.7. Análisis por PCR de cepas de PVC presentes en perros de la República Argentina.....	37
3.8. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos con los primers Pb en muestras de perros de la República Argentina.....	38
3.9. Amplificación y secuenciamiento de un fragmento de 583 pb del gen de la VP2.....	39
3.10. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 583 pb.....	41
3.11. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos con los primers Pab.....	41
3.12. Análisis del fragmento de 583 pb en cepas PVC-2a.....	42
3.13. Evolución de PVC en Argentina.....	43
3.14. Parámetros epidemiológicos y sanitarios de los casos analizados.....	44
3.14.1. Localización geográfica de las muestras positivas para PVC	

3.14.2. Distribución temporal de las muestras analizadas	
3.14.3. Relación entre el estado de vacunación y el diagnóstico de PVC por PCR	
3.14.4. Relación entre la presencia de sintomatología clínica y el diagnóstico de PVC por PCR en animales vacunados y no vacunados	
3.14.5. Distribución de edades de los animales infectados con PVC	
3.14.6. Estado de vacunación en diferentes grupos de edades	
4. DISCUSION.....	51
5. BIBLIOGRAFIA.....	58
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO.....	XVII
APENDICE “FICHA CLINICA”.....	XIX

CONSIDERACIONES GENERALES

Consideraciones generales acerca de la situación epidemiológica de 2 importantes virosis caninas de la República Argentina entre los años 2003-2008.

El Virus Distemper (VDC) y el Parvovirus Caninos (PVC) provocan enfermedades altamente contagiosas y mortales que tienen un gran impacto sanitario en animales de compañía (tanto en hogares y en veterinarias como así también en criaderos) y en especies silvestres susceptibles.

Vacunar es la forma más efectiva, económica y práctica de prevenir ó disminuir la incidencia de estas enfermedades.

Como ejemplo de lo importante que es la práctica de la vacunación, se encuentra el caso de un brote de VDC en Indiana, Estados Unidos (EEUU) en los años 1992-1993, en el cual la falta de vacunación, aumentó 350 veces el riesgo de la enfermedad y en el cual el 93.8% de los casos fueron atribuidos a la falta de vacunación. Cabe aclarar en este caso, que para muchos de los dueños de los animales, el costo del tratamiento médico excedió el costo de los programas de vacunación (Patronek et al., 1995).

En nuestro país, sólo un 20% de los perros (se estima que hay en total aproximadamente 8 millones de canes domésticos) es atendido con regularidad en las veterinarias, ya sea por urgencias ó consultas preventivas. La cifra, difundida por la Cámara Argentina de la Industria de Productos Veterinarios (Caprove), refleja entonces que el 80% de los animales de compañía no está recibiendo una cobertura médica mínima.

Además, sólo un 20-25% de los perros recibió alguna vacuna, pero se desconoce el porcentaje de animales que completó el esquema de vacunación y por lo tanto se encuentran protegidos contra estas enfermedades. Esto pone de manifiesto el gran riesgo en el que está sometida la población canina.

En Europa y EEUU las mascotas tienen cubiertas las necesidades básicas y el 90% recibe atención médica (en EEUU existen leyes que lo establecen como obligatorio).

En Argentina, los animales viven en un ambiente totalmente diferente al de otros países, hay muchos animales sueltos vagabundos y en esa situación hay una exposición muy alta a los virus. Es importante destacar, que el grado de desnutrición, stress, enfermedades parasitarias u otras enfermedades infecciosas, también contribuyen al estado general de inmunosupresión de los animales. Existe además, un bajo relevamiento de los casos e información sobre animales vacunados e infectados.

La crisis económica de los años 2000-2001, llevó en nuestro país, a una disminución en la práctica de la vacunación, que trajo como consecuencia una disminución de la

cobertura vacunal poblacional y un aumento de la circulación viral. Simultáneamente se produjo un aumento de la liberación de perros a la calle (estos animales abandonados, fueron liberados por lo general, sin vacunar y por consiguiente, susceptibles).

Esta situación, sumada a la utilización de vacunas no actualizadas, provocó en los últimos años, un gran aumento de los casos de VDC y PVC., lo cual se observó tanto en nuestro país como a nivel mundial incluyendo animales vacunados.

De acuerdo a la literatura internacional, la evolución genética y antigénica de estos virus, generó variantes no siempre protegidas por los anticuerpos generados por las cepas vacunales.

Por eso, este trabajo tiene como objetivos por un lado, sentar las bases de registros epidemiológicos de VDC y PVC, como así también, la aplicación de un diagnóstico molecular rápido, sensible y sencillo que permita identificar y caracterizar las cepas de VDC y PVC circulantes en nuestro país, como primer paso para el control de estas enfermedades.

Si bien este trabajo de tesis tiene como objetivo el estudio de estos 2 patógenos, en beneficio de la claridad de la presentación, se dividió en 2 capítulos.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo de Tesis es caracterizar molecularmente las cepas de VDC y PVC circulantes en perros de la República Argentina.

Los objetivos específicos son:

1 – Desarrollar un método de diagnóstico molecular rápido y sencillo para detectar VDC y PVC en muestras de animales enfermos.

2 – Establecer las diferencias moleculares entre las cepas salvajes y cepas vacunales de ambos virus.

3 – Seleccionar cepas salvajes candidatas para ser utilizadas en el desarrollo de vacunas actualizadas de nueva generación.

4 – Crear de una base de datos con información epidemiológica relevante respecto de los animales afectados.

**CAPITULO I: ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL VIRUS
DISTEMPER CANINO**

1. Introducción

Tabla 1: Virus que pertenecen al género *Morbillivirus* y las enfermedades que causan en sus hospedadores naturales.....3

Tabla 2: Especies susceptibles a VDC en el orden *Carnivora*.....18

2. Materiales y Métodos

Tabla 3: Aislamiento de cepas de VDC Japonesas en diferentes líneas celulares (Vero.DogSLAMtag, B95a, y Vero).....43

3. Resultados

Tabla 4: Identificación de los animales en cuyas muestras se detectó y secuenció el fragmento de 871 pb del gen de la H de VDC.....55

Tabla 5: Porcentaje de identidad aminoacídica calculado por el método ClustalW entre las secuencias deducidas del fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina (residuos 305-594), cepas de VDC Argentinas salvajes (Arg 1-24), vacunas comerciales (Vac 1 – 4 y “Recombitek”) y 3 cepas vacunales de referencia (Ond, Snyder Hill y Convac)....57

Tabla 6: Porcentajes de identidad de las cepas locales (Arg 1-24), con respecto a cepas aisladas en otros países (Italia 111/03, Dinamarca, 404 Alemania, Han90 Alemania, 98-002 Japón, KDK-1 Japón, Turquía, Groenlandia, USA) y con respecto a la cepa vacunal de referencia Onderstepoort en el fragmento de 871 pb (290 aa) del gen de la Hemaglutinina.....58

Tabla 7: Porcentajes de identidad de 3 cepas locales (“Marcos” M74, “Kalua” M40 y “Marga” M7) en el fragmento de 174 pb (58 aa), con respecto a las cepas aisladas en otros países (A7517 USA, China TN, Danish dog, Greenland, Han 90, Ger 404, It 111/03, KDK-1, 98-002) y con respecto a la cepa vacunal de referencia Onderstepoort.....64

Tabla 8: Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales vacunados y de los animales no vacunados que resultaron positivos para la detección de VDC.....76

Tabla 9: Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales con síntomas clínicos de VDC y de los animales sin sintomatología clínica que resultaron positivos y negativos para la detección de VDC.....79

1. Introducción

Figura 1: A) Filogenia de la Familia <i>Paramyxoviridae</i> . B) Filogenia de los <i>Morbillivirus</i>	3
Figura 2: Dibujo esquemático de la estructura de un Paramixovirus.....	4
Figura 3: Esquema del genoma y codificación de VDC.....	4
Figura 4: Esquema de la entrada del virus a la célula. Fusión a la membrana celular....	8
Figura 5: Ciclo Viral de VDC.....	9
Figura 6: Patogénesis de DC y signos clínicos asociados.....	11
Figura 7: A: Conjuntivitis provocada por VDC, B) “Hardpad”, endurecimiento de las almohadillas plantares, C) Hipoplasia en el esmalte dental.....	12
Figura 8: A) Lesión pulmonar de un perro salvaje Africano. B) Cuerpos de inclusión virales.....	13
Figura 9: Árbol filogenético de las familias del orden <i>Carnivora</i> con especies susceptibles a VDC.....	19
Figura 10: Razones generales para la falla vacunal.....	25

2. Materiales y Métodos

Figura 11: Genoma de VDC con la región amplificada de la NP para diagnóstico de VDC.....	29
Figura 12: Esquema del gen de la Hemaglutinina. El dibujo muestra la región de 871 pb amplificada y analizada.....	30
Figura 13: Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC, región de 347 pb analizada.....	32
Figura 14: Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC, región de 174 pb analizada.....	33
Figura 15: Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC.....	34
Figura 16: Metodología de obtención de células mononucleares de sangre periférica.....	39

3. Resultados

Figura 17: Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC en vacunas comerciales de la República Argentina.....	47
Figura 18: Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP del VDC en 5 muestras de sangre coagulada proveniente de perros de la República Argentina.....	48
Figura 19: Límite de sensibilidad de la técnica de RT-PCR para la detección de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC.....	49
Figura 20: Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos del fragmento de 287 pb del gen de la NP.....	50
Figura 21: Detección por RT-PCR de un fragmento de 871 pb del gen de la H de VDC en 8 casos de la República Argentina.....	51
Figura 22: Análisis de restricción del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de VDC derivado de cepas Argentinas salvajes y del virus presente en una vacuna comercial.....	52

Figura 23: RT-PCR de un fragmento de 347 pb del gen de la H de VDC en 3 muestras clínicas.....	53
Figura 24: Amplificación del gen completo de la Hemaglutinina, a partir de una muestra de sangre de un animal vacunado, con sintomatología clínica de VDC.....	54
Figura 25: Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina.....	60
Figura 26: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas (290 aa) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H de VDC de cepas locales e internacionales.....	62
Figura 27: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas del gen completo de la hemaglutinina obtenidas de 2 cepas locales.....	65
Figura 28: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas del gen de la H de VDC de cepas locales e internacionales.....	66
Figura 29: Sitios potenciales de glicosilación de la secuencia del gen de la Hemaglutinina de cepas de VDC.....	67
Figura 30: RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la nucleoproteína (NP) de VDC en PBMC y en células B95a.....	68
Figura 31: Detección por RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC en células B95a y en células Vero infectadas con diferentes cepas de VDC.....	69
Figura 32: Efecto citopático de una cepa local de VDC en células VeroSLAM.....	70
Figura 33: Ensayo de Inmunoperoxidasa en células VeroSLAM.....	70
Figura 34: Ensayo de Western blot con un mAb anti NP de VDC.....	71
Figura 35: Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de la cepa M107 “Bruno” antes y después del pasaje por células VeroSLAM.....	72
Figura 36: Distribución geográfica de las muestras positivas por RT-PCR, para el fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC.....	73
Figura 37: Distribución temporal de las muestras analizadas.....	74
Figura 38: Número de perros diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales vacunados y no vacunados.....	75
Figura 39: Número de animales vacunados que resultaron diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales que presentaban sintomatología ó no.....	77
Figura 40: Número de animales no vacunados que resultaron diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales que presentaban sintomatología ó no.....	78
Figura 41: Porcentaje de perros VDC positivos en diferentes grupos de edades.....	79
Figura 42: Distribución de edades de animales VDC positivos, vacunados y no vacunados.....	80

1.1 Historia del VDC

Durante siglos, las infecciones por Morbillivirus han sido de gran importancia para poblaciones humanas y de animales. El virus de Sarampión, que fue introducido por los Europeos en América, devastó poblaciones de Americanos nativos. El Rinderpest virus (RPV), una infección del ganado vacuno, fue llevado a Europa por comerciantes que vinieron de Asia y después a África por las guerras coloniales. Especies de animales tanto domésticas como salvajes, fueron severamente afectadas. El Sarampión, todavía prevalece como una importante enfermedad de la niñez especialmente en países en desarrollo (WHO, 2007), pero además, continúan ocurriendo brotes en países desarrollados cuando la cobertura vacunal disminuye (Mossong and Muller, 2000), (van den Hof et al., 2001).

El Distemper Canino (DC), es un Morbillivirus que afecta a perros y a otros carnívoros salvajes. La enfermedad, provocada por este virus, ha sido reconocida por al menos 250 años. Según Blancou (Blancou, 2004), la enfermedad fue descrita por primera vez en 1746 por Ulloa en su trabajo "*Relación histórica del viaje a la América meridional*". De acuerdo con Heusinger, el Distemper fue llevado desde Perú a España durante el siglo XVII y desde allí, diseminado a otras partes de Europa y Rusia en pocos años. La distribución epidémica de DC en Europa, empezó alrededor de los años 1760s. En 1815, Jenner, observó que el DC entre los perros, era tan contagioso como lo era el sarampión, ó la viruela entre los humanos.

En 1844, Karle pudo transmitir la enfermedad experimentalmente depositando las secreciones de animales enfermos en los labios de perros jóvenes.

La etiología del DC fue discutida durante muchos años, hasta que en 1905 Henri Carré demostró en Francia, que la enfermedad era causada por un virus filtrable. Es por esto que a esta enfermedad, se la llama "Maladie de Carré". También tiene otras denominaciones: "Hundestaube" en Alemania, "Cimurro" en Italia, "Moquillo Canino" en países hispanoparlantes, "Esgana" en Portugal y "Cinomose" en Brasil.

La primera vacuna contra DC, fue desarrollada en 1923 por el italiano Puntoni a partir de cerebro de perro con encefalitis provocada por VDC, y estaba constituida por virus inactivado con formalina. La protección obtenida con las vacunas inactivadas era limitada y ya no se utilizan. Las vacunas a virus vivo modificadas (VVM) con las cuales el DC fue controlado eficazmente, fueron desarrolladas a fines de los años 1950s. Las cepas virales fueron adaptadas a huevos de pollo embrionados [Lederle, (Cabasso and

Cox, 1952) y Onderstepoort, (Haig, 1956)] y a células de riñón canino (Rockborn) (Rockborn, 1959).

Si bien la utilización de vacunas vivas modificadas redujo significativamente la incidencia de DC, todavía continúa la circulación del virus en poblaciones de perros y otros carnívoros susceptibles. La circulación viral se manifiesta con la ocurrencia de casos esporádicos, como así también de epidemias ó endemias en las cuales muchas veces están involucrados animales vacunados (Blixenkronne-Moller et al., 1993).

La negligencia en cuanto a la vacunación, lleva a una pobre cobertura vacunal y es una explicación de los brotes a nivel poblacional. El cambio antigénico en las cepas salvajes de DC ha sido sugerido también como causa por la cual las vacunas actuales no protegen adecuadamente de la enfermedad.

1.2 Clasificación del Virus

El virus Distemper Canino (VDC) pertenece al género *Morbillivirus*, orden *Mononegvirales*, en la familia *Paramyxoviridae*. Esta familia, se divide en 2 subfamilias *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. Los géneros de la subfamilia *Pneumovirinae* son *Pneumovirus* y *Metapneumovirus*. Los géneros de la subfamilia *Paramyxovirinae* son *Respirovirus*, *Henipavirus*, *Rubulavirus* y *Morbillivirus*; y se clasifican según criterios biológicos: reacción antigénica cruzada entre los miembros de un mismo género y presencia (*Respirovirus* y *Rubulavirus*) ó ausencia (*Morbillivirus*, *Henipavirus*) de actividad neuraminidasa de la proteína H (Figura 1 A).

En la Figura 1 B, se observan las relaciones filogenéticas entre los miembros del género *Morbillivirus*.

Algunos ejemplos de *Morbillivirus*, las enfermedades que causan y sus hospedadores naturales, se presentan en la Tabla 1.

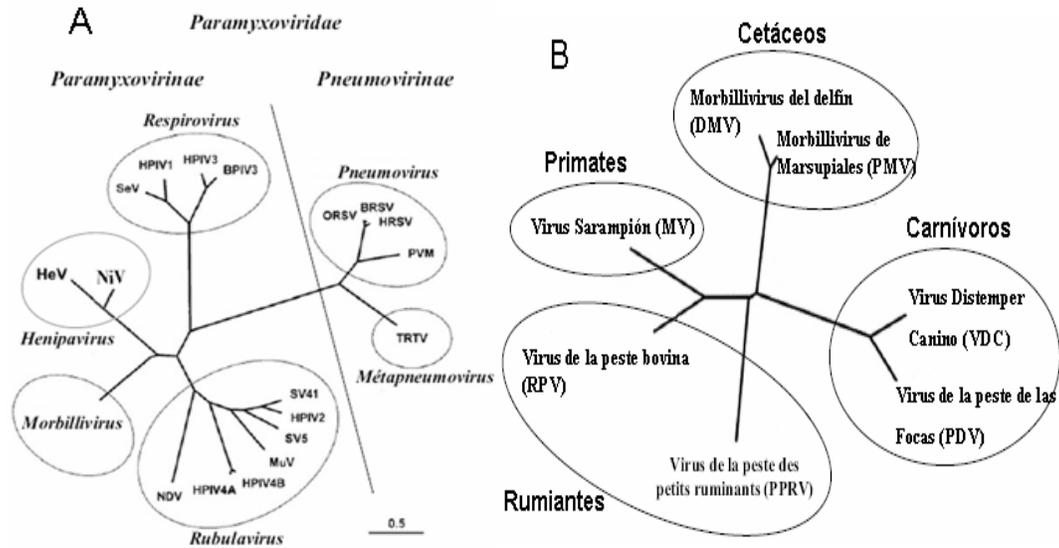


Figura 1 - A) Filogenia de la Familia *Paramyxoviridae*. B) Filogenia de los *Morbillivirus*. Las relaciones filogenéticas fueron establecidas comparando las secuencias nucleotídicas de los genes de la Nucleoproteína.

Virus	Enfermedad	Huésped Natural
Measles virus (MV)	Sarampión	Humano
Rinderpest virus (RPV)	Rinderpest	Ganado vacuno, cabras, ovejas, cerdos
Peste des petits ruminants virus (PPRV)	Peste des petits ruminants	Cabra, oveja
Dolphin morbillivirus (DMV)		Delfín
Porpoise morbillivirus (PMV)		Marsopa
Canine distemper virus (CDV)	Distemper Canino	Perro y cánidos salvajes
Phocine distemper virus (PDV)		Foca
DMV y PMV están actualmente unidos bajo la denominación común de Morbillivirus de los cetáceos “cetacean morbilliviruses” (CMV).		

Tabla 1 - Virus que pertenecen al género *Morbillivirus* y las enfermedades que causan en sus hospedadores naturales (Osterhaus et al., 1995) y (Di Guardo et al., 2005).

Los *Morbillivirus*, tienen un genoma a ARN simple cadena, lineal no segmentado de polaridad negativa de alrededor de 15.900 nucleótidos (nt). El ARN está envuelto en una nucleocápside helicoidal formada por la Nucleoproteína (NP). Los complejos ribonucleoproteicos maduros tienen copias de las proteínas Phospho (P) y Large (L). La envoltura lipídica, derivada de las células hospedadoras, tiene insertadas dos glicoproteínas virales, la Hemaglutinina (H) y la proteína de Fusión (F). Las partículas virales son pleomórficas, generalmente redondeadas y de un diámetro de entre 100 y 300 nm (Lund et al., 1984) (Figura 2).

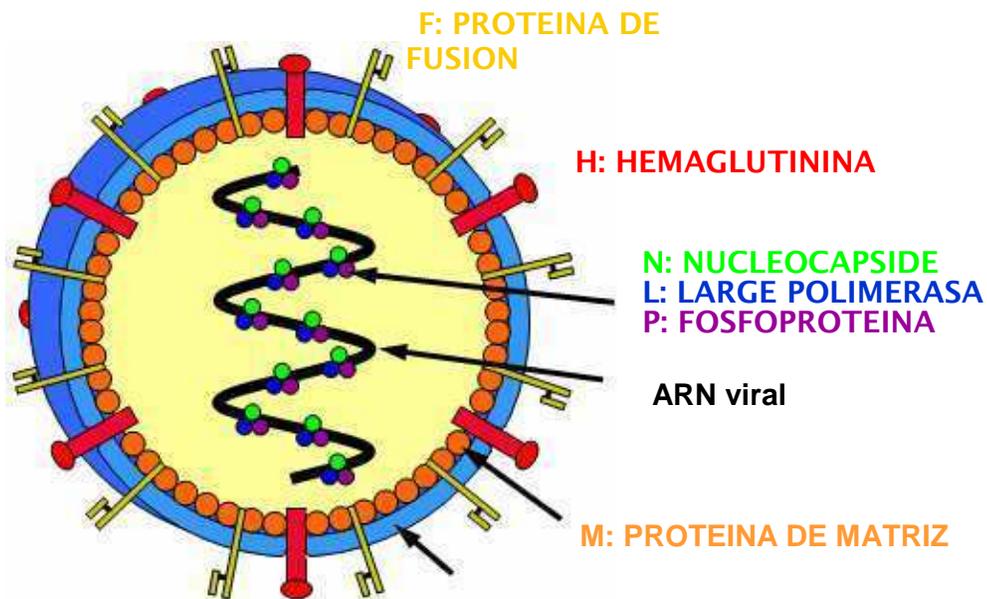


Figura 2 - Dibujo esquemático de la estructura de un Paramixovirus. (Wikipedia, 2008)

Internamente, la envoltura está estabilizada por una capa formada por la proteína de Matriz (M). El genoma está organizado como se muestra en la Figura 3, con regiones 3' y 5' no codificantes (3'UTR y 5' UTR, respectivamente) y los genes codificantes de la N, P (C, V), M, F, H y L. El gen P codifica para 2 proteínas no estructurales denominadas C y V, además de la proteína P.

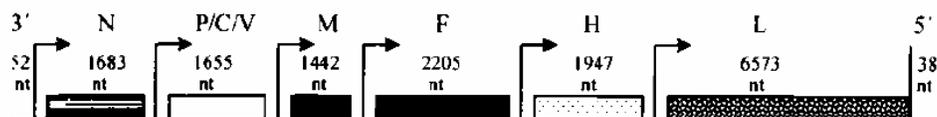


Figura 3 - Esquema del genoma y codificación de VDC (Frisk et al., 1999).

1.3 Las proteínas virales

Durante la transcripción, la polimerasa viral, tiene tendencia a despegarse del templado en cada secuencia intergénica y a recomenzar la transcripción en el extremo 3' del genoma. Esto, conduce a un gradiente de transcripción de los 6 genes desde el extremo 3' hacia el 5' que se traduce en una abundancia citoplasmática diferencial de las proteínas, siendo la NP la más representada mientras que la L, es la menos traducida.

1.3.1 Nucleoproteína (NP)

El ARNm de la NP es el primer transcripto a partir del ARN genómico. La NP constituida por 525 aminoácidos (aa), de aproximadamente 58.2 KDa, juega un rol central en la replicación del ARN genómico. La NP, se autoensambla alrededor de los ARNs virales genómicos y antígenómicos. Esta estructura, asociada a las proteínas P y L, es necesaria como templado para la replicación y transcripción.

1.3.2 Proteínas codificadas por el gen P (P, C, V)

El gen P, codifica además de la proteína P (de peso molecular relativo de 54.65 KDa), otras 2 proteínas. La proteína C está codificada por el mismo ARNm, traducido a partir de un codón de iniciación situado 19 nucleótidos río abajo con respecto a la proteína P (Bellini et al., 1985).

La proteína V, comparte el mismo codón iniciador con la proteína P y también los primeros 231 aminoácidos, pero un proceso de maduración del ARN ("editing") añade una guanosina corriendo el marco de lectura, generando un dominio de 68 aa rico en cisteínas con capacidad de unir zinc, en el extremo carboxilo terminal de la proteína P. (Cattaneo et al., 1989), (Liston and Briedis, 1994).

1.3.3 Proteína de matriz (M)

La proteína de matriz (335 aa, con un peso molecular relativo de 37.6 KDa) es una proteína básica con muchas regiones hidrofóbicas conservadas (Bellini et al., 1986).

Dentro de las células infectadas, la proteína está asociada con las nucleocápsides, en la cara interna de la membrana plasmática (Hirano et al., 1992). La proteína M, se considera como un organizador central de la morfología y del ensamblaje del virión, interactuando con la Nucleocápside, la bicapa lipídica y los dominios citoplasmáticos de las glicoproteínas H y F.

1.3.4 Proteína de fusión (F)

La proteína F (550 aa, 72.9 KDa) es una glicoproteína transmembrana de tipo I, responsable de la fusión de la envoltura viral y de la membrana celular en los inicios de la infección. Además, es responsable, en la parte final del ciclo viral, de la fusión de las membranas de las células infectadas que expresan las glicoproteínas H y F, con las membranas celulares vecinas que expresan los receptores virales.

La proteína F, es sintetizada y glicosilada dentro del retículo endoplasmático (RE) bajo la forma de un precursor inactivo F0. Luego se activa proteolíticamente en el trans-Golgi, formándose de un heterodímero activo, F1 y F2, unidos por un puente disulfuro. La subunidad F1, contiene un grupo muy conservado de aa hidrofóbicos en su extremo amino terminal: el péptido fusión, que juega un rol importante en el proceso de fusión, cuando se inserta en la membrana de la célula blanco. Una única región hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal, es responsable del anclaje de la proteína F dentro de la membrana lipídica. La parte central de la subunidad F1, es una región rica en cisteínas. La subunidad F2, tiene 3 sitios potenciales de glicosilación y un péptido señal hidrofóbico que determina la localización de membrana de la proteína F.

1.3.5 Proteína de unión (H)

La proteína de unión de los *Paramyxovirus* media la unión de los viriones a los receptores celulares y posee la capacidad de promover la fusión; actividad que se

expresa vía la interacción física con la proteína F. La glicoproteína de unión de los respirovirus y los rubulavirus, se une a los receptores glicoproteicos ó glicolipídicos que contienen ácido siálico y permite al virus aglutinar los glóbulos rojos (hemaglutinación) y tiene además actividad neuraminidasa reflejada en el clivaje enzimático del ácido siálico (de ahí, su nombre hemaglutinina-neuraminidasa, HN).

La proteína H de los Morbillivirus como es el caso de VDC, induce únicamente la aglutinación de los glóbulos rojos de primates y además, carece de actividad neuraminidasa ó esterasa.

El gen de la proteína H, está constituido por un sólo marco abierto de lectura que codifica para una proteína transmembrana tipo II, de 617 aa de un peso molecular relativo de aproximadamente 68.15 KDa.

La proteína H, tiene un dominio citoplasmático amino terminal, un dominio hidrofóbico único que funciona como una secuencia señal (no clivada) para la localización en membrana y como dominio de anclaje a membrana y además, posee un ectodominio carboxilo terminal.

El grado de homología de secuencia de la proteína H entre los Morbillivirus es variable: 60 % entre las proteínas de Sarampión y Rinderpest virus y 37% entre las hemaglutininas de Sarampión y VDC (Gerald et al., 1986), (Kovamees et al., 1991), (Tsukiyama et al., 1987). Datos inmunológicos y de secuencia, mostraron claramente que la proteína H es la más variable entre los Morbillivirus (Haas et al., 1999).

Los residuos de cisteína y prolina están conservados, lo cual sugiere que la estructura tridimensional global de la proteína H está conservada entre los Morbillivirus.

Basado en el análisis filogenético de regiones subgenómicas de la proteína F y P y en el gen completo de la hemaglutinina, las cepas de VDC se han dividido en distintos linajes que principalmente están asociados al área geográfica en la cual la cepa es aislada (Lednicky et al., 2004), (Lan et al., 2005), (Martella et al., 2006).

1.3.6 Proteína Large (L)

La proteína L (2183 aa, aproximadamente 248 KDa) está presente en poca cantidad dentro de las células infectadas. Esta se asocia con la proteína P para formar la polimerasa viral y es uno de los constituyentes de la nucleocápside en el virión.

1.4 Ciclo replicativo de VDC

El Virus Distemper Canino, se propaga siguiendo 2 alternativas. La primera, consiste en la infección de una célula, la transcripción y traducción de las proteínas virales, la replicación del genoma, la brotación y liberación de nuevas partículas virales infecciosas. La otra alternativa es a través de la formación de células gigantes multinucleadas (sincicios) que resultan de la fusión entre una célula infectada expresando las glicoproteínas H y F, y una célula vecina expresando el receptor de VDC.

1.4.1 Unión del virus y penetración en de la célula hospedadora

La proteína H de VDC, media la unión de los viriones a los receptores celulares. Esto produce cambios conformacionales que favorecen la actividad fusogénica de la proteína F, permitiendo la fusión de la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Luego de la entrada del virus a la célula, la envoltura del virus se pierde y se produce la liberación de la nucleocápside dentro del citoplasma (Figura 4).

La presencia del receptor determina la susceptibilidad de la célula al virus. Sin embargo, para que ocurra la replicación viral, se requiere que la célula sea además permisiva.

Esta etapa de adsorción puede ser inhibida por los anticuerpos neutralizantes, los que al unirse a los viriones impiden la interacción de éstos con los receptores celulares.

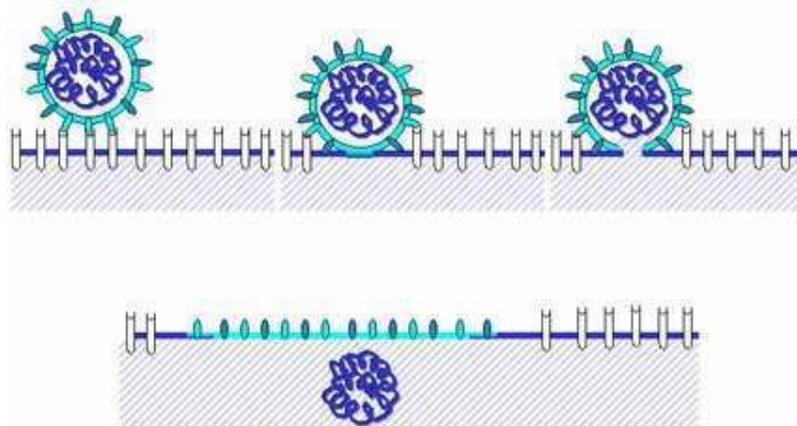


Figura 4 - Esquema de la entrada del virus a la célula. Fusión a la membrana celular (<http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>).

1.4.2 Transcripción y replicación

Una vez dentro del citoplasma, el genoma viral, es transcrito en ARNm por la polimerasa viral compuesta por la asociación de las proteínas L y P. Este ARNm permitirá la síntesis de las proteínas virales.

Después de una primera etapa de transcripción, comienza en el citoplasma y bajo el control de la polimerasa viral, la síntesis del ARN (+), el antígeno que servirá de templado para la producción de nuevas hebras de ARN genómico.

El ARN genómico sintetizado nuevamente, es encapsidado y transportado hacia la membrana plasmática para la formación de nuevas partículas virales (Figura 5).

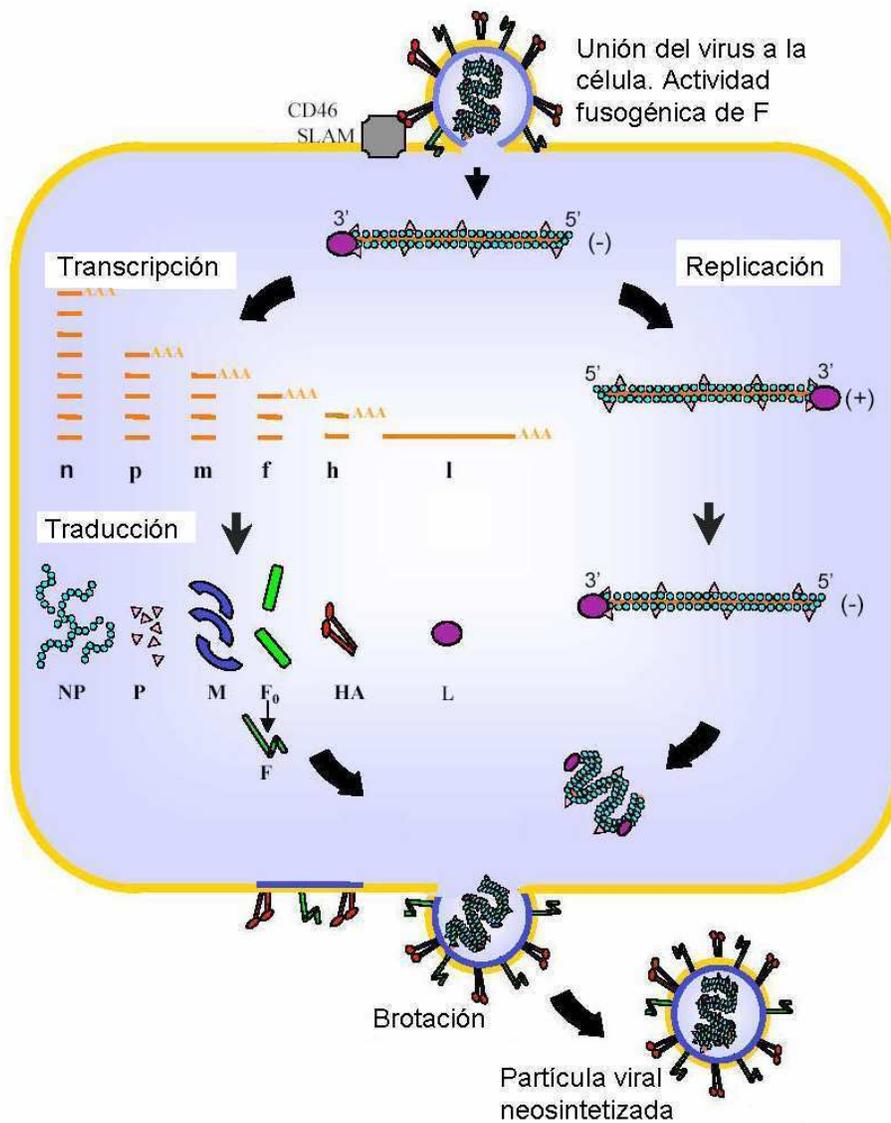


Figura 5 - Ciclo viral de VDC (Massé, 2004).

1.4.3 Encapsidación del genoma y brotación

Al mismo tiempo que es sintetizado, el ARN es encapsidado por las proteínas NP, P y L. La ribonucleocápside se asocia con las proteínas M que están en la cara interna de la membrana plasmática adonde han sido previamente exportadas las glicoproteínas H y F. Este ensamblaje, se realiza principalmente a nivel de *rafts*, regiones ricas en glicoesfingolípidos y colesterol de la membrana plasmática.

La brotación por la membrana, permitirá la liberación de partículas virales nuevamente sintetizadas, listas para infectar a otras células.

1.5 Propiedades físicas de VDC

El VDC es susceptible a la luz ultravioleta (UV) y es extremadamente susceptible a solventes orgánicos [cloroformo, éter (<0.5%), formalina, fenol (0.75%)] y al calor. A temperaturas de 50 °C ó mayores, el virus se destruye en media hora, pero puede sobrevivir a 25 °C durante 48 horas, a 5 °C durante 14 días (Shen and Gorham, 1980) ó a -65 °C por al menos 7 años.

A temperaturas entre 0 y 4 °C, el virus sobrevive en el ambiente durante semanas. La infectividad viral se pierde arriba de un pH de 10,4 ó debajo de 4,4. Los procedimientos de desinfección de rutina son efectivos en destruir al VDC en perreras, criaderos u hospitales veterinarios.

1.6 Patogénesis y cuadro clínico

La patogénesis y el cuadro clínico de DC dependen de determinantes intrínsecos tanto del virus como del animal hospedador.

Patogénesis

La patogénesis de DC ha sido estudiada ampliamente en perros (Figura 6) (Appel, 1969). Brevemente, la invasión del cuerpo del animal es seguida, dentro de las primeras 24 hs, por la multiplicación de VDC en macrófagos de los tejidos locales, se disemina

dentro de los macrófagos a las amígdalas y nódulos linfáticos bronquiales, luego se replica entre los días 2 y 4 postinfección (p.i.) y se disemina a otros órganos linfáticos. El virus se multiplica de los 4 a 6 días post-infección (d.p.i.), en los folículos linfáticos del bazo, en la lámina propia del estómago e intestino delgado y en las células de Kupffer del hígado. Este proceso es acompañado por fiebre entre los 3 y 6 d.p.i. La diseminación posterior a tejidos epiteliales y al sistema nervioso central (SNC) entre los 8 y 9 d.p.i. depende del estado inmunológico y sanitario del perro, y tiene lugar luego de una viremia con el virus tanto asociado a células como a la fase plasmática de la sangre.

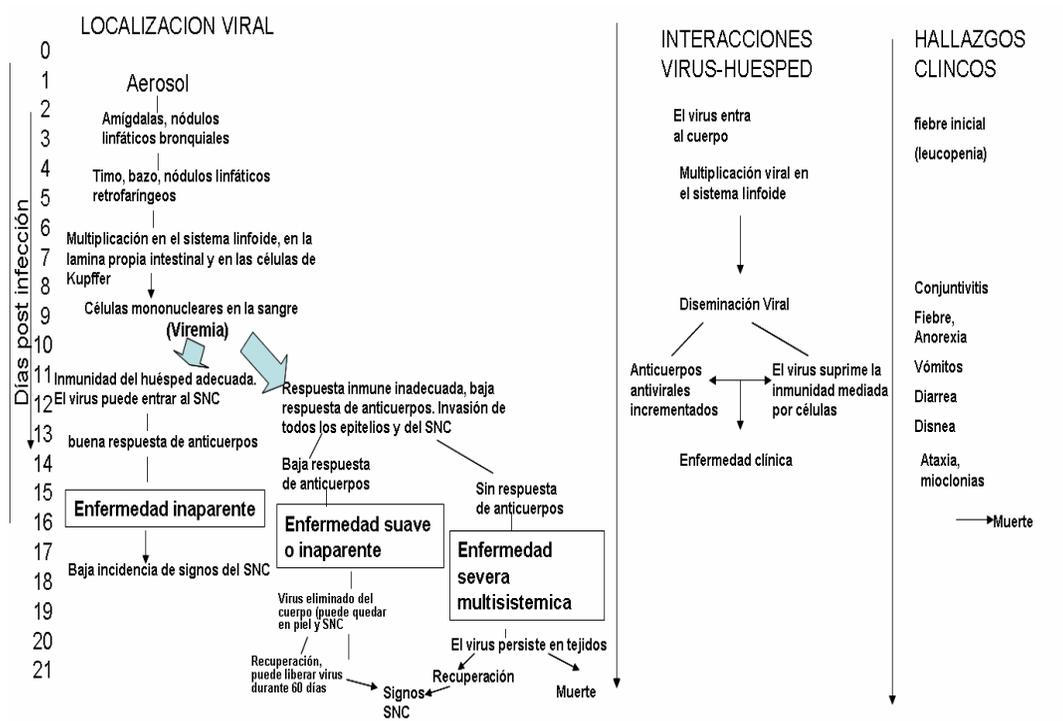


Figura 6 - Patogénesis de DC y signos clínicos asociados (Rikula, 2008).

Cuadro clínico

En todas las especies susceptibles, la enfermedad se manifiesta frecuentemente con signos respiratorios, gastrointestinales y del Sistema Nervioso Central (SNC). A la viremia, se asocia una curva de fiebre bifásica y malestar general (Deem et al., 2000).

El primer signo sistémico es por lo general una respuesta febril inicial a los 3-6 d.p.i. que generalmente transcurre sin ser percibida.

Los signos incluyen apatía, pérdida de apetito, fiebre e infección en el tracto respiratorio superior. También son comunes formas suaves de la enfermedad clínica.

La descarga bilateral ocular serosa (Figura 7 A), puede convertirse en mucosa, acompañada de tos y disnea. En los casos más severos, la tos seca rápidamente se transforma en productiva, y los sonidos del tracto respiratorio inferior aumentan. Luego del decaimiento y la anorexia, se presentan vómitos y diarrea, que puede variar en consistencia desde acuosa hasta mucosa y sanguinolenta.

Los signos neurológicos (que pueden variar de acuerdo a las áreas del SNC involucradas) pueden coincidir con los signos sistémicos, pero por lo general empiezan entre una a 3 semanas después de la recuperación de la enfermedad sistémica y son típicamente progresivos. Los signos neurológicos pueden también surgir varios meses después y sin ningún signo sistémico que los preceda. La presencia de signos neurológicos, determina fuertemente el pronóstico de DC.

Otros signos asociados con la infección de VDC incluyen dermatitis vesicular o pustular en cachorros e hiperqueratosis nasal y digital (“hard pad disease”) (Figura 7 B).

La infección con VDC anterior a la salida de los dientes definitivos puede causar hiperplasia del esmalte dental caracterizado por irregularidades en la superficie de los dientes definitivos (Figura 7 C).

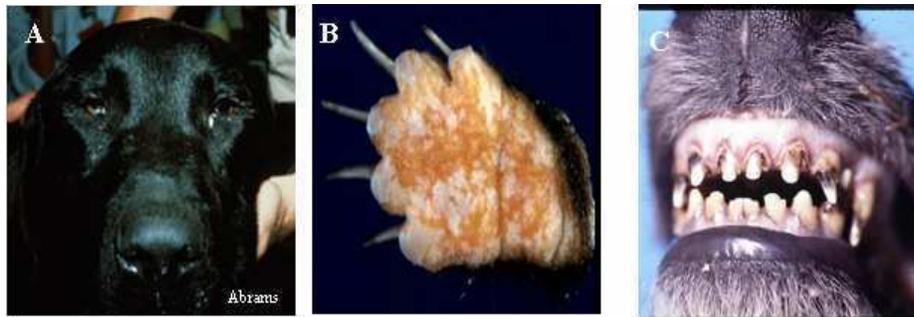


Figura 7 - A) Conjuntivitis provocada por VDC. B) “Hardpad”, endurecimiento de las almohadillas plantares. C) Hipoplasia en el esmalte dental. Copyright Cornell Veterinary Medicine.

1.7 Confirmación de laboratorio de la sospecha clínica de DC

La sospecha clínica de DC puede ser confirmada detectando el VDC ó la respuesta inmune específica en las muestras provenientes de los animales afectados.

La detección de VDC en improntas conjuntivales, en epitelios de las amígdalas ó genitales, utilizando técnicas de inmunofluorescencia (IF), es posible sólo dentro de las primeras 2 semanas p.i., mientras están presentes los signos clínicos.

Como los títulos de anticuerpos aumentan en asociación con la recuperación clínica, el virus puede estar enmascarado por los anticuerpos ó desaparecer de los epitelios. La sensibilidad de la técnica de inmunofluorescencia es menor al 40% (Blixenkronne-Moller et al., 1993), (Leisewitz et al., 2001).

La inmunohistoquímica puede ser utilizada para demostrar la presencia de antígenos de VDC en las almohadillas plantares y en biopsias de piel ó en muestras de bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, estómago, duodeno ó vejiga, tomadas post-mortem. (Figura 8 A y B).

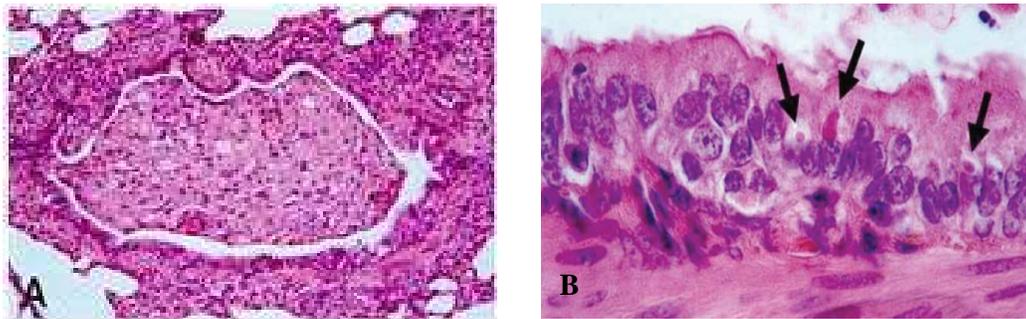


Figura 8 - A) Lesión pulmonar de un perro salvaje Africano. B) Cuerpos de inclusión virales (halos claros) (van de Bildt et al., 2002).

La examinación histológica revela cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares e intracitoplasmáticos en numerosos tejidos.

1.7.1 Diagnóstico molecular

La retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) puede demostrar la presencia de VDC en células del “buffy coat” (capa leucocitaria) de los perros con infección aguda y en suero, sangre entera, líquido cefalorraquídeo (LCR) u orina de perros con DC sistémico ó neurológico (Shin et al., 1995), (Frisk et al., 1999), (Saito et al., 2006).

La reacción de RT-PCR puede ser aplicada para la detección de VDC en frotis de células epiteliales y de otras muestras de tejidos.

Un resultado positivo de RT-PCR, es indicativo de infección por VDC, mientras que un resultado negativo debe ser informado ó interpretado como “no detectable”.

En el caso de animales que han sido vacunados recientemente (dentro de los 14 días), un resultado positivo de RT-PCR, puede ser atribuido a la detección cepa vacunal (Shin et al., 1995), (Kim et al., 2001).

1.7.2 Aislamiento Viral

El aislamiento viral, no es sencillo de realizar con las cepas salvajes de VDC (Mochizuki et al., 1999). Las cepas virulentas de VDC necesitan una adaptación previa para poder propagarse en cultivos de líneas celulares epiteliales ó fibroblásticas utilizadas de rutina en los laboratorios.

1.7.3 Serología

La infección por VDC puede ser confirmada demostrando los anticuerpos específicos contra el agente. Un incremento de 4 veces en el nivel de anticuerpos en sueros pareados tomados a los 10 y a los 21 d.p.i., es indicativo de infección. Sin embargo, este método no es adecuado para la detección de una infección reciente, ya que los títulos están de por sí altos en el primer muestreo y un aumento de 4 veces del título no puede ser demostrado.

Por otro lado, la detección de IgM específicas contra VDC es indicativa de una infección reciente. La IgM se puede medir hasta de 3 meses p.i. y 3 semanas después de la primera vacunación. Existen ensayos de ELISA disponibles para medir IgM (Blixenkrone-Moller et al., 1991), (von Messling et al., 1999), (Soma et al., 2003), (Latha et al., 2007).

El aumento de anticuerpos contra VDC en el LCR, es evidencia definitiva de infección neurológica por VDC dado que la barrera hematoencefálica permanece intacta.

1.7.4 Hemograma

En casos agudos se encuentra linfopenia, trombocitopenia, y los monocitos pueden estar aumentados.

1.8 Epidemiología

Dado que VDC no persiste en una forma infecciosa después de la resolución de una infección, y que tanto la infección como la vacunación confieren inmunidad a largo plazo, se necesita una fuente constante de individuos susceptibles, para la proliferación de VDC en la población.

Se ha estimado, por ejemplo, que se necesitan al menos 300.000 individuos para mantener la circulación de sarampión.

Teniendo en cuenta el amplio rango de huésped de VDC, la circulación de VDC depende no sólo del tamaño de las poblaciones de perros, sino del tamaño total combinado de todas las poblaciones de especies susceptibles en un área. El alcance de una epidemia de VDC puede ser catastrófico, como el caso de más de 10.000 focas del mar Caspio que murieron en sus costas en el año 2000 (Kennedy et al., 2000).

Además, el contacto entre especies susceptibles, es de crucial importancia para la presencia continua del virus. Ver apartado “Detección de Distemper Canino en Zorros Silvestres”.

1.8.1 Determinantes intrínsecos de los hospedadores y del agente viral.

Se estima que la tasa de infección, es significativamente más alta que la tasa de enfermedad y que el 50 % de las infecciones en perros pueden permanecer subclínicas (Rikula, 2008).

La prevalencia de DC en perros urbanos, es más alta entre los 3 y 6 meses de edad (Jozwik and Frymus, 2002). Sin embargo, en poblaciones susceptibles, VDC es capaz de causar mortalidad en perros de todas las edades (Bohm et al., 1989).

Los anticuerpos maternos recibidos principalmente del calostro, tienen una vida media de 8.4 días y por lo general, se negativizan a las 12 -14 semanas.

Se ha reportado que las razas braquicefálicas, es decir perros de morro chato (Boxer, Bull Dog, etc.) tienen menor prevalencia de la enfermedad, mortalidad y secuelas que las razas dolicocefálicas (Collie, Pastor Alemán, Pastor Belga).

El género no juega un rol significativo en la susceptibilidad a VDC.

El VDC produce inmunidad a largo plazo en perros que han sobrevivido a la infección.

Se han descrito infecciones “*in utero*” ó transplacentales y su gravedad y pronóstico dependen de la etapa de la gestación en la que ocurre la infección (Rikula, 2008).

No hay información disponible sobre la DI 50% del virus *in vivo*. Sin embargo, en condiciones experimentales la enfermedad ha sido inducida con la inoculación intranasal de 5×10^3 DI 50% (en macrófagos de pulmón de perro), de una cepa virulenta en perros Beagles machos SPF (Specific Pathogen Free) de 4 meses de edad (Appel et al., 1982).

No existen datos cuantitativos acerca de la virulencia del VDC. La tasa de mortalidad en poblaciones no vacunadas puede alcanzar al 80% (Bohm et al., 1989), con lo cual cualitativamente, la virulencia puede ser considerada entre moderada y alta. Sin embargo, la virulencia difiere entre las cepas de VDC (Appel et al., 1984a).

La tasa de mortalidad en hurones domésticos (*Mustela putorius furo*) en Estados Unidos por ejemplo, se acerca al 100% (Deem et al., 2000).

1.8.2 Interacción hospedador-agente en la enfermedad

La duración del período infeccioso, es generalmente de dos a tres semanas (una semana antes y de una a dos semanas después del comienzo de los síntomas). Excepcionalmente, puede durar entre 60 y 90 días.

El período de incubación (el período que va desde la infección hasta la aparición de signos clínicos) es frecuentemente de una a dos semanas.

La orina y la saliva de perros infectados experimentalmente mostraron ser infectivas entre los días 6 al 22 p.i. y del 7 al 41 p.i. respectivamente (Shen et al. 1981).

El VDC no tiene verdaderos estados portadores, pero la presencia del virus puede ser demostrada después de la enfermedad clínica, durante largos períodos en células epiteliales y macrófagos del tracto respiratorio inferior.

El virus puede también persistir al menos 60 días en la piel, en las almohadillas plantares y en el SNC.

El “drift” antigénico en las cepas salvajes de VDC puede ser la causa del aumento de brotes en poblaciones de perros y de animales salvajes. Varios genotipos de VDC circulan simultáneamente en la población canina. (Gemma et al., 1996), (Haas et al., 1999), (Lednicky et al., 2004), (Martella et al., 2006). Sin embargo, se considera que VDC tiene sólo un tipo antigénico.

Haas et al. (1999), no encontraron, en ensayos de seroneutralización, realizados en Alemania en el año 1995, suficiente diversidad de los genes H entre las cepas salvajes y la cepa vacunal.

Por otro lado, el suero de un perro vacunado con la cepa Onderstepoort no reaccionó en un ensayo de inmunoperoxidasa, realizado con 2 cepas de campo de Japón (Gemma et al., 1996).

1.9 Transmisión de VDC

El VDC está presente abundantemente en exudados respiratorios de animales infectados y es transmitido principalmente por exposición a aerosoles ó gotitas conteniendo el virus.

El contacto directo ó indirecto entre los animales recientemente infectados (con enfermedad clínica ó subclínica) y animales susceptibles mantiene al virus en la población.

1.9.1 Ocurrencia y rango de huésped

El VDC tiene distribución mundial y es capaz de infectar prácticamente todas las familias de carnívoros terrestres del orden *Carnivora*. Ha sido asociado también con mortalidades masivas en focas Baikal ó Nerpa (*Pusa sibirica*) en Siberia y en focas del Mar Caspio (*Phoca caspica*) que pertenecen a la familia *Phocidae* de *Carnivora* (Osterhaus, 1989), (Kennedy et al., 2000) (Figura 9, Tabla 2).

Además, se ha reportado encefalitis fatal inducida por VDC en macacos Japoneses (*Macaca fuscata*) y en pecaries de collar (*Tayassu tajacu*) que pertenecen a la familia *Cercopithecidae* (orden *Primates*) y a la familia *Tayassuidae* (orden *Artiodactyla*), respectivamente (Deem et al., 2000).

La infección experimental de VDC en gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) y en cerdos (*Sus scrofa*) se asemeja a la infección de perros con cepas atenuadas de VDC, aunque en estas especies no se han reportado ni infecciones naturales ni enfermedad clínica (Gaskin, 1974), (Harder and Osterhaus, 1997).

A pesar del amplio rango de huésped, los perros son el principal reservorio de VDC.

En Argentina, se sabe que el VDC ha ocurrido en perros y también en lobos salvajes, desde los años 80 (Martino et al., 2004).

Debido a lo impracticable de una vacunación masiva en poblaciones silvestres (leones, lycasones, hienas, zorros, mamíferos marinos, etc.), en nuestro país, la herramienta de prevención es el aislamiento de los animales susceptibles, del contacto con perros domésticos. Ver apartado “Detección Distemper Canino en Zorros Silvestres”.

Familia	Genero	Especies
Felidae	Panthera	African lion (<i>Panthera leo</i>)
		Tiger (<i>Panthera tigris</i>)
		Leopard (<i>Panthera pardus</i>)
		Jaguar (<i>Panthera onca</i>)
Viverridae	Puma	Cougar, mountain lion, puma (<i>Puma concolor</i>)
	Arctictis	Binturong (<i>Arctictis binturong</i>)
Hyaenidae	Paguma	Masked palm civet (<i>Paguma larvata</i>)
	Crocuta	Spotted hyena (<i>Crocuta crocuta</i>)
Canidae	Alopex	Arctic/blue fox (<i>Alopex lagopus</i>)
	Vulpes	Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)
		Kit fox (<i>Vulpes macrotis macrotis</i>)
		Fennec fox (<i>Vulpes zerda</i>)
	Nyctereutes	Raccoon dog (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)
	Otocyon	Bat-eared fox (<i>Otocyon megalotis</i>)
	Urocyon	Grey fox (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)
	Chrysocyon	Maned wolf (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)
	Speothos	South American bush dog (<i>Speothos venaticus</i>)
	Canis	Wolf (<i>Canis lupus</i>)
		Domestic dog (<i>Canis lupus familiaris</i>)
		Australian dingo (<i>Canis lupus dingo</i>)
		Coyote (<i>Canis latrans</i>)
		African wild dog (<i>Lycaon pictus</i>)
	Ursidae	Lycaon
Ailuropoda		Giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>)
Ursus		Black bear (<i>Ursus americanus floridanus</i>)
	Grizzly bear (<i>Ursus arctos horribilis</i>)	
	Marsican bear (<i>Ursus arctos marsicanus</i>)	
	Polar bear (<i>Ursus maritimus</i>)	
Phocidae	Tremarctos	Spectacled bear (<i>Tremarctos ornatus</i>)
	Pusa	Baikal seal (<i>Pusa sibirica</i>)
		Caspian seal (<i>Pusa caspica</i>)
Ailuridae	Ailurus	Red panda (<i>Ailurus fulgens</i>)
Mephitidae	Mephitis	Striped skunk (<i>Mephitis mephitis</i>)
Procyonidae	Procyon	Raccoon (<i>Procyon lotor</i>)
		Kinkajou (<i>Potos flavus</i>)
Mustelidae	Lutra	European otter (<i>Lutra lutra</i>)
		River otter (<i>Lutra canadensis</i>)
	Meles	European badger (<i>Meles meles</i>)
	Taxidea	American badger (<i>Taxidea taxus</i>)
	Mustela	American mink (<i>Mustela vison</i>)
		European mink (<i>Mustela lutreola</i>)
		Ferret (<i>Mustela putorius</i>)
	Black-footed ferret (<i>Mustela nigripes</i>)	

Tabla 2 - Especies susceptibles a VDC en el orden *Carnivora* (Appel and Summers, 1995), (Deem et al., 2000), (Mos et al., 2003).

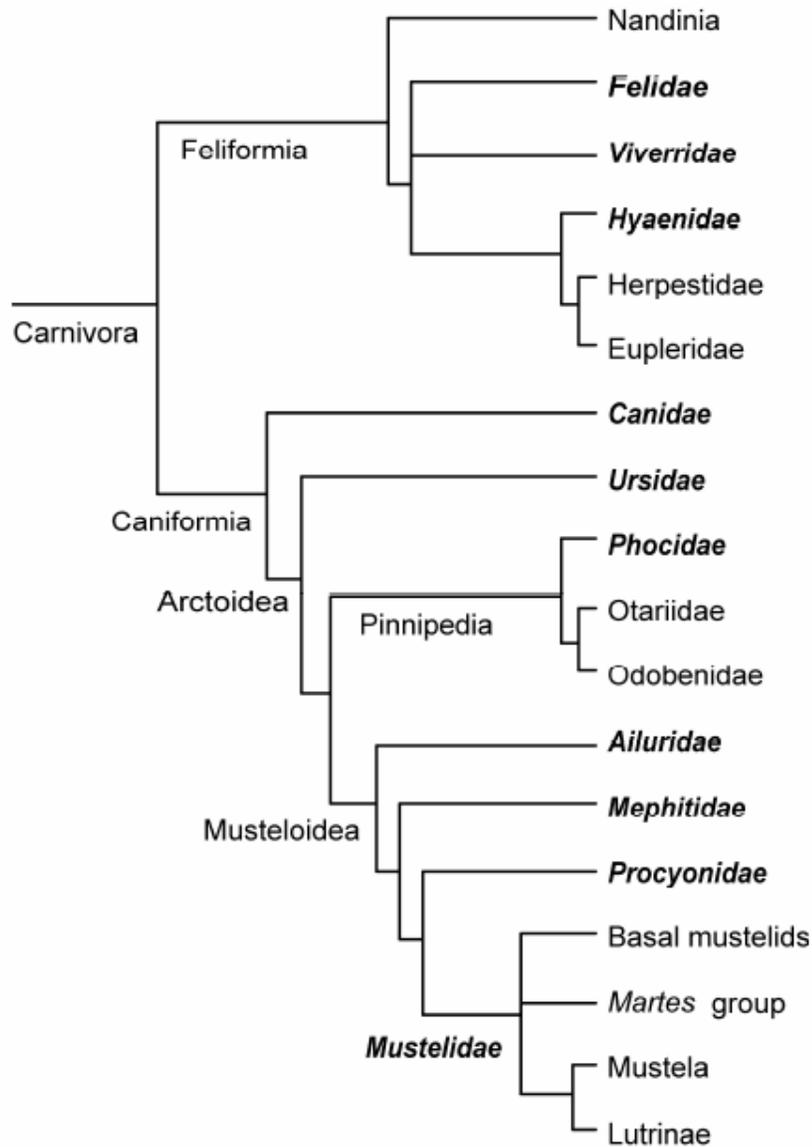


Figura 9 - Árbol filogenético de las familias del orden *Carnivora*. Las familias con especies que se ha reportado que son susceptibles a VDC están en ***negrita e itálica*** (Flynn et al. 2005, Appel and Summers 1995, Deem et al. 2000).

1.10 Prevención de DC

La vacunación es el principal medio para controlar la enfermedad.

La utilización de vacunas a virus vivo modificado (atenuadas), ha reducido de una manera considerable a nivel mundial, la incidencia de VDC en perros (Chappuis, 1995).

Además, la vacunación ha sido utilizada también para controlar el DC en varias especies de animales como el visón, el mapache, los hurones y en varias especies de animales susceptibles en zoológicos (Appel and Summers, 1995).

Por otro lado, se han informado casos de encefalitis post-vacunal en perros (Cornwell et al., 1988) y en varias especies se han observado casos de DC inducido por la vacunación (Bush et al., 1976), (Carpenter et al., 1976), (Appel and Summers, 1995), (Halbrooks et al., 1981), (Ek-Kommonen et al., 2003).

La estrategia de mantener una alta cobertura vacunal en perros y otras especies susceptibles, es de vital importancia para el control de DC (Chappuis, 1995), (Harder and Osterhaus, 1997).

1.10.1 Vacunas contra Distemper

La inmunización activa contra VDC fue practicada desde 1923 por Puntoni quien describe la utilización de cerebro de perro infectado inactivado con formalina (Appel, 1999).

Sin embargo, la inmunización activa no fue exitosa hasta el desarrollo en los años 1950s de las vacunas a virus vivo modificado (VVM).

Todas las vacunas comerciales disponibles para perros en la actualidad, son multivalentes ó sea que además del componente VDC, contienen algunos de los siguientes componentes: Adenovirus Canino inactivado (AVC-1) ó atenuado (AVC-2), Parvovirus atenuado, Parainfluenza Canino atenuado y bacterina *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae*.

Actualmente, la mayoría de los antígenos virales presentes en las vacunas tienden a ser del tipo vivos modificados.

Las vacunas de VDC, son administradas por vía subcutánea ó intramuscular.

1.10.1.1 Vacunas a virus vivo modificado (atenuadas)

En las VVM, el microorganismo es llevado a la “avirulencia” por atenuación, pero es capaz de replicar en forma limitada en el hospedador. La atenuación convencional, es

alcanzada haciendo pasajes seriados del virus en cultivos celulares ó pasajes en hospedadores susceptibles.

La vacunación con vacunas a VVM simula la infección natural, estimulando la respuesta inmune humoral y celular e induciendo la memoria inmunológica.

La mayoría de las vacunas actualmente utilizadas contra DC, contienen la cepa Onderstepoort que es una cepa adaptada a huevo, a células aviares y a células Vero (Haig, 1956), ó bien la cepa Rockborn que se produce en cultivos celulares caninos (Rockborn, 1959).

Estas vacunas presentan ventajas y desventajas. Las cepas virales adaptadas a células caninas (Rockborn) inmunizan al 100% de los perros susceptibles pero pueden producir esporádicamente encefalitis posvacunal (Cornwell et al., 1988). Por el contrario, las cepas virales adaptadas a células aviares (Onderstepoort) son más seguras para caninos aunque la respuesta inmune aparece 2 a 3 días después que la inducida por vacunas producidas en células caninas, y además poseen la desventaja de que no todos los perros susceptibles son protegidos. Cualquier vacuna del tipo modificado puede ser fatal para otros animales salvajes y de zoológico (por ejemplo, pandas rojos ó hurones de patas negras) (Summers, 1999).

Dado que existen problemas de seguridad con algunas vacunas a VVM en perros y especialmente en otras especies, se ha desarrollado una nueva generación de vacunas.

1.10.1.2 Vacunas recombinantes y a ADN

Dado que los anticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas H y F de VDC juegan un importante rol en la protección contra DC (Norrby et al., 1986) está claro que estos antígenos deben ser incluidos en las nuevas generaciones de vacunas contra DC. Para alcanzar una eficacia suficiente en estas vacunas recombinantes, se necesita la inclusión de adyuvantes mejorados u otros estimuladores de la respuesta inmune en su formulación (De Vries et al., 1988), (Visser et al., 1992), (Fischer et al., 2003).

Diversas vacunas producidas por técnicas recombinantes mostraron ser eficaces y seguras (Taylor et al., 1991), (Pardo et al., 1997), (Welter et al., 2000).

El vector basado en el virus de la viruela del canario (Canarypox), que es no replicativo en mamíferos, ha sido utilizado para expresar los genes de las glicoproteínas H y F de

VDC en una vacuna recombinante que está disponible comercialmente en nuestros días (Pardo et al., 1997).

Esta vacuna ha sido probada exitosamente en hurones (Stephensen et al., 1997). Sin embargo, los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas recombinantes no son tan altos como los inducidos por las vacunas VVMs (Pardo et al., 1997), y la duración de la inmunidad es probablemente más corta que la de las vacunas a VVMs (Schultz, 2006).

Las vacunas a ADN están todavía en etapas experimentales (Sixt et al., 1998), (Cherpillod et al., 2000), (Fischer et al., 2003), (Dahl et al., 2004).

1.10.2 Respuesta a la vacunación a nivel individual y poblacional

El resultado de una infección depende de las propiedades del virus y de la respuesta inmune del hospedador. Las vacunas a VVM inducen respuestas inmunes que son similares a la infección natural. El resultado de la vacunación, depende de las propiedades de la cepa vacunal, de la formulación de la vacuna y de varios otros factores tales como el estado inmunitario general del animal y su capacidad para generar anticuerpos. Tanto la inmunidad humoral como la celular, son importantes en la protección contra VDC (Appel, 1969), (Krakowka et al., 1975), (Appel et al., 1984b).

1.10.2.1 Nivel individual

La inmunidad humoral puede ser demostrada midiendo el título de anticuerpos neutralizantes contra el VDC en el suero. Estos anticuerpos, son contra las glicoproteínas H y F. La presencia y el título de anticuerpos neutralizantes correlaciona con el nivel de protección contra VDC (Norrby et al., 1986).

Los anticuerpos neutralizantes, se pueden detectar en el suero a los 6-10 días post vacunación, su título tiene un pico entre los 14-21 días post vacunación y persisten por varios años (Olson et al., 1997), (Coyne et al., 2001).

La vacunación con vacunas a VVMs también produce anticuerpos contra otros antígenos virales, pero el rol de esta inmunidad protectora no es demasiado importante.

Existen varios métodos para medir la inmunidad celular contra VDC (Appel et al., 1984b), (Krakowka and Wallace, 1979), (Shek et al., 1980), sin embargo estas metodologías están relegadas por la corta duración de las respuestas inmunes (Appel et al., 1982).

La inmunidad específica mediada por células puede ser demostrada desde el día 6 hasta el día 18 post vacunación. Esta, alcanza sus niveles máximos entre los 7 y 10 días post vacunación (Krakowka and Wallace, 1979), (Shek et al., 1980).

1.10.2.2 Inmunidad poblacional

A nivel poblacional, la respuesta a la vacunación, puede ser descrita como la proporción de la población vacunada que desarrolló inmunidad suficiente contra la infección.

La inmunidad poblacional (“herd immunity”, HI), definida como la proporción de sujetos con inmunidad en una población dada, (John and Samuel, 2000) es el resultado de la inmunidad inducida tanto por la vacunación como por la infección natural.

La parte de la inmunidad poblacional inducida por la vacunación, depende de la cobertura vacunal, de la duración de la inmunidad inducida y la expectativa de vida de los individuos vacunados.

Cuanto más alta sea la inmunidad poblacional más se disminuirá la circulación viral y menos probable será que un individuo susceptible se infecte y perpetúe la infección (De Jong and Bouma, 2001).

1.10.2.3 Cobertura vacunal y brotes de DC

A pesar de la vacunación, los brotes de DC continúan ocurriendo entre individuos y poblaciones vacunadas (Blixenkron-Moller et al., 1993), (Mori et al., 1994).

En Finlandia, el DC reapareció en perros en 1990 después de 16 años de ausencia. En 1994 -1995, ocurrió un brote en un área con alta densidad de animales que involucraba animales vacunados. El número estimado de casos fue aproximadamente 5000 (Ek-Kommonen et al., 1997).

Durante 1991, en la población urbana canina del área de Copenhagen (Dinamarca) se observó un aumento de casos de VDC. El brote tuvo las características de la introducción de un Morbillivirus en una población parcialmente inmune en donde la enfermedad se manifestó principalmente en los individuos jóvenes.

La cobertura vacunal antes del brote se estimaba en un 50% y el 65% de los casos confirmados de DC eran de perros menores de 2 años de edad. De 50 casos, 17 no estaban vacunados, 18 sí habían sido vacunados y 15 no tenían registros confiables de vacunación (Blixenkrone-Moller et al., 1993).

Durante el invierno de 1994-1995, se registraron reportes de VDC en algunas ciudades del norte y del este de Alemania. Se realizaron aislamientos en Hamburgo y Berlín, entre los cuales hubo casos de animales que aún estando vacunados, presentaban sintomatología clínica de acuerdo a la anamnesis (Haas et al., 1997).

Jozwik reportó en Polonia en el año 2002, que el 72% de los casos de DC ocurrieron entre perros de menos de 12 meses de edad y el 22% de los casos en perros vacunados (Jozwik and Frymus, 2002).

1.10.2.4 Fallas vacunales ó de la vacunación

Las razones generales de las fallas de la vacunación están presentadas esquemáticamente en la Figura 10.

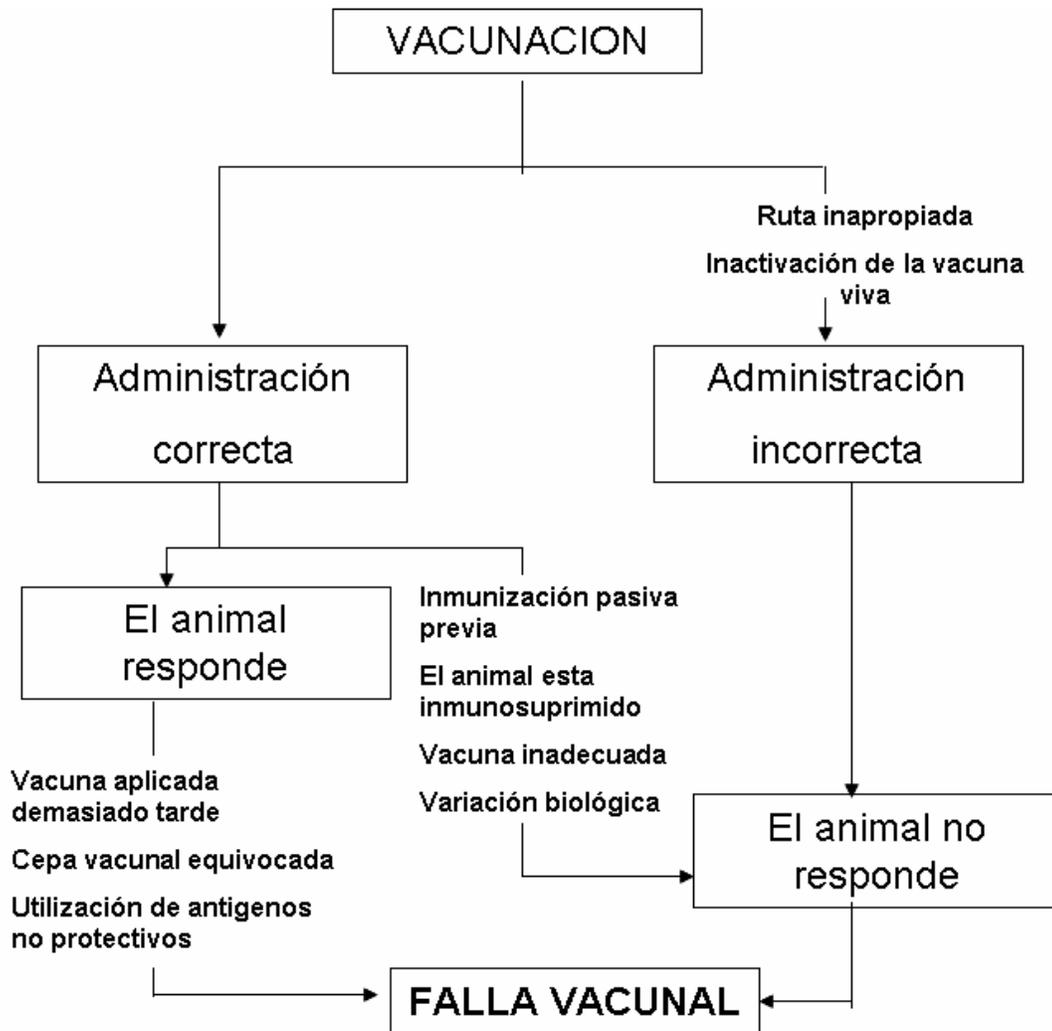


Figura 10 - Razones generales de falla vacunal (Povey, 1986), (Roth, 1999).

La viabilidad de las vacunas VVM es esencial para una vacunación exitosa.

Las cepas vacunales producidas en cultivos celulares y liofilizadas son estables durante 16 meses si están refrigeradas (0 y 4 °C), 7 semanas a 20 °C y 7 días cuando han sido expuestas a la luz solar a 47 °C. Por eso, es importante mantener la cadena de frío de las vacunas.

Después de la reconstitución, el virus de la vacuna es estable por 3 días a 4 °C, y por 24 horas a 20 °C. Sin embargo, una vez que la vacuna ha sido reconstituida, debe ser aplicada en el término de una hora. Una mala manipulación, almacenamiento y/o conservación de las vacunas, puede llevar a una falla en la vacunación.

Resultados de estudios de campo de vacunaciones contra VDC sugieren que un mínimo nivel de anticuerpos maternos que persista al momento de la vacunación, puede perjudicar la capacidad de los cachorros de responder tanto a la primera como a las vacunaciones subsecuentes (Blixenkroner-Moller et al., 1993).

Algunas vacunas contra VDC han mostrado atravesar la inmunidad materna en condiciones experimentales cuando la vacunación básica se comienza a las 6 semanas y se completa a las 10 semanas (Bergman et al., 2006).

La interferencia con los anticuerpos maternos se considera una de las razones más importantes por las cuales las vacunas fallan en perros.

La endogamia intensiva, y los síndromes de inmunodeficiencia hereditarios ó adquiridos (parasitosis) son probablemente más comunes en perros que lo que se cree y esto también contribuye en alguna medida a la falla vacunal (Povey, 1986).

Infecciones concurrentes al momento de la vacunación, como el Parvovirus Canino (PVC) ó las parasitosis pueden estimular la producción de interferón que bloquea la replicación del virus vacunal ó puede ser inmunosupresor.

Las condiciones estresantes (hacinamiento, transporte) pueden también de alguna manera, inhibir la respuesta inmune a la vacunación.

Una temperatura y humedad altas, pueden aumentar la temperatura corporal más allá de la normal, y tener efectos adversos en la respuesta inmune de los cachorros después de la vacunación (Webster, 1975).

Algunas reacciones indeseables como dolor e inflamación pueden ser observadas en el punto de inoculación, tras la vacunación contra VDC.

Las reacciones de hipersensibilidad tipo I son poco frecuentes y se producen dentro de la primera hora de aplicada la vacuna. Pueden provocar debilidad, disnea, vómitos, palidez de mucosas, y a veces, hasta colapso y muerte.

También, como la aplicación de la vacuna a VVM puede considerarse como una infección ligera, puede ocasionar hipertermia, hipoactividad ó irritabilidad.

2.1. Vacunas comerciales y muestras clínicas

Para el análisis de las cepas presentes en las vacunas comerciales, disponibles en la Argentina, se reconstituyeron en condiciones de esterilidad, 5 vacunas contra el VDC. Se analizaron las siguientes vacunas: Duramune ® CDV-Adenovirus tipo 2 de Fort Dodge (Vac 1); la vacuna cuádruple del laboratorio Paul: Moquillo-Hepatitis-Tos de las Perreras-Parainfluenza caninos (Vac 2), la vacuna Bivirovax ® de Merial: Moquillo-Hepatitis-infecciosa-Tos de las Perreras (Vac 3), y Cultivac ® MHPI del laboratorio Rosebusch (Vac 4), todas ellas a virus vivo modificado. También se analizó la vacuna recombinante contra el VDC de Merial (“Recombitek”®), formulada con una suspensión liofilizada del virus de viruela del canario (Canarypox) expresando las glicoproteínas H y F de VDC junto con otros virus vivos atenuados (Adenovirus tipo 2, Parainfluenza, Parvovirus y Coronavirus) y con *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae* inactivadas.

Además, en nuestro laboratorio, se cuenta con la cepa vacunal atenuada Onderstepoort, replicada en células Vero.

Se obtuvieron entre los años 2003 y 2008, 123 muestras clínicas que consistieron en sangre coagulada y/o tratadas con anticoagulante, provenientes de perros domésticos sospechados de infección con VDC. Todas las muestras provinieron de animales de la Ciudad de Buenos Aires y alrededores, a excepción de 2 muestras que se obtuvieron en las provincias de Tucumán y Santa Fe.

Para poder realizar este trabajo con mayor precisión, se solicitó a los veterinarios responsables (que eran las personas que tomaban las muestras y los intermediarios entre los pacientes y nuestro laboratorio); que remitieran junto con la muestra, una breve historia clínica del animal. Para ello, se diseñó una planilla para ser completada con la información requerida, tal como: lugar de procedencia, sexo, edad, sintomatología presentada, historial de vacunaciones, marcas de las vacunas, tratamientos recibidos, etc. Ver Apéndice “Ficha Clínica”.

Con la información general y específica, de gran valor epidemiológico, se creó una base de datos. Salvo pocas excepciones, no se procesaron muestras carentes de la información solicitada.

2.2. Técnicas de Biología Molecular aplicadas a cepas vacunales y muestras clínicas

2.2.1. Extracción del ARN de VDC

Para la detección de VDC, se extrajo el ARN a partir de las vacunas, muestras de sangre ó cultivos celulares, con un agente caotrópico como el Trizol® (Trizol Reagent, Invitrogen).

La extracción de ARN se realizó según la técnica descrita por el fabricante, basada en el tratamiento con fenol e isotiocianato de guanidinio.

Brevemente, aproximadamente 100 µl de cada muestra se mezclaron con 1000 µl de Trizol®, se homogeneizó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Este paso permite la disociación de complejos nucleoproteicos.

Luego se agregaron 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para que se inicie la separación de las fases y luego se centrifugó 15 minutos a 12000 revoluciones por minuto (rpm), a 4 °C. De aquí, se formaron 3 fases, una inferior (orgánica), una interfase con ADN y una fase acuosa superior que contiene el ARN. La fase acuosa superior se pasó a un tubo nuevo y el ARN se precipitó agregando 0.6 volúmenes de isopropanol y centrifugando durante 30 minutos a 10000 rpm en frío.

Los pellets de ARN, se lavaron con etanol al 75%, se secaron y se resuspendieron en 50 µl de agua estéril libre de RNAsas. Se incubaron a 55 °C durante 10-15 minutos para inactivar posibles RNAsas y los ARNs se conservaron a -70 °C hasta su utilización.

2.2.2. Detección de VDC por RT-PCR

2.2.2.1. Amplificación de un fragmento de 287 pb del gen de la NP

Se amplificó mediante la técnica de RT-PCR un fragmento de 287 pares de bases (pb) perteneciente a una región altamente conservada entre los Morbillivirus, (región intermedia) del gen de la NP (Frisk et al., 1999). En la Figura 11, se muestra el grado de conservación de la secuencia (moderado, alto, bajo), en el gen de la NP y el fragmento amplificado.

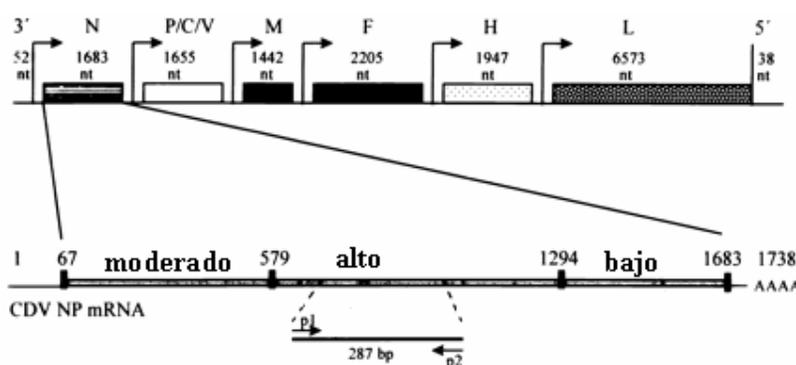


Figura 11 - Genoma de VDC con la región amplificada de la NP para el diagnóstico de VDC (Frisk et al., 1999).

Inicialmente, se probaron diferentes kits comerciales para la reacción de RT-PCR. Por un lado, el “Access RT-PCR system” de Promega (2 pasos) y por otro, el “Ready-to-go RT-PCR Beads kit” de Amersham (1 paso) y el “QIAGEN One-Step RT-PCR kit” (1 paso). Los mejores resultados se obtuvieron, con el kit “QIAGEN One-Step RT-PCR”, por lo que se continuó trabajando con el mismo (De Paula et al., 2004).

Se realizaron pruebas que permitieron determinar las condiciones óptimas de reacción, tales como la concentración de oligonucleótidos iniciadores (primers) en la mezcla de reacción, concentración de dNTPs, optimización de la duración de los ciclos de amplificación y la temperatura de unión de los primers al templado.

Las condiciones seleccionadas, fueron las siguientes: en un volumen de reacción de 30 μ l, se agregan 2 μ l del ARN a una mezcla conteniendo: 25 pmoles de cada primer NP1 5’ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT 3’ (f)

NP2 5’CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC 3’ (r), descritos previamente por (Frisk et al., 1999), 10 unidades de inhibidor de RNasas RNasin (Promega), 6 μ l de buffer 5X, 400 μ M final de cada dNTP, y 0.2 μ l de la mezcla de enzimas (“OneStep RT-PCR Enzyme Mix” que contiene Omniscript™ Reverse Transcriptase, Sensiscript™ Reverse Transcriptase, y HotStarTaq® DNA Polymerase).

El ciclado se definió de la siguiente manera: un paso de retrotranscripción de 45 minutos a 45°C y un segundo paso de activación de la polimerasa e inactivación de la retrotranscriptasa de 15 minutos a 95 °C. El proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 35 veces con el siguiente esquema: 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 60 °C y 1 minuto a 72 °C. La extensión final fue de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de RT-PCR, se someten a electroforesis en geles de agarosa 1.2%, se tiñen con Bromuro de Etidio, y se visualizan con luz UV.

2.2.2.1.1. Límite de sensibilidad para la detección del fragmento de 287 pb del gen de la NP

Se determinó el límite de sensibilidad de la técnica utilizada. Brevemente, se incubaron diluciones virales de título conocido, con sangre proveniente de un animal previamente diagnosticado por RT-PCR, como negativo. Luego se extrajo y se amplificó el ARN y se determinó la dilución en la cual dejaba de visualizarse la señal de amplificación. Este experimento, se realizó 2 veces.

2.2.2.2. Amplificación de un fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina

A fin de analizar la hemaglutinina viral, se seleccionó un fragmento de 871 pb de la región 5' del gen de la H (posición 7991 a 8861 de la secuencia del genoma de la cepa vacunal Onderstepoort y posición 912-1783 del gen de la H) (Figura 12) cuya variabilidad en las cepas de campo, había sido estudiada en Japón (Hashimoto et al., 2001).

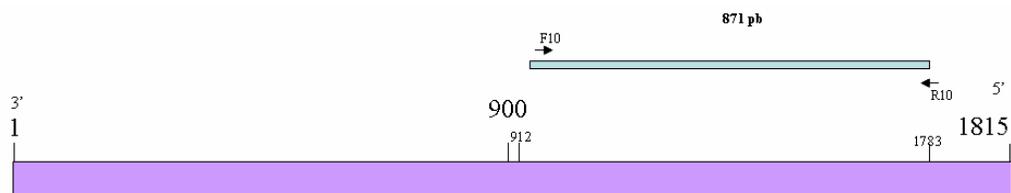


Figura 12 - Esquema del gen de la Hemaglutinina. El dibujo muestra la región de 871 pb amplificada y analizada.

Luego de la puesta a punto de la reacción de RT-PCR para amplificar este fragmento de la H, se procedió a amplificar este fragmento en las muestras en las que previamente se había amplificado el fragmento de 287 pb del gen de la NP, es decir en aquellas

muestras en donde había sido detectado el material genético del virus y por lo tanto se consideraban como positivas para VDC.

Las condiciones utilizadas para amplificar el fragmento de 871 pb fueron las siguientes: se utilizó el kit Qiagen OneStep RT-PCR kit, y un volumen de reacción de 50 µl. Se agregaron 2 µl del ARN extraído de las muestras de sangre coagulada, a una mezcla de reacción conteniendo: 25 pmoles de cada primer

F10B 5' TAT CAT GAC RGY ART GGT TC 3' (f)

R10 5' AAT YYT CRA YAC TGG WTG TG 3' (r) descriptos previamente por (Hashimoto et al., 2001), 20 unidades de inhibidor de RNAsas RNasin® (Promega), 10 µl de buffer 5X, 400 µM final de cada dNTP, y 0,4 µl de la mezcla de enzimas.

El ciclado se realizó de la siguiente manera: un paso de retrotranscripción de 45 minutos a 45°C y un segundo paso de activación de la polimerasa e inactivación de la retrotranscriptasa de 15 minutos a 95°C. El proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 35 veces con 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C. La extensión final fue de 5 minutos a 72 °C.

2.2.2.2.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H de VDC

Con el fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina, se realizaron estudios de RFLP con la endonucleasa *NdeI* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) utilizando geles de poliacrilamida 12%. Diez ó 20 µl del ADN purificado, se digirieron con la enzima (10 U) a 37 °C durante 2 horas.

La digestión con esta enzima permite la diferenciación de las cepas de campo respecto de las cepas vacunales que carecen del sitio de reconocimiento (Hashimoto et al., 2001).

2.2.2.3. Amplificación de un fragmento de 347 pb del gen de la H

Dado que solamente 24 de las 82 (30%) muestras que habían presentado amplificación positiva por RT-PCR para la NP, presentaron amplificación positiva para el fragmento de 871 pb del gen de la H, se decidió amplificar otra región (más pequeña) del mismo gen. Asimismo, para descartar que la falta de amplificación del fragmento de 871 pb sea

debido a algún problema técnico, se trabajó también con otro kit comercial (de 2 pasos, Access RT-PCR System de Promega), con idénticos resultados.

La región definida para amplificar en este caso, corresponde a un fragmento de 347 pb desde el nucleótido 206 hasta el 553 del gen de la H (Figura 13).

Los primers utilizados fueron los diseñados por (Iwatsuki et al., 1997).

CDVH15 5' ATT TAG CAG ATT GCT GAA A 3' (f)

CDVHd8 5' GRG GGA ATA TGT CAC RRC TG 3' (r)

La amplificación, se realizó de la siguiente manera: retrotranscripción de 45 minutos a 45 °C y un paso de activación de la polimerasa e inactivación de la retrotranscriptasa de 15 minutos a 95 °C. El proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 35 veces con 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

En este caso, se intentaron amplificar los ARNs provenientes de 3 cepas locales, una de las cuales había sido positiva para el fragmento de 871 pb (M 40, "Kalua") y otras dos (M 74, "Marcos," y M 7, "Marga") en las que no había podido amplificarse el fragmento de 871 pb.

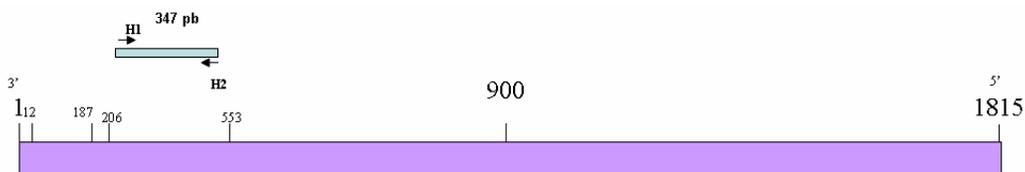


Figura 13 - Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC, región de 347 pb analizada.

2.2.2.4. Amplificación de un fragmento de 174 pb del gen de la H

Adicionalmente, se amplificó otro fragmento de 174 pb del gen de la Hemaglutinina, del nucleótido 13 al 187 (Figura 14). Para ello, se utilizaron los siguientes primers diseñados por (Mochizuki et al., 1999)

H13 (f) 5' CAA GAC AAG GTG GGT GCC TT 3'

H18 (r) 5' CTT GGT GAA ATC GAA CTC CA 3'

Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: retrotranscripción de 45 minutos a 45 °C, activación de la polimerasa e inactivación de la retrotranscriptasa 15 minutos a 95 °C. El proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 35 veces con 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 55 °C y 1 minuto a 72 °C.

Los productos de RT-PCR, fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 1.2% y se visualizaron con luz UV, luego de ser teñidos con bromuro de etidio.

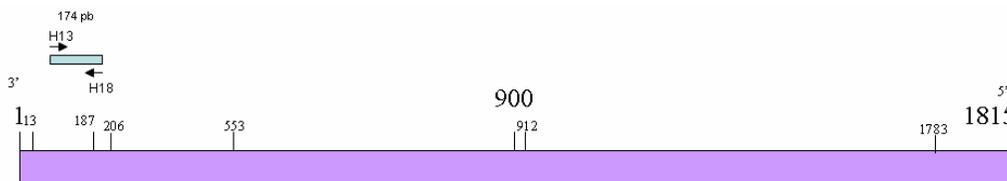


Figura 14 - Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC, región de 174 pb analizada.

Este fragmento de 174 pb fue analizado en las mismas 3 cepas locales. En dos de ellas, el fragmento de 871 pb no se había podido amplificar (M74 “Marcos” y M7 “Marga”) y en la otra (M40 “Kalua”), sí.

2.2.2.5. Amplificación del gen completo de la H

Para la amplificación del gen completo de la Hemaglutinina de VDC, se utilizaron los primers RH-3 y RH-4 (Mochizuki et al., 1999) modificados en 2 y 1 nucleótidos respectivamente (Lednicky et al., 2004), (Lan et al., 2005). Las secuencias de los primers utilizados son las siguientes:

RH-3/CDVHforb 5' AGG GCT CAGG TAS TCC ARC 3' (f)

RH4/HS2 5' AAT GCT RGA GAT GGT TTA ATT 3' (r)

Se probaron diferentes ARNs extraídos directamente de sangre coagulada, analizados previamente y con amplificación positiva de la NP. Se probaron diferentes concentraciones de MgCl₂ como así también gradientes de temperatura de hibridización de los primers al templado y varios ciclos de amplificación.

Las condiciones con las cuales se obtuvieron resultados favorables, fueron las siguientes: un paso de retrotranscripción de 45 minutos a 45 °C y un segundo paso de activación de la polimerasa e inactivación de la retrotranscriptasa de 15 minutos a 95 °C.

El proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 35 veces con 1 minuto a 94 °C, 2 minutos a 55 °C y 2 minutos a 72 °C. Finalmente, se realizó una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

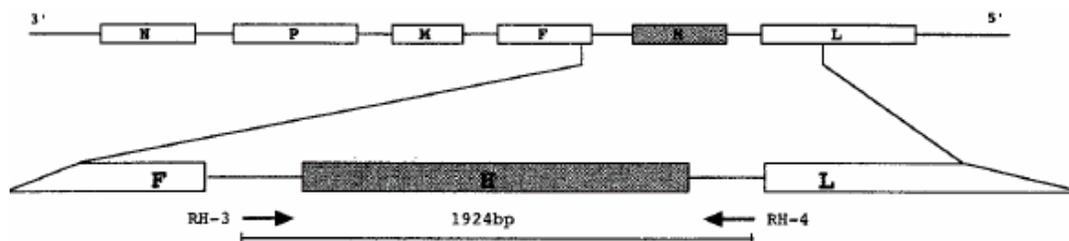


Figura 15 - Esquema del gen de la Hemaglutinina de VDC (Mochizuki et al., 1999).

El primer RH-3/CDVHforb se une un nucleótido río arriba del comienzo del gen de la Hemaglutinina (en la región no codificante entre los genes F y H) y el primer RH-4/HS2 se une entre los genes H y L (Figura 15). Estos primers, también fueron utilizados por Martella et al. en Italia (Martella et al., 2006).

2.2.3. Purificación del ADN amplificado

Los productos de PCR obtenidos, fueron purificados a partir de geles de agarosa 1 %, con un sistema de extracción del gel en el cual el ADN se une a la sílica en presencia de altas concentraciones de sal (QiaexII, Qiagen®).

El ADN se escinde del gel con un escalpelo limpio, se funde la agarosa en presencia de la sílica y un buffer de extracción y se procede según indicaciones del fabricante del kit.

2.2.4. Clonado en pGEM® -T Easy Vector de los fragmentos amplificados por RT-PCR

Los fragmentos de ADN obtenidos por la técnica de RT-PCR, purificados a partir de los geles de agarosa, fueron clonados en pGEM® -T Easy Vector. Para ello se incubaron los fragmentos con el vector (en una relación 1:3) y con 0.4 U de la enzima ADN ligasa

del bacteriófago T4 (Promega) durante toda la noche a 4 °C. Con el vector conteniendo el inserto ligado, se transformaron bacterias competentes de la cepa de *E.Coli* DH5 α amplicilina sensibles (método del shock térmico) (Sambrook, 1989). Una vez recuperadas de la transformación por incubación a 37 °C durante una hora y media en medio LB líquido sin antibióticos, las bacterias fueron plaqueadas en placas con LB-agar/ampicilina (0,05 mg/ml)/X-gal/IPTG (para inducir el operón Lac presente en el vector). Después de permitir el crecimiento toda la noche a 37 °C, se seleccionaron las colonias blancas (que poseen el inserto), y se las amplificó en 3 ml de medio LB con ampicilina (ya que las bacterias, por haber incorporado el pGEM® -T Easy Vector adquieren resistencia a ampicilina) durante toda la noche en agitación a 200 rpm. Se cosecharon las bacterias mediante centrifugación (13.000 rpm, 1 minuto), y se preparó ADN plasmídico para luego ser digerido con endonucleasas de restricción para confirmar la presencia del inserto.

2.2.5. Preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina

El ADN plasmídico se obtuvo siempre mediante el mismo procedimiento. Luego de la resuspensión del pellet bacteriano (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH: 8, 10 mM EDTA pH8), se lisan las bacterias en una solución recién preparada de NaOH 0,2N, SDS 1%. Se mezcla suavemente por inversión y se deja en hielo 5 minutos. Se agrega la solución de neutralización con acetato de potasio 3M, pH 5 y se incuba 15 minutos en hielo.

Tras centrifugar a 10.000 rpm, 30 minutos a 4°C, se recupera el sobrenadante, se lo trata con RNasaA (10 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C, se lo extrae 2 veces con cloroformo y luego se precipita el ADN con 0.6 volúmenes de isopropanol. Se deja 15 minutos en frío y luego de centrifugar 30 minutos a 13.000 rpm, el pellet se lava con etanol al 70%. Una vez seco, el pellet se resuspende en 8 μ l de cloruro de sodio 5M y 32 μ l de agua. Luego, se agregan 40 μ l de PEG (polietilenglicol) al 13%, se incuba 30 minutos en hielo y se centrifuga a 13.000 rpm durante una hora. El pellet de ADN, se lava con etanol al 70%, y luego se resuspende en 30 μ l de agua libre de DNAsas.

2.2.6. Secuenciación de los fragmentos amplificados por RT-PCR

El ADN plasmídico, fue secuenciado en todos los casos por el método de “single extensión” en ambas direcciones 5´ y 3´ por Macrogen Inc (Corea) con los primers T7 y SP6 que flanquean los extremos de los insertos. De cada fragmento clonado, se secuenciaron por lo menos, 2 clones diferentes.

Para la secuenciación se requieren 10~15 µl de una concentración del ADN plasmídico de 100 ng/µl como mínimo.

Este método de secuenciación del ADN está limitado a 500-700 pb, es por ello que para el caso en que las 2 lecturas (Sp6 y T7) no alcanzaron a tener el largo completo del inserto (gen completo de la hemaglutinina), se diseñaron primers internos:

1217HCDVf 5´ TGG GCG GCT GAC ATT AC 3´

1754HCDVr 5´ CTG GTT GTA GAG TTG GTG 3´

Estos primers permitieron la amplificación de un fragmento de 1211 pb, que abarca 96 nucleótidos del gen de la proteína de Fusión, la región intergénica y 960 nucleótidos del gen de la Hemaglutinina. El fragmento fue clonado y secuenciado, y la secuencia obtenida fue superpuesta con las secuencias obtenidas con los primers T7 y SP6.

2.2.7. Análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas

Los cromatogramas obtenidos, se analizaron y editaron. Las secuencias finales, se alinearon con el programa ClustalW. Las secuencias se analizaron utilizando el programa Genedoc (Multiple Sequence Alignment Editor Version 2.6.002) y el paquete MegAlign (Lasergene v6, DNASTAR Inc., Madison, WI).

Con las secuencias obtenidas, se construyeron árboles filogenéticos con el método de Neighbor-joining con el programa Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 3.1 (Kumar et al., 2004).

La confiabilidad de los árboles filogenéticos obtenidos, se estimó con un bootstrap de 1000 réplicas.

2.2.8. Secuencias de VDC obtenidas y analizadas

2.2.8.1. Fragmento de 287 pb del gen de la Nucleoproteína

Los números de acceso del Genbank de las secuencias alineadas de la NP son los siguientes: Cepa vacunal Onderstepoort (AF305419), EEUU (AY443350), EEUU II (AY386315), India (DQ003302), Brasil (DQ005134), Bra2, Brasil (DQ005132), GERHan95, Alemania (CAA08767), China (AY390348), México (ABI50232), A7517 (AAD49699), ChinaSar Sarampión (DQ211902), CoreaSar Sarampión (AF417265), Edmonston cepa vacunal de Sarampión (AAF85691).

Los números de acceso de las secuencias obtenidas para el fragmento de 287 pb del gen de la NP, de las cepas Argentinas son:

M38 “RC” (FJ009224), M85 “Pitu” (FJ009226), M40 “Kalua” (FJ009227), M70 “Iron” (FJ009228), M68 “Facu” (FJ009225), M90 “Pao” (FJ009229).

2.2.8.2. Fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina

Los números de acceso de las secuencias obtenidas en esta tesis para el fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina de las cepas locales son:

Arg 1 (AM422846), Arg 2 (AM422847), Arg 3 (AM422848), Arg 4 (AM422849), Arg 5 (AM422850), Arg 6 (AM422851), Arg 7 (AM422852), Arg 8 (AM422853), Arg 9 (AM422854), Arg 10 (AM422855), Arg 11 (AM422856), Arg 12 (AM422857), Arg 13 (AM422858), Arg 14 (AM422859), Arg 15 (AM422860), Arg 16 (AM422861), Arg 17 (AM422862), Arg 18 (AM422863), Arg 19 (AM422864), Arg 20 (AM422865), Arg 21 (AM422866), Arg 22 (AM422867), Arg 23 (AM422868), y Arg 24 (AM422869).

Por otro lado, también se obtuvieron del Genbank las siguientes secuencias de la H: 111/03B, Italia (ABF55673); 324/03, Italia (DQ494317); DK91, Dinamarca (AAQ05835); 404, Alemania (CAB01251); “4513”, Alemania (CAB01253); Han90 5804, Alemania (AAQ96300); Hamamatsu, Japón (BAA19585); Ueno, Japón (BAA19584); KDK-1, Japón (BAA84209); 98-002, Japón (BAA84208); 5VD, Japón (AAQ63642); 5B, Japón (AAQ63641); Yanaka, Japón (BAA19586); Ac961, Japón (AB212963); 007Lm, Japón (AB212730); Tanu96, Japón (BAA33740); CD Taichung, Taiwán (AAQ84330); TN, China (AAQ96371); Turquía (AAM11476); A7517, EEUU

(AAD49703); Javelina, EEUU (CAA87693); American dog, EEUU (CAA87691); A92-6 Black panther, EEUU, (CAA90879); Greenlandic dog, Groenlandia (CAA87689).

Las cepas vacunales son: Snyder Hill (AAG15490), Convac (CAA84626), y Onderstepoort (AAC26995).

Las secuencias de la H del virus de Sarampión alineadas con VDC fueron:

Cepa Sarampión vacunal Edmonston (AB046218), cepa Francesa Sarampión (DQ267505), cepa Marroquí Casablanca (DQ267500), cepa EEUU USA/17.98 (DQ227321) y la cepa Japonesa Yamagata (AB186910).

2.2.8.3. Fragmento de 347 pb del gen de la Hemaglutinina

Los números de acceso de las secuencias obtenidas para el fragmento de 347 pb del gen de la hemaglutinina de las cepas Argentinas son: M40 “Kalua” (FJ009231) y M7 “Marga” (FJ009230).

2.2.8.4. Fragmento de 174 pb del gen de la Hemaglutinina

Los números de acceso de las secuencias obtenidas para el fragmento de 174 pb del gen de la hemaglutinina de las cepas Argentinas son: M40 “Kalua” (FJ011001), M7 “Marga” (FJ011002) y M74 “Marcos” (FJ011003).

2.2.8.5. Gen completo de la Hemaglutinina

Los números de acceso de las secuencias obtenidas de las cepas Argentinas para el gen completo de la Hemaglutinina son: M107 “Bruno” (FJ011005) y M90 “Pao” (FJ011004).

2.3. Células

2.3.1. Purificación de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de animales infectados con VDC.

En algunos pocos casos, además de la sangre coagulada de animales sospechados de infección por VDC, se obtuvo la sangre anticoagulada. La sangre heparinizada de animales previamente diagnosticados por RT-PCR como positivos, fue centrifugada en un gradiente de Histopaque (SIGMA) obteniéndose los PBMC. Brevemente, la sangre se diluyó 1:1 en PBS, y la mezcla se depositó sobre 3 ml de Histopaque en tubos de 15 ml. Luego de una centrifugación a 2000 rpm en frío durante 30 minutos, se tomó con una pipeta Pasteur la capa de PBMC que quedó en la interfase. Las células obtenidas se lavaron con PBS y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para luego ser utilizadas para infectar las líneas celulares B95a y VeroSLAM.

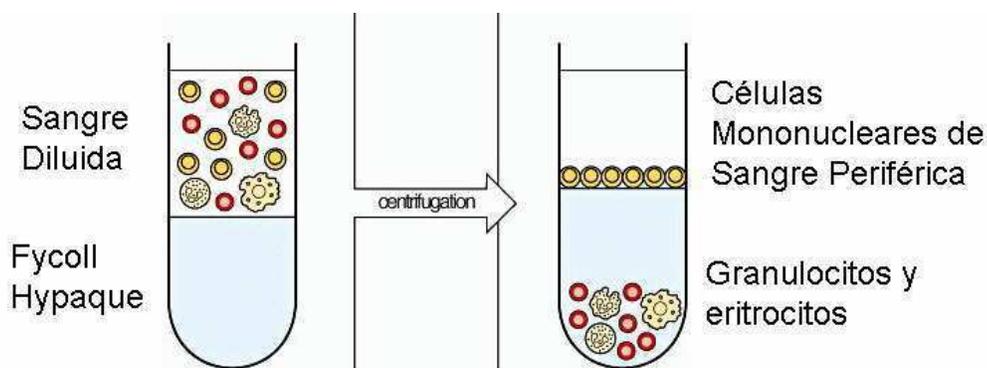


Figura 16 - Metodología de obtención de células mononucleares de sangre periférica.

2.3.2. Cultivo de células B95a

La línea celular linfoblastoide B de mono Titi (B95a) transformada con el virus Epstein Barr es utilizada para el aislamiento primario del virus del Sarampión; un virus que al igual que VDC, pertenece al Género Morbillivirus. Estas células son hasta 10000 veces más sensibles para el aislamiento del virus del sarampión a partir de especímenes clínicos, que otras líneas celulares comúnmente usadas como Vero y PMK (OrganizaciónPanamericanaSalud, 2001). También, se ha demostrado que esta línea

celular B95a es una herramienta importante para el aislamiento de VDC (Kai et al., 1993), (Seki et al., 2003).

Las células B95-8 se obtienen de la American Type Culture Collection (ATCC# CRL 1612). Cuando se cultivan en el medio Minimum Essential (MEM) modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino (SFB), estas células se adhieren a la superficie del recipiente de cultivo y las células adherentes se denominan B95a.

Las células B95a fueron gentilmente cedidas a nuestro laboratorio por la Dra Mónica Tous (Jefa del Servicio Cultivo de Tejidos INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán").

Las células fueron cultivadas, inicialmente en paralelo con el medio de cultivo cedido por el Instituto Malbrán (MEM suplementado con aminoácidos no esenciales y 10% de SFB) y el medio preparado en nuestro laboratorio (DMEM con aminoácidos no esenciales, glutamina (8 mM) y 10 % de SFB). Las células fueron mantenidas en una estufa de CO₂ a 37°C en botellas de cultivo de 25 y 75 cm² (Nunc® ó Greiner®).

2.3.2.1. Infección de células B95a

Se realizaron ensayos de co-cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de animales infectados con VDC y células B95a.

La infección inicial de las células B95a, se realizó con los PBMC provenientes de 2 animales, en medio MEM suplementado con 2% de SFB, glutamina (8 mM), aminoácidos no esenciales (10 ml/l de composición [L-Alanina HCl (0,890 g/l), L-Asparagina monohidrato (1,5 g/l), L-Aspártico (1,33g/l), Acido glutámico (1,474 g/l), Glicina (0,750 g/l), L-prolina (1,15 g/l), L-Serina (1,05 g/l)]), 25 mM de Hepes, 4,5 g/l de bicarbonato de sodio y 6x10⁵ U/l de Penicilina, 150 U/l Estreptomina.

Luego de 3 pasajes del virus en cultivo de células B95a, se extrajo el ARN tanto del sobrenadante de cultivo como del pellet celular, y se analizó por RT-PCR la presencia del fragmento de 287 pb de la NP de VDC no obteniéndose bandas de amplificación en ninguno de los casos.

En otra oportunidad, se infectaron células B95a pasaje 20 en botellas de cultivo de 25 cm², con los PBMC provenientes de 3 animales diferentes. Brevemente, se lavaron las células con PBS y se incubaron con 500 µl de los PBMC y 500 µl de PBS, durante una

hora. Luego se completó con medio Iscove's modified Dulbecco's Medium (Gibco) 2% SFB.

A las 48 horas post-infección se descartó una de las infecciones por contaminación.

Las células infectadas se repicaron 1:2 y 5 días después se volvieron a repicar 1:2 (tercer pasaje). Se congeló la infección y luego de una centrifugación, se separó el sobrenadante del pellet celular. La presencia de VDC a través de los pasajes en cultivo, se determinó, luego de la extracción de ARN con Trizol, por RT-PCR.

2.3.3. Cultivo de células Vero

La línea celular Vero (riñón de mono verde africano) fue cultivada en medio MEM (Gibco, EE.UU.), con glutamina (8 mM), aminoácidos no esenciales (10 ml/l de composición [L-Alanina HCl (0,890 g/l), L-Asparagina monohidrato (1,5 g/l), L-Aspártico (1,33g/l), Acido glutámico (1,474 g/l), Glicina (0,750 g/l), L-prolina (1,15 g/l), L-Serina (1,05 g/l)]), 25 mM de Hepes, 4,5 g/l de bicarbonato de sodio y 6×10^5 U/l de Penicilina, 150 U/l Estreptomicina, suplementado al 10% con SFB.

2.3.3.1. Infección de células Vero

La infección de las células Vero, se realizó con el medio de cultivo, medio MEM suplementado con 2% de SFB.

2.3.3.2. Titulación de VDC en células Vero por dilución terminal

En placas de poliestireno de 96 pocillos (Tissue culture plate, 96 W, flat bottom, Greiner bio-one CELLSTAR), se agregaron 150 μ l de medio de dilución (MEM con Hepes y bicarbonato de sodio) en toda la placa. Se agregaron 50 μ l del virus en la columna 1 por duplicado ó cuadruplicado.

Con una pipeta multicanal, se tomaron 50 μ l y se pasaron a la columna 2; se mezcló, se tomaron 50 μ l de la mezcla y se pasaron a la columna 3, y así sucesivamente hasta la columna 10. Las columnas 11 y 12 se dejaron sin infectar (controles negativos). Luego de las diluciones del virus, se agregaron 50 μ l de las células por well en toda la placa

(un T25 cm² tripsinizado en el momento, con las células resuspendidas en 6 ml de MEM 20% SFB).

Las placas se incubaron durante 4-5 días a 37 °C en estufa de CO₂, observando la aparición de efecto citopático.

Una vez descartado el sobrenadante de las monocapas, las mismas fueron teñidas con solución de cristal violeta (1% de cristal violeta, 5% formol y 10% etanol en agua destilada) y se calculó el título (Dosis infectivas tejido celular 50%-DITC₅₀-/ml) mediante el método de Reed y Muench (Reed, 1938).

2.3.4. Cultivo de Células VeroSLAM

Mientras que las cepas adaptadas a cultivo, tales como la cepa vacunal atenuada Onderstepoort, son capaces de replicar en varias líneas celulares (Seki et al., 2003), las cepas salvajes de VDC, no se propagan en ellas.

Las células VeroSLAM fueron gentilmente cedidas por el Dr Yusuke Yanagi (Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University) de Japón, para el presente trabajo de tesis.

Las mismas, provienen de células Vero transfectadas por el grupo del Dr Yanagi con un plásmido de expresión codificando la glicoproteína de membrana SLAM (signaling lymphocyte activation molecule, CD150) que es el receptor celular de los virus sarampión y DC.

Estas células, son mucho más eficientes que las células Vero y las células B95a para el aislamiento de cepas salvajes de VDC (Seki et al., 2003). En el trabajo citado, se muestra que para algunos casos, las cepas salvajes Japonesas, pudieron ser aisladas en células VeroSLAM en 24 Hs. Comparativamente, en células B95a, las mismas cepas salvajes tardaban entre 7 y 10 días y el aislamiento era menos eficiente. Por otro lado, estas cepas salvajes no crecían en células Vero (Tabla 1).

Perro Numero	Edad (meses)	Aislamiento viral		
		Vero.DogSLAMtag	B95a	Vero
1	2	24 h	—	—
2	3	24 h	—	—
3	2	—	—	—
4	3	24 h	7 días	—
5	2	24 h	10 días	—
6	3	—	—	—
7	3	24 h	7 días	—

Tabla 3 - Aislamiento de cepas de VDC Japonesas en diferentes líneas celulares (Vero.DogSLAMtag, B95a, y Vero). Adaptado de (Seki et al., 2003).

Las células VeroSLAM, fueron inicialmente crecidas en botellas de cultivo de 25 cm² de poliestireno (Nunc® ó Greiner®) en un medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco Medium (Gibco) con 10% SFB. Los antibióticos utilizados, fueron Penicilina sodium Salt y Estreptomicina sulfate Salt (Sigma®).

La presión de selección del plásmido que expresa el SLAM, se mantuvo por adición de G418 Geneticina (0.4 mg/ml) final cada 3 pasajes de las células.

Se implementó un banco maestro y un banco de trabajo de estas células.

Los stocks de todas las líneas celulares se mantuvieron en Nitrógeno líquido (-196°C). El procedimiento general seguido para el congelamiento de todas las líneas celulares, fue: disgregar la monocapa celular de manera enzimática con tripsina, centrifugar a 1000 rpm durante 10 minutos y resuspender las células en el medio de congelamiento (90% de SFB, 10% DMSO (dimetilsulfóxido)). Luego se fraccionó a razón de 1 ml de la resuspensión celular en criotubos (Nalgene®) y se colocaron en un recipiente que permitiera el congelamiento lento a -70°C. A las 48 hs posteriores al congelamiento se trasladaron a un tanque de Nitrógeno líquido.

El proceso de descongelamiento celular se realiza en un baño termostático a 37°C de manera rápida. Las células descongeladas se resuspenden en medio de crecimiento en el recipiente para cultivo y se incuban durante 2 horas 37°C para que las células se adhieran a la superficie. Pasado ese tiempo se descarta el sobrenadante y las células se incuban en medio completo de crecimiento.

2.3.4.1. Infección de cultivos de células VeroSLAM con cepas salvajes Argentinas de VDC

Se infectaron botellas de cultivo de 25 cm² conteniendo células VeroSLAM pasaje 11 en un 70% de confluencia, con 500 µl de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) provenientes de “Bruno” (M 107), un perro previamente vacunado, con sintomatología clínica de DC y confirmado como positivo para VDC por RT-PCR. Las PBMC de este animal, habían sido utilizadas para la infección de células B95a con resultados positivos.

También, se realizó el mismo procedimiento con las PBMC obtenidas de otros animales. Luego de varios intentos, a las 48 horas post infección, se observó efecto citopático, con la formación de sincicios multinucleados en las células infectadas con la cepa “Bruno” (M 107). En el caso de las otras infecciones, no se observó efecto citopático y fueron descartadas.

2.3.4.2. Detección de VDC en células VeroSLAM por el test de Inmunoperoxidasa

Este test, permite visualizar la presencia y localización del antígeno viral en células en cultivo infectadas, luego de la adición de un anticuerpo contra el virus y de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Brevemente, se infectaron monocapas de células VeroSLAM en placas de poliestireno de 24 pocillos con 0,1 ml del stock viral de VDC en medio sin suero y se incubó a 37°C durante 1 hora. Se agregó 1 ml de medio de infección suplementado con 2% de SFB y se incubó a 37°C durante 48 horas.

Se descartó el sobrenadante de la monocapa celular, se lavó con PBS y se fijó con una mezcla de partes iguales de acetona y metanol durante 20 minutos a -20°C, se descartó la solución fijadora, se lavó con PBS, se dejó secar a temperatura ambiente y se conservó a 4°C.

Las células infectadas se enfrentaron con una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal anti NP de VDC (DV2-12, Custom Monoclonal, Inc., West Sacramento, CA).

Luego de sucesivos lavados, las células se enfrentaron con un anticuerpo secundario anti ratón conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) en una dilución 1:2000.

Como sustrato se utilizaron 100 µl por pocillo de ácido diamino benzoico (DAB) en PBS (1 mg/ml) con agregado de 10 µl de H₂O₂ 30% por ml. Se incubó en oscuridad durante 10 minutos y a continuación las monocapas se lavaron con H₂O destilada y se observaron los focos de infección en el microscopio.

2.3.4.3. Detección de proteínas de VDC por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE) y electrotransferencia (Western blot)

Con el mismo anticuerpo monoclonal utilizado para el ensayo de IPA se realizaron ensayos de western blot en los lisados celulares de células VeroSLAM, infectados tanto con la cepa salvaje, como con la cepa vacunal.

Los protocolos generales se obtuvieron de (Sambrook, 1989).

SDS-PAGE: Las proteínas se separaron en mini geles de poliacrilamida 12%, durante 2 horas a 100 Volts constantes, en buffer tris-glicina con SDS 1% (Tris-HCl 50 mM pH: 7,7, glicina 196 mM, SDS 1%). Una vez finalizada la corrida, el gel se retira y se tiñe ó se transfiere a nitrocelulosa.

Electrotransferencia: luego de la corrida, el gel se colocó dentro de un “sándwich” entre 3 hojas de papel Whatmann, una membrana de nitrocelulosa correctamente orientada y esponjas tipo Scotch Brite. Esto se ensambló en un contenedor plástico y se colocó dentro de la cuba de electrotransferencia (BioRad) que luego se completó con buffer (Tris-HCl 50 mM pH7, glicina 196 mM, metanol 20%). Las proteínas fueron transferidas a la membrana de nitrocelulosa durante la noche a 20 Volts constantes.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% en PBS, e incubadas en presencia del anticuerpo primario (anti NP de VDC (DV2-12, Custom Monoclonal, Inc., West Sacramento, CA).

Luego de los lavados, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario (anti-ratón Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc) en una dilución 1:2000, seguido de revelado por quimioluminiscencia (ECL-Amersham) ó bien con DAB.

2.4. Medidas de bioseguridad

Toda manipulación de virus vivo fue realizada bajo normas de bioseguridad en un laboratorio de nivel P2 en flujo laminar de alta seguridad (Bio Gard Hood, The Baker Company B-60-112) y con utilización de equipo de protección personal.

3.1. Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC

3.1.1. En vacunas comerciales de Argentina

Con el objeto de evaluar la efectividad y ajustar los parámetros de ejecución de la técnica de RT-PCR para la detección de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC, se analizaron 4 vacunas comerciales disponibles en la Argentina. En la Figura 17, se muestra el resultado de la amplificación de las 4 cepas vacunales.

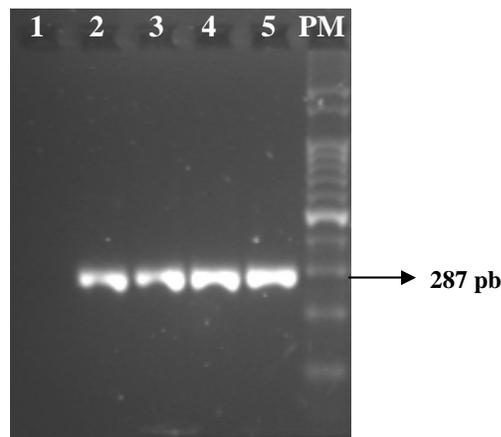


Figura 17 - Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC en vacunas comerciales de la República Argentina. Calle 1: control negativo, calles 2-5: vacunas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

Como se observa en la Figura 17, en todas las vacunas comerciales analizadas, se detectó el fragmento específico de VDC comprobándose asimismo la efectividad de la técnica para poder detectar secuencias del genoma viral de VDC.

3.1.2 En muestras de sangre de perros de Argentina

Con el fin de definir el material de partida (tipo de muestra) para el diagnóstico molecular de VDC, con las primeras muestras recibidas, se comparó la intensidad de la señal obtenida a partir de las muestras de sangre coagulada, respecto de la señal obtenida a partir de sangre con anticoagulante (EDTA-Heparina), ó suero del mismo animal.

Los resultados obtenidos (no mostrados) indicaron que las muestras de sangre coagulada otorgaban una señal de amplificación más intensa respecto de las muestras de sangre con anticoagulante ó del suero. De esta manera, se definió a la sangre coagulada como un material de partida adecuado para el diagnóstico molecular de VDC. Esta muestra, es fácil de obtener, poco cruenta y es compatible con las reglas de bienestar animal.

3.2. Análisis de las muestras

Se recibieron y analizaron un total de 123 muestras, 81 de las cuales (66 %) provinieron de animales vacunados, 29 (24%) provinieron de animales sin vacunar y 13 (10%) provinieron de animales cuyo estado de vacunación se desconocía.

El ARN de VDC se detectó en 82 de las 123 muestras de sangre analizadas (67%), mientras que en 41 de las muestras analizadas (33%), no se detectó ARN de VDC.

Para el caso de las muestras en las cuales no se detectó VDC (negativas), se extrajo el ARN, una segunda vez y se repitió la reacción. Como la finalidad del presente trabajo de tesis no era definir la etiología de la enfermedad presentada por los animales, las muestras consideradas como negativas no fueron posteriormente estudiadas.

La Figura 18 muestra los resultados de la amplificación del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC, en 5 muestras representativas, de un total de 82 fragmentos obtenidos.

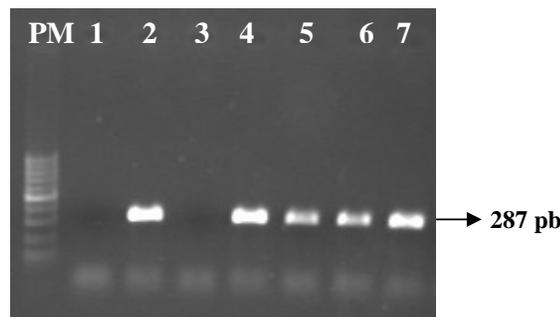


Figura 18 – Detección por RT-PCR de un fragmento de 287 pb del gen de la NP del VDC en 5 muestras de sangre coagulada proveniente de perros de la República Argentina. PM: marcador de peso molecular, calle 1: control negativo, calle 2: control positivo (vacuna comercial), calle 3: muestra “Lila” (no se detectó VDC), calles 4 - 7: muestras “Facu”, “Pitu”, “RC” y “Kalua” en las cuales se detectó la presencia de VDC.

3.3. Límite de sensibilidad para la detección por RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC

El límite de sensibilidad de la técnica, se determinó siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (2.2.2.1.1.). De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 19, la técnica permite detectar hasta aproximadamente 35 partículas virales (PV).

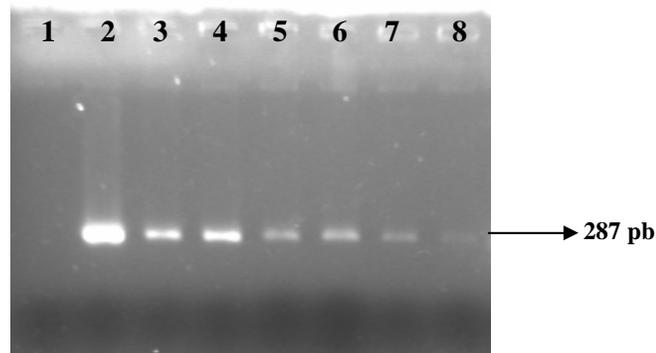


Figura 19 - Límite de sensibilidad de la técnica de RT-PCR para la detección de un fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC. Calle 1: control negativo, calle 2: 3.5×10^5 PV, calle 3: 3.5×10^4 PV, calle 4: 3.5×10^3 PV, calle 5: 350 PV, calle 6: 175 PV, calle 7: 70 PV, calle 8: 35 PV.

3.4. Análisis de secuencias del fragmento de 287 pb de la NP de VDC de 6 muestras clínicas y una vacuna comercial

Con el objeto de estudiar el grado de conservación de los fragmentos de 287 pb del gen la NP amplificados para el diagnóstico de VDC, se seleccionaron al azar 6 de los 82 fragmentos obtenidos y se secuenciaron. Por otro lado, se secuenció el mismo fragmento obtenido de la amplificación de una vacuna comercial (Fort Dodge) y las secuencias fueron alineadas (Figura 20).

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *
Ond   : RIAEDLSLRRFMVALILDIKRSPGNKPRIAEIMICDIDNYIVEAGLASFILTIKFGIETMYPALGLHEFSGELTTIESLMMLYQQMGETAPYMVIL : 95
Vacuna1 : ..... : 95
M85Ar10Pit : ..... : 95
M40Ar4Kalu : ..... : 95
M70Ar2Iron : ..... : 95
M68Ar6Facu : ..... : 95
M38Ar3RC : ..... : 95
M90Ar23Pao : ..... : 95
USA : ..... : 95
USAI : ..... : 95
India : ..... : 95
Brasil : ..... : 95
Bra2 : ..... : 95
Ger : ..... : 95
China : ..... : 95
Mexico : ..... : 95
A7517EEUU : ..... : 95
ChinaSar : .....T.....T.....A...S.L...N..... : 95
CoreaSar : .....T.....T.....A...S.L...N..... : 95
Edmonston : .....T.....T.....A...S.L...N..... : 95

```

Figura 20 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 287 pb del gen de la NP. La secuencia Onderstepoort (Ond), es la cepa vacunal de referencia. “Vacuna 1”, es una vacuna comercial contra VDC. Las cepas “Pituca”, “Kalua”, “Iron”, “Facu”, “RC”, y “Pao”, son cepas salvajes de VDC Argentinas. En el alineamiento, también se incluyeron cepas de VDC de USA (USA I, USA II, A7517), India, Brasil (Brasil y Bra2), Alemania (Ger), China y México; y cepas de Sarampión de China (ChinaSar), Corea (CoreaSar) como así también una cepa vacunal de Sarampión (Edmonston).

Las secuencias de aminoácidos deducidas a partir del fragmento de 287 pb, se alinearon entre sí y se obtuvo un 100% de identidad, para todas las cepas de VDC. Es decir, todas las secuencias de VDC, tanto vacunales como salvajes y tanto de Argentina, como de otras regiones del mundo, son idénticas a nivel aminoacídico en esta región del genoma. (Figura 4). Esto muestra el alto grado de conservación en la región central del gen de la NP y su alto valor para ser utilizado con fines diagnósticos.

Al compararse las secuencias de VDC con las del virus de Sarampión (Morbillivirus) en esta región del genoma, se obtuvo sólo un 93% de identidad en todas las cepas de VDC con respecto a las cepas salvajes ó a la cepa vacunal de Sarampión.

3.5. Detección por RT-PCR del gen de la Hemaglutinina de VDC

3.5.1. Amplificación de un fragmento de 871 pb en muestras de sangre de animales infectados y en vacunas comerciales

Para evaluar una eventual variabilidad genética en las cepas de VDC identificadas en la Argentina, se procedió a analizar otra región del genoma en aquellas muestras en las que se había detectado la presencia del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC.

El gen de la proteína H es el más variable entre los aislamientos de VDC quizás, debido al rol que juega esta proteína en la reacción inmune del huésped. Esta proteína, es también el principal determinante de tropismo y citopatogenicidad (von Messling et al., 2001) convirtiendo al gen en una herramienta importante para los análisis filogenéticos (Mochizuki et al., 1999), (Bolt et al., 1997), (Haas et al., 1997), (Hashimoto et al., 2001).

Sólo en 24 de las 82 muestras NP positivas, (29%) se logró amplificar este fragmento. El fragmento, se detectó en las 4 vacunas atenuadas analizadas (Vac 1-4) y en la vacuna “Recombitek”.

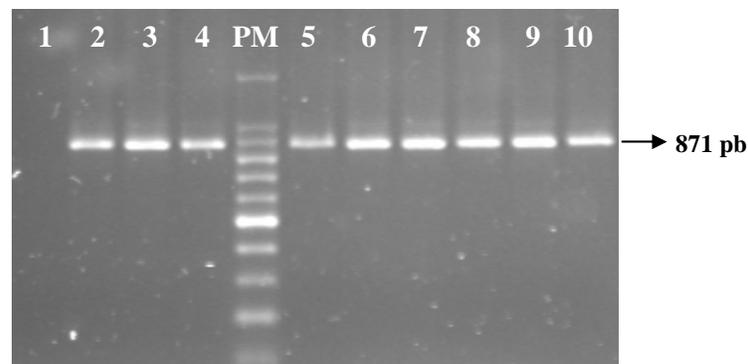


Figura 21 - Detección por RT-PCR de un fragmento de 871 pb del gen de la H de VDC en 8 casos de la República Argentina. Calle 1: control negativo, calle 2: vacuna comercial (Vac 1), calles 3-4: Arg 18 (“Mara”), Arg 8 (“Moro”), PM: marcador de peso molecular, calles 5-11: Arg 24 (“Bruno”), Arg 1 (“Mac”), Arg 20 (“MC”), Arg 15 (“Magui”), Arg 12 (“Labra”), Arg 11 (“Jack”).

En la Figura 21, se observa la amplificación por RT-PCR del fragmento de 871 pb del gen de la H de una vacuna comercial (calle 2) y de 8 muestras representativas de la República Argentina (Arg 18, 8, 24, 1, 20, 15, 12, 11).

3.5.1. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H

La región de 871 pb del gen de la hemaglutinina, permite luego de su digestión con la enzima de restricción *NdeI*, la diferenciación entre las cepas presentes en las vacunas (vacunales) y las cepas salvajes.

La digestión con la enzima *NdeI* de los 24 fragmentos obtenidos, dio como resultado la obtención de 2 productos de restricción. Este patrón, es similar al observado para el genotipo 98-002, presente en Japón.

Las 24 cepas Argentinas analizadas por RT-PCR y RFLP, presentaron un sólo sitio de reconocimiento para la enzima *NdeI* en la posición nt.1572, obteniéndose un fragmento de 661 y otro de 210 pb, indicando la presencia de cepas salvajes (no vacunales) en las muestras de animales.

En ninguno de los casos, los fragmentos obtenidos a partir de las vacunas comerciales a virus vivo modificado (Vac 1 - 4) y “Recombitek”, fueron digeridos con la enzima de restricción *NdeI*, otorgando de esta manera, un marcador molecular para la diferenciación entre cepas vacunales y cepas salvajes.

En la Figura 22, se observa el análisis de restricción con la enzima *NdeI* de 6 cepas representativas del total de 24 fragmentos obtenidos y de una vacuna comercial.

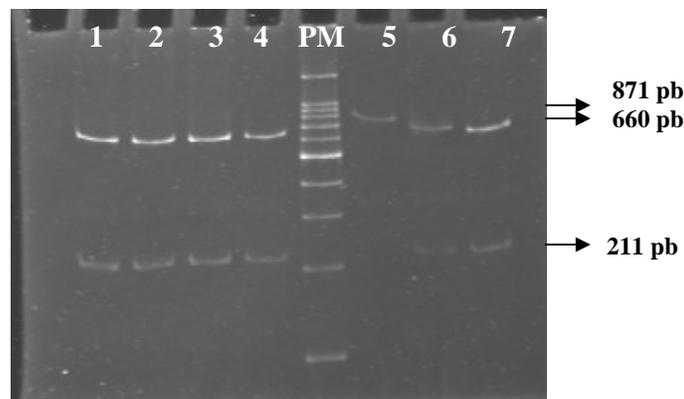


Figura 22 - Análisis de restricción del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de VDC derivado de cepas Argentinas salvajes y del virus presente en una vacuna comercial. Se muestra el patrón de restricción con la enzima de *NdeI* de 6 cepas salvajes Argentinas (calles 1- 4 y 6 -7), y de una vacuna comercial, (calle 5). Todas las cepas locales mostraron 2 fragmentos de 211 y 660 pb después de la digestión con la enzima *NdeI* mientras que la cepa vacunal permanece sin digerirse. PM: marcador de peso molecular.

3.5.2. Amplificación de un fragmento de 347 pb del gen de la hemaglutinina en muestras de sangre de animales infectados y en una vacuna comercial

Dado que en el 71% casos en los que se amplificó la NP había sido positiva, no se pudo amplificar el fragmento de 871 pb de la H, se decidió intentar amplificar un fragmento

más pequeño, localizado en otra región del mismo gen. Este fragmento, al ser más pequeño, provee más oportunidades de ser amplificado en ARNs eventualmente degradados.

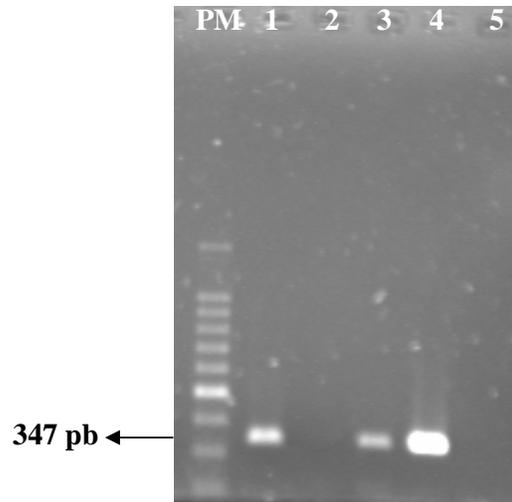


Figura 23 - RT-PCR de un fragmento de 347 pb del gen de la H de VDC en 3 muestras clínicas. PM: marcador de peso molecular, calle 1: Arg 4 -“Kalua”, calle 2: (M 74, “Marcos”), calle 3: (M 7, “Marga”), calle 4: control positivo (vacuna comercial “Recombitek”), calle 5: control negativo.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 23. Para el caso de la muestra 74 “Marcos” (calle 2), positiva para el fragmento de 287 pb de la NP, no fue posible amplificar la región más pequeña de 347 pb ni el fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina.

Sin embargo, para la muestra 7 “Marga” (NP positiva, pero negativa para la amplificación del fragmento de 871 pb) se obtuvo exitosamente la amplificación de la región de 347 pb (calle 3).

En el caso de la muestra 40 Arg4-“Kalua”, se obtuvo tanto la amplificación del fragmento de 871 pb como la del fragmento de 347 pb (calle 1).

La amplificación del fragmento de 347 pb en el ADN obtenido a partir de la vacuna “Recombitek” (calle 4), fue positiva.

3.5.3. Amplificación de un fragmento de 174 pb del gen de la hemaglutinina en cepas locales de VDC

Otra región del gen de la hemaglutinina que fue amplificada, es la comprendida entre los nucleótidos 13 al 187 (Ver Figura 14). Este fragmento de 174 pb fue analizado en las mismas 3 cepas locales (M40 “Kalua” Arg 4, M 74 “Marcos” y M 7 “Marga”) que el fragmento de 347 pb. En las 3 muestras, se obtuvo amplificación positiva para este fragmento (No mostrado).

3.5.4. Amplificación del gen completo de la Hemaglutinina en dos cepas locales de VDC

Con el objetivo de estudiar la variabilidad genética en todo el gen de la hemaglutinina en cepas Argentinas, se amplificó, clonó y secuenció este gen completo en 2 cepas locales (M 90 “Paola” [Arg 23] y M 107 “Bruno” [Arg 24]).

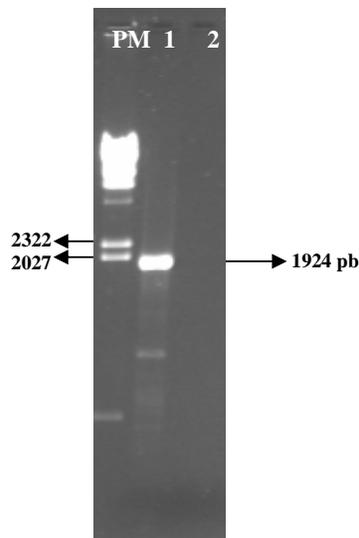


Figura 24 - Amplificación del gen completo de la Hemaglutinina, a partir de una muestra de sangre de un animal vacunado, con sintomatología clínica de VDC. PM: marcador de peso molecular, calle 1: M 107 (Arg24) “Bruno”, calle 2: control negativo.

En la Figura 24, se observa el resultado de la amplificación por RT-PCR del gen completo de la hemaglutinina de una cepa Argentina (M 107, Arg 24 “Bruno”).

3.6. Análisis de secuencias de VDC del gen de la Hemaglutinina

3.6.1. Análisis de las secuencias del fragmento de 871 pb

Con el objetivo de analizar las secuencias genómicas de las cepas de VDC presentes en la Argentina, se procedió al secuenciamiento de la región de 871 pb del gen de la hemaglutinina. Para ello, los productos de amplificación de 24 muestras, purificados a partir de los geles de agarosa, se clonaron y se secuenciaron como se describió en Materiales y Métodos. La información sanitaria de los animales en cuyas muestras de sangre se detectó, clonó y secuenció el fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina, están resumidos en la Tabla 4.

Muestra	Nombre	Cepa*	Edad (meses)	Sexo	Raza	Vac	Signos Clínicos			
							SR	Conj	TGI	SN
M50	Mac	Arg 1	3	M	PA	V	-	+	+	+
M70	Iron	Arg 2	6	M	R	V	-	+	-	+
M38	RC	Arg 3	ND	ND	BH	V	ND	ND	ND	ND
M40	Kalua	Arg 4	7	H	R	V	+	+	-	+
M8	Luna	Arg 5	6	H	W	V	+	+	+	+
M68	Facu	Arg 6	3	M	M	V	-	+	-	-
M39	Chocha	Arg 7	5	H	B	V	+	+	-	+
M9	Moro	Arg 8	84	M	PA	NV	+	+	+	+
M29	Aixa	Arg 9	10	H	LR	V	-	+	-	-
M85	Pituca	Arg 10	17	H	LR	V	-	+	-	+
M49	Jack	Arg 11	24	M	R	ND	ND	ND	ND	ND
M6	Labradora	Arg 12	11	H	LR	V	+	+	-	+
M36	Lau	Arg 13	ND	H	NI	V	-	+	-	-
M66	Lier	Arg 14	2	H	GR	V	+	+	+	-
M51	Magui	Arg 15	3	H	R	V	-	-	-	+
M25	Maica	Arg 16	96	H	NI	V	+	-	-	-
M95	Mancha	Arg 17	72	M	M	V	-	+	+	-
M62	Mara	Arg 18	4	H	R	V	-	+	-	-
M12	Marcos 12	Arg 19	60	M	M	NV	+	+	+	+
M55	MC	Arg 20	2	M	M	V	-	-	+	-
M2	Octavio	Arg 21	4	M	M	NV	+	+	-	-
M63	Hamlet	Arg 22	19	M	M	V	-	-	-	+
M90	Paola	Arg 23	15	H	W	V	-	+	-	+
M107	Bruno	Arg 24	3	M	M	V	-	+	-	-

Tabla 4 - Identificación de los animales en cuyas muestras se detectó y secuenció el fragmento de 871 pb del gen de la H de VDC. *Todas las cepas fueron obtenidas en el año 2003, excepto Arg 24 que se obtuvo en el año 2004.

Abreviaturas: H, Hembra; M, Macho; M, Mestizo; LR, Labrador Retriever; W, Weimaraner; PA, Pastor Alemán; BH, Basset Hound; B, Bobtail; R, Rottweiler; GR, Golden Retriever; V, vacunado; NV, no vacunado; ND, información no disponible; Conj, conjuntivitis; SN, síntomas neurológicos; TGI, síntomas del tracto gastrointestinal; SR, síntomas respiratorios.

De acuerdo con datos bibliográficos publicados, algunos autores, realizan el análisis de las secuencias del gen de la H, luego del pasaje de las cepas de VDC, por cultivos celulares (Iwatsuki et al., 1997).

Dado que no puede descartarse la posibilidad que algunos aminoácidos cambien durante el cultivo in vitro de las cepas virales, se amplificó directamente el ARN viral a partir de las muestras de sangre.

En la Tabla 5 se observan los porcentajes de identidad en la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina, entre todas las cepas locales secuenciadas.

Los resultados de secuenciación, mostraron que en la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de VDC, se observa un alto grado de identidad en las cepas locales entre sí (97-99%), a excepción de una de ellas (Pao, Arg 23), que presentó sólo un 95% de identidad con respecto a las otras cepas locales.

	Vac 1	Vac 2	Vac 3	Vac 4	Recomb	Arg 1	Arg 2	Arg 3	Arg 4	Arg 5	Arg 6	Arg 7	Arg 8	Arg 9	Arg 10	Arg 11	Arg 12	Arg 13	Arg 14	Arg 15	Arg 16	Arg 17	Arg 18	Arg 19	Arg 20	Arg 21	Arg 22	Arg 23	Arg 24			
SnyHill	92.8	95.5	96.9	99.3	98.6	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	
Comvac	93.4	91.7	92.1	91.7	90.7	91	90.7	90	90.3	90	90	90.3	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	
Ond	96.2	94.5	94.8	94.8	94.1	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	89.7	
SnyHill	97.2	97.6	96.9	96.9	96.9	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	89.3	
Convac	99.7	99	99	99	99	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6	88.6
Vac 1	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3
Vac 2	98.6	88.3	88.6	88.6	88.6	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3
Vac 3	87.6	87.9	88.6	88.3	87.6	88.3	87.6	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3	88.3
Vac 4	98.3	97.2	99.3	98.3	98.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Recomb	97.6	99	99	99	99	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
Arg 1	97.9	97.2	97.9	97.9	97.9	97.2	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9	97.9
Arg 2	99	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3	98.3
Arg 4	98.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 5	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 6	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 7	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 8	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 9	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 10	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 11	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 12	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 13	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 14	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 15	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 16	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 17	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 18	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 19	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 20	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 21	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 22	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
Arg 23	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6

Tabla 5 - Porcentaje de identidad aminoacídica calculado por el método ClustalW entre las secuencias deducidas del fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina (residuos 305-594), cepas de VDC Argentinas salvajes (Arg 1-24), vacunas comerciales (Vac 1 – 4 y “Recombitek”) y 3 cepas vacunales de referencia (Ond, Snyder Hill y Convac).

Además, las cepas locales se compararon a nivel aminoacídico con cepas presentes en vacunas comerciales disponibles en la Argentina y con las cepas vacunales de referencia.

En la Tabla 5, se muestran también, los porcentajes de identidad aminoacídica, de las cepas locales, con respecto a las cepas vacunales de referencia (Onderstepoort [Ond], Snyder Hill y Convac) y a las cepas presentes en las vacunas comerciales: a virus vivo modificado (Vac 1- 4) y “Recombitek”.

Todas las cepas salvajes de VDC de Argentina, presentaron alrededor de un 90% de identidad con respecto a las cepas vacunales.

Estos resultados, reflejan una situación semejante a la de otras regiones del mundo en donde se observa una distancia genética similar entre las cepas salvajes y las cepas vacunales (Haas et al., 1997).

En la Tabla 6, se muestran los porcentajes de identidad de las cepas locales con respecto a cepas aisladas en otros países y con respecto a la cepa vacunal de referencia Ond.

	11103It	Denmark	404 Ger	Han90Ger	98-002 JP	KdK1 JP	Turkey	Greenl	Amdog	Ond
Arg 1	95.2	95.2	95.5	95.9	92.1	93.8	94.8	94.8	94.5	88.3
Arg 2	96.2	96.2	96.6	96.9	92.1	94.8	95.9	94.8	95.5	89.3
Arg 3	95.2	95.2	95.5	95.9	90.7	93.8	94.5	94.1	94.1	88.6
Arg 4	95.9	95.9	96.2	96.6	92.4	94.5	95.5	95.2	95.2	89
Arg 5	95.2	95.2	95.5	95.9	91.4	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 6	95.2	95.2	95.9	95.9	91.7	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 7	95.2	95.2	95.5	95.9	91.7	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 8	95.2	95.2	95.5	95.9	91.7	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 9	95.2	95.2	95.5	95.9	92.4	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 10	95.2	95.2	95.5	95.9	91	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 11	95.2	95.2	95.9	95.9	91	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 12	96.6	96.6	96.9	97.2	92.4	95.2	96.2	95.9	95.9	89
Arg 13	94.8	94.8	95.2	95.5	91.4	93.4	94.5	94.1	94.1	87.2
Arg 14	95.2	95.2	95.5	95.9	91	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 15	95.2	95.2	95.5	95.9	91.7	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 16	94.8	94.8	95.2	95.5	90.7	93.8	94.5	94.1	94.1	87.9
Arg 17	95.2	95.2	95.5	95.9	91	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 18	95.5	95.5	95.9	96.2	91.4	94.1	95.2	94.8	94.8	89
Arg 19	94.8	94.8	95.5	95.5	91.4	93.8	94.5	93.4	94.1	88.3
Arg 20	95.2	95.2	95.5	95.9	91.7	93.8	94.8	94.5	94.5	88.3
Arg 21	95.2	95.2	95.5	95.9	91	93.8	94.8	94.5	94.8	88.3
Arg 22	95.9	95.9	96.2	96.6	92.4	94.5	95.5	95.2	95.2	88.3
Arg 23	96.2	96.2	96.6	96.9	92.1	94.8	95.5	94.8	94.5	88.6
Arg 24	95.5	95.5	95.9	96.2	91.4	94.1	95.2	94.8	94.8	89
	11103It	98.6	99	98.6	92.4	96.6	97.9	95.5	96.2	89
		Denmark	99	98.6	92.4	96.6	97.9	95.2	96.6	89
			404 Ger	99	92.8	96.9	98.3	95.5	96.6	89.3
				Han90Ger	93.1	97.2	97.9	95.9	96.9	89.7
					98-002 JP	93.1	92.4	93.8	92.4	86.6
						KdK1 JP	95.9	94.5	95.5	87.9
							Turkey	95.2	95.9	88.3
								Greenl	95.2	88.6
									Amdog	88.6

Tabla 6 - Porcentajes de identidad de las cepas locales (Arg 1-24), con respecto a cepas aisladas en otros países (Italia 111/03, Dinamarca, 404 Alemania, Han90 Alemania, 98-002 Japón, KDK-1 Japón, Turquía, Groenlandia, USA) y con respecto a la cepa vacunal de referencia Onderstepoort en el fragmento de 871 pb (290 aa) del gen de la Hemaglutinina.

Los porcentajes de identidad de las cepas Argentinas con respecto a la cepa de vacunal de referencia Onderstepoort, son similares a los porcentajes de identidad de las cepas internacionales con respecto a la misma cepa de referencia.

También se compararon las secuencias de cepas Argentinas de VDC con cepas del virus de sarampión obteniéndose un 35 - 37% de identidad en el mismo fragmento.

Las secuencias de las cepas Argentinas, alineadas con cepas salvajes de otros países y con cepas vacunales se muestran en la Figura 25.

En gris, se resaltaron potenciales sitios de glicosilación. Para las cepas salvajes, se observan sitios adicionales de glicosilación que no están presentes en la cepa vacunal Onderstepoort.

En el alineamiento, sólo se muestran las diferencias con respecto a la cepa Ond. Las diferencias aminoacídicas con respecto a la cepa vacunal, están distribuidas a lo largo de todo el fragmento sin haber una clara agrupación de mutaciones.

Se detectaron cuatro aminoácidos únicos en todas las cepas salvajes de VDC Argentinas: K (358), I (360) G (487) y D (530), con la excepción de la Arg 23 [I (358), T (360), S (487) y G (530)] y Arg 3 [I (358)]. La mayoría de los cambios con respecto a la cepa Ond, son comunes tanto a las cepas locales, como a las cepas salvajes de diferentes partes del mundo.

Ond	305	YHDSGSGDQJLVVTLGIFWATPMDHIEEVIPIVAHPSMKKIHITNHRGFIKDSIATWMPALASEKQEEQKGCLESACQRKTYPMCNQASWEFPFGGRQLPSYGRLT	410													
Convac	305	GT	E	P	T	G	410									
Vac1	305	G	E	T	G	410										
Vac3	305	G	E	T	G	410										
Arg1	305	G	OV	VE	R	I	V	R	N	T	G	410				
Arg2	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg3	305	G	OV	VE	G	R	I	V	N	G	T	G	410			
Arg4	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg5	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg6	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg7	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg8	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg9	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg10	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg11	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg12	305	GN	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Arg13	305	GN	V.G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Arg14	305	G.V	G	OV	A	VE	R	I	V	N	T	G	410			
Arg15	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg16	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg17	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	P	410				
Arg18	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg19	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg20	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg21	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg22	305	GN	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Arg23	305	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410					
Arg24	305	G	OV.V	VE	R	I	V	N	T	G	410					
111/03It	305	N	G	OV.G	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Denmark	305	N	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
404	305	N	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Han90	305	N	N	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410			
KDK-1	305	N	N	N	G	OV	VER	V	V	N	T	G	410			
98-002	305	N	N	S	G	NOV	VER	V	V	Q	G	N	S	T	V	410
5BJP	305	N	N	S	G	NOV	VER	V	V	Q	G	N	S	T	V	410
Yanaka	305	N	N	N	G	OV	VER	V	V	N	T	G	410			
Turkey	305	N	N	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410			
Green1	305	GN	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				
Am dog	305	N	G	OV	VE	R	I	V	N	T	G	410				

Ond	411	PLDASVDLQNLISFTYGPVILNGDGMDDYSEPLLNNGWLTIPPKDGTISGLINKAGRGDQFTVLPVHLVTFAPRESSGNCYLPQIOTSQRDRDLVIESNIIVLPTQ	516														
Convac	411	L	N	L	I	M	I	L	516								
Vac1	411	G	N	F	I	516											
Vac3	411	G	N	F	I	516											
Arg1	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg2	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg3	411	P	I	DF	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg4	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg5	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg6	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	L	516		
Arg7	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg8	411	P	I	G	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516		
Arg9	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg10	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg11	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	L	516		
Arg12	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg13	411	P	I	DF	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg14	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	P	M	K	A	L	516		
Arg15	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg16	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg17	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg18	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg19	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	L	516		
Arg20	411	P	I	D	N	AVL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg21	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg22	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
Arg23	411	P	I	V	G	SD	N	L	S	I	G	M	K	T	L	516	
Arg24	411	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	A	L	516			
111/03It	411	S	P	I	P	S	SD	N	VL	S	I	G	M	K	T	L	516
Denmark	411	S	P	I	G	S	SD	N	VL	S	I	G	M	K	T	L	516
404	411	S	P	I	S	SD	N	VL	S	I	G	M	K	T	L	T	516
Han90	411	S	P	I	SD	RN	VL	S	I	G	M	K	T	L	516		
KDK-1	411	S	P	I	SD	N	VL	S	I	G	M	K	T	L	516		
98-002	411	I	N	D	N	L	S	T	M	K	T	L	516				
5BJP	411	I	N	D	N	L	S	T	M	K	T	L	516				
Yanaka	411	L	P	I	D	V	N	VL	S	T	M	K	T	L	516		
Turkey	411	P	I	S	SD	N	VL	S	G	M	K	T	L	516			
Green1	411	I	R	D	L	S	I	S	M	K	T	L	516				
Am dog	411	H	P	I	D	N	VL	S	I	G	M	K	T	L	516		

Ond	517	SIRVIATYDISRSDHAIYVYVDP	IRTISYTHPRLTTKGRPDFLRICFVDDNLWCHQFYRFEADIANSTSVEN	594						
Convac	517	F	N	594						
Vac1	517	F	I	594						
Vac3	517	F	I	594						
Arg1	517	NF	D	F	Y	D	T	D	594	
Arg2	517	NF	D	Y	D	T	S	594		
Arg3	517	NF	D	Y	D	T	I	594		
Arg4	517	NF	D	Y	D	T	D	594		
Arg5	517	NF	D	Y	D	T	S	IT	594	
Arg6	517	NF	D	Y	D	T	I	D	594	
Arg7	517	NF	D	Y	D	G	T	I	D	594
Arg8	517	NF	D	Y	D	S	T	I	D	594
Arg9	517	NFG	D	Y	D	S	T	I	D	594
Arg10	517	NF	D	Y	D	T	S	I	594	
Arg11	517	NF	D	Y	D	K	T	I	594	
Arg12	517	NF	D	Y	D	T	594			
Arg13	517	NF	D	Y	D	TD	I	D	594	
Arg14	517	NF	D	Y	D	T	594			
Arg15	517	NF	D	Y	D	Q	T	I	D	594
Arg16	517	NF	D	Y	D	KN	G	T	I	594
Arg17	517	NF	D	Y	D	T	I	594		
Arg18	517	NF	D	Y	D	G	T	594		
Arg19	517	NF	D	Y	D	T	I	D	594	
Arg20	517	NF	D	Q	Y	D	T	D	594	
Arg21	517	NF	D	Y	D	VT	S	K	594	
Arg22	517	NF	D	Y	D	T	I	D	594	
Arg23	517	NF	D	Y	D	S	Q	T	D	594
Arg24	517	NF	D	Y	D	H	T	594		
111/03It	517	NF	D	Y	D	T	594			
Denmark	517	NF	D	Y	D	T	594			
404	517	NF	D	Y	D	T	594			
Han90	517	NF	D	Y	D	T	594			
KDK-1	517	NF	D	Y	D	N	T	594		
98-002	517	NFG	V	EN	Y	D	S	T	D	594
5BJP	517	NF	V	KN	MY	D	S	T	D	594
Yanaka	517	NF	D	G	MY	D	N	T	594	
Turkey	517	NF	D	G	Y	I	T	594		
Green1	517	NF	D	N	Y	T	594			
Am dog	517	NF	D	G	Y	ST	594			

Figura 25 - Alineamiento de la secuencia aminoacídica deducida del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina. Las secuencias alineadas corresponden a las cepas vacunales [Onderstepoort, Convac, vacunas comercialmente disponibles en la Argentina (Vac1 y Vac3)], cepas Argentinas (Arg 1–24), una cepa de Italia (111/03B), una cepa de Dinamarca, cepas Alemanas (404 y Han90), cepas Japonesas (KDK-1, 98-002, 5B y Yanaka), una cepa de Turquía, una cepa de EEUU [Americandog (Am dog)] y una cepa de Groenlandia (Greenl). Los puntos representan aminoácidos iguales. Sólo se muestran las diferencias con respecto a la cepa vacunal Onderstepoort. Los aminoácidos que son únicos para las cepas Argentinas, están recuadrados. Los aminoácidos comunes a todas las cepas salvajes, están en negrita. Los sitios potenciales de N glicosilación (N-X-S/T) están marcados en gris.

En la Figura 26, se muestran las relaciones filogenéticas entre las cepas salvajes de VDC de Argentina, y las cepas vacunales; junto con cepas salvajes de otras regiones del mundo para el fragmento de 871 pb (290 aa) del gen de la hemaglutinina. Se observan además, los distintos genotipos de VDC presentes en las diferentes regiones del mundo.

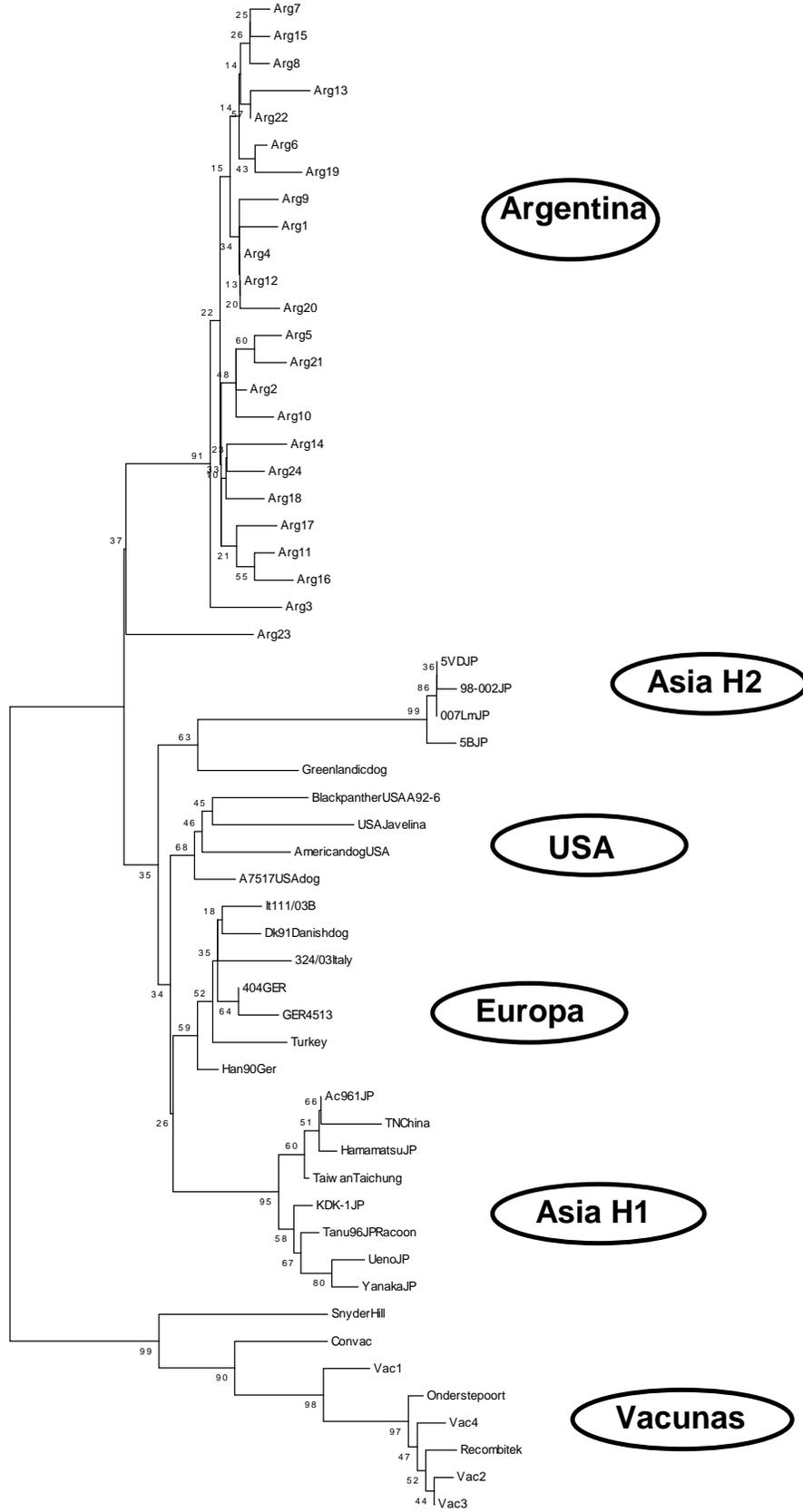


Figura 26: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas (290 aa) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H de VDC de cepas locales e internacionales. Arg 1–24: cepas Argentinas. Las longitudes de las ramas del árbol, indican las distancias filogenéticas calculadas a partir de las matrices de distancias.

Las cepas Argentinas se encuentran dentro de la rama de las cepas salvajes, alejadas genéticamente de las cepas vacunales.

3.6.2. Análisis de las secuencias del fragmento de 347 pb

Los fragmentos de 347 pb de la H obtenidos, fueron clonados y secuenciados para las 2 cepas locales: M 40 Arg 4 (“Kalua”), y M7 (“Marga”).

Las secuencias de aminoácidos deducidas fueron alineadas y los resultados obtenidos para este fragmento, reflejan los resultados obtenidos para el fragmento más grande de 871 pb (290 aa). Es decir, se observó un alto porcentaje de identidad entre las 2 cepas locales secuenciadas (99%) y un 91-92% de identidad con respecto a la cepa vacunal de referencia Onderstepoort.

Además, en esta región del genoma, las cepas internacionales muestran un porcentaje de identidad similar con respecto a la cepa Onderstepoort.

3.6.3. Análisis de las secuencias del fragmento de 174 pb

El análisis de las secuencias del fragmento de 174 pb (nucleótidos 13 al 187) amplificado en 3 cepas Argentinas, reveló un mayor grado de identidad a nivel aminoacídico, de las cepas locales con respecto a las cepas extranjeras, lo cual indica, un mayor grado de conservación en esta región del gen (Tabla 7).

Las cepas Argentinas cuyas secuencias se analizaron fueron: M74 (“Marcos”) y M7 (“Marga”) (en las cuales, el fragmento más grande de 871 pb no se había podido amplificar) y M40 Arg 4 (“Kalua”) en la cual había sido posible la amplificación del fragmento de 871 pb.

En la Tabla 7, se muestran los porcentajes de identidad para este fragmento, entre las cepas Argentinas, las cepas salvajes internacionales y la cepa vacunal Ond.

A7517USA	ChinaTN	Dandog	Greenl	Han90Ger	Ger404	It 11103	Kdk1JP	98-002 JP	MarcosM74	KaluaM40	MargaM7	Ond	
91.4	89.7	93.1	89.7	93.1	89.7	93.1	87.9	87.9	93.1	93.1	93.1	89.7	Turkey
	94.8	96.6	94.8	96.6	93.1	96.6	93.1	93.1	96.6	96.6	96.6	91.4	A7517USA
		94.8	96.6	94.8	93.1	94.8	98.3	94.8	94.8	94.8	94.8	93.1	ChinaTN
			94.8	100	96.6	100	93.1	93.1	100	100	100	91.4	Danishdog
				94.8	91.4	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.8	93.1	Greenl
					96.6	100	93.1	93.1	100	100	100	91.4	Han90Ger
						96.6	91.4	89.7	96.6	96.6	96.6	87.9	Ger404
							93.1	93.1	100	100	100	91.4	It 11103
								93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	Kdk1 JP
									93.1	93.1	93.1	91.4	98-002 JP
										100	100	91.4	MarcosM74
											100	91.4	KaluaM40
												91.4	MargaM7

Tabla 7 - Porcentajes de identidad de 3 cepas locales (“Marcos” M74, “Kalua” M40 y “Marga” M7) en el fragmento de 174 pb (58 aa), con respecto a las cepas aisladas en otros países (A7517 USA, China TN, Danish dog, Greenland, Han 90, Ger 404, It 111/03, KDK-1, 98-002) y con respecto a la cepa vacunal de referencia Onderstepoort.

3.6.4. Análisis de las secuencias del gen completo de la hemaglutinina

El alineamiento de las secuencias obtenidas, junto con las secuencias de los genes de la hemaglutinina de cepas de VDC de otras regiones del mundo, se muestra en la Figura 27.

Figura 27 - Alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas del gen completo de la hemaglutinina obtenidas de 2 cepas locales. Las secuencias alineadas corresponden a las cepas vacunales [Onderstepoort, Convac], cepas Argentinas (**Bruno M107, Paola M90**), una cepa de Italia (111/03B), una cepa de Dinamarca, cepas Alemanas (404 y Han90), una cepa Taiwanesa, cepas Japonesas (98-002, KDK-1), una cepa de Turquía, una cepa de EEUU [Americandog (Am dog)] y una cepa de Groenlandia (Greenl). Los puntos representan aminoácidos iguales. Sólo se muestran las diferencias con respecto a la cepa vacunal Onderstepoort. Los sitios potenciales de N glicosilación (N-X-S/T) están marcados en gris y las cisteínas conservadas están marcadas en verde.

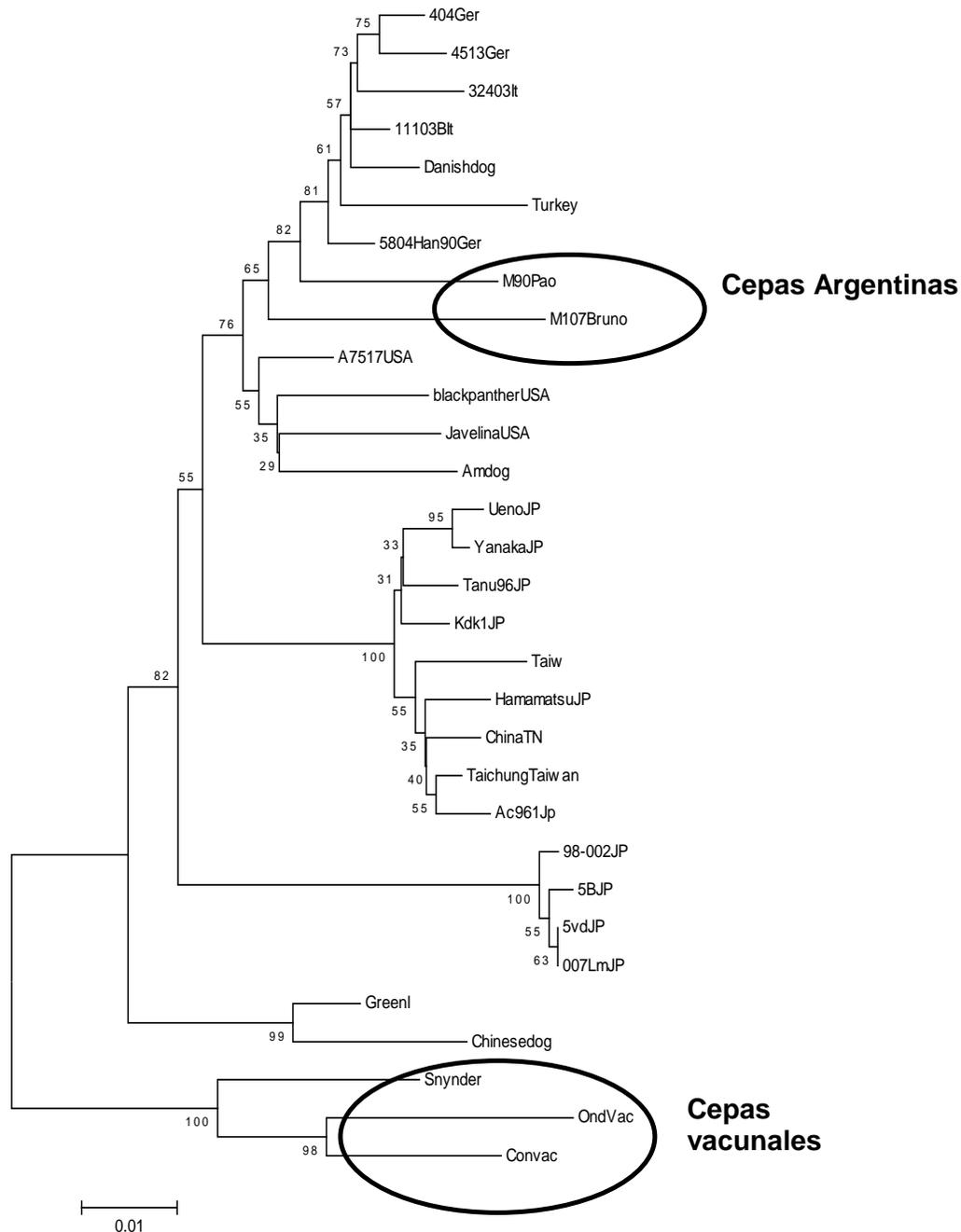


Figura 28 - Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas del gen completo de la H de VDC de cepas locales e internacionales.

Paola M 90 y Bruno M107: cepas Argentinas. Las longitudes de las ramas del árbol, indican las distancias filogenéticas calculadas a partir de las matrices de distancias.

En la Figura 28, se observan las relaciones filogenéticas entre las cepas aisladas en otros países, las cepas vacunales y las 2 cepas locales cuyo gen de la hemaglutinina se amplificó completo.

Los resultados obtenidos para el largo completo del gen de la hemaglutinina, confirman resultados previos obtenidos para el fragmento de 871 pb, es decir, las cepas vacunales, se encuentran alejadas genéticamente de las cepas salvajes tanto Argentinas, como Asiáticas y Europeas.

3.6.5. Localización de sitios potenciales de glicosilación en cepas locales de VDC

Como ocurre con las cepas estudiadas en Japón, las cepas salvajes de VDC presentes en Argentina, también mostraron sitios potenciales de glicosilación adicionales en el gen de la hemaglutinina, que no están presentes en la cepa vacunal Onderstepoort (Figura 29).

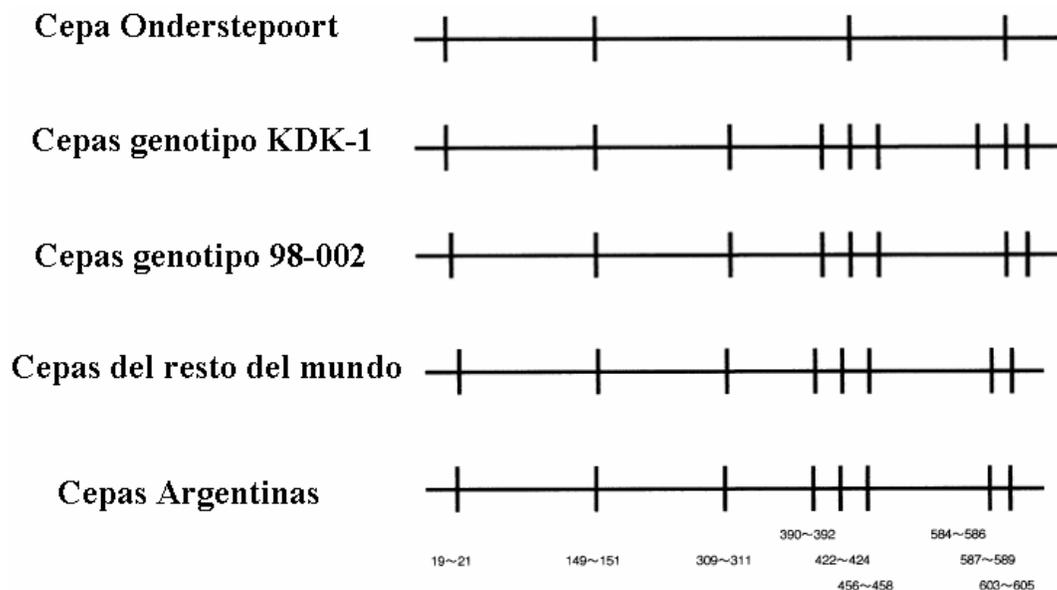


Figura 29 – Sitios potenciales de glicosilación de la secuencia del gen de la Hemaglutinina de cepas de VDC. La cepa vacunal Onderstepoort, las cepas de referencia Japonesas KDK-1 y 98-002 y cepas del resto del mundo se muestran en la figura junto con las cepas Argentinas.

3.7. Intento de aislamiento de una cepa de VDC local en células B95a

Para intentar el aislamiento en cultivo de células de cepas locales de VDC, se infectaron células de la línea celular B95a con PBMC provenientes de animales infectados con VDC (previamente diagnosticados por RT-PCR como positivos). Se analizó por RT-PCR la presencia del VDC por amplificación del fragmento del gen de la NP tanto en el sobrenadante (S), como en el pellet celular (P) de las células B95a.

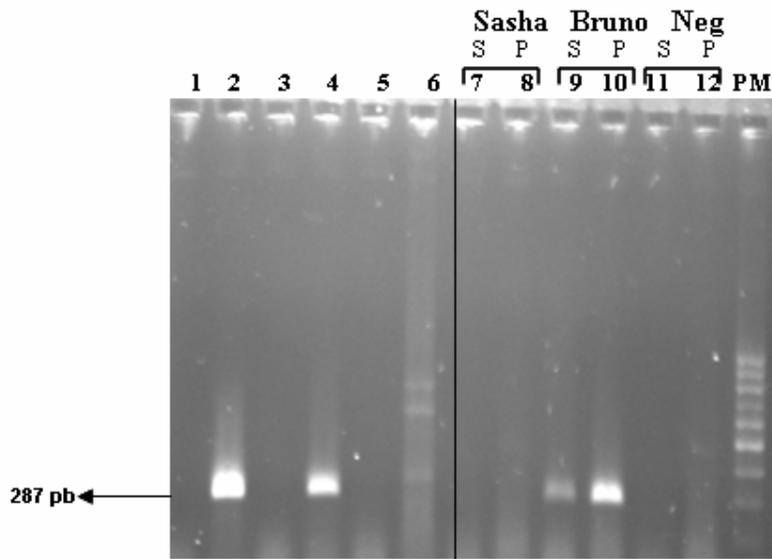


Figura 30 - RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la nucleoproteína (NP) de VDC en PBMC y en células B95a. calle 1: control negativo, calle 2: control positivo (vacuna comercial); calles 3-5: células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de: M 104 “Sasha”, M107 “Bruno”, M 106 “Kraschof”; calle 6: M 109 “Brunilda”, calle 7: B95a “Sasha” (S), calle 8: B95a M 104 “Sasha” (P), calle 9: B95a M 107 “Bruno” (S), calle 10: B95a “Bruno” (P), calle 11: B95a control negativo sin infectar (S), calle 12: B95a control negativo sin infectar (P), calle 13: marcador de peso molecular.

Como se observa en la Figura 30 (Calles 9 y 10), se obtuvo amplificación del fragmento de 287 pb del gen de la NP tanto en el sobrenadante como en el pellet celular del tercer pasaje de la cepa M 107 Arg 24 (“Bruno”).

Luego, se realizó un pasaje más en células B95 (pasaje 4) y con éste, se infectaron células Vero.

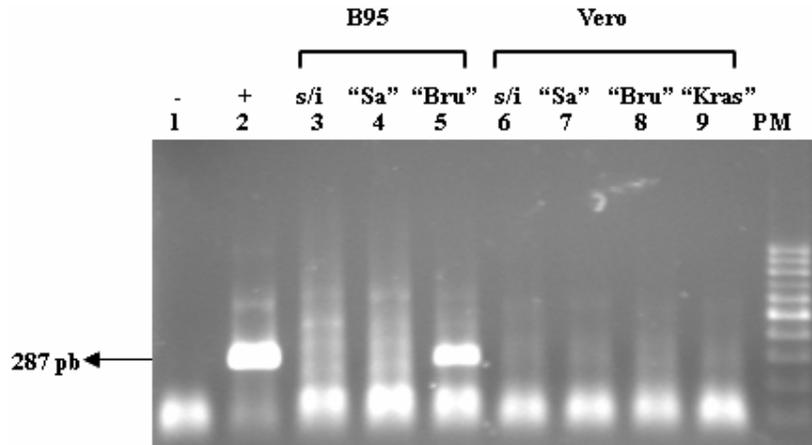


Figura 31 - Detección por RT-PCR del fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC en células B95a y en células Vero infectadas con diferentes cepas de VDC. Calle 1: control negativo, calle 2: control positivo (vacuna comercial), calles 3-5 células B95a: sin infectar (Control neg), infectadas con cepa “Sasha”, infectadas con cepa M107 “**Bruno**” respectivamente. calles 6-9: células Vero: sin infectar (control negativo), infectadas con cepa “Sasha”, infectadas con cepa M107 “Bruno”, infectadas con cepa “Kraschof”, respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

En el caso de la M107 Arg24 “Bruno” se detectó la presencia de VDC en células B95a por RT-PCR, pero no se detectó la presencia de VDC en células Vero (Figura 31).

Resultados similares fueron previamente reportados, mostrando que las células Vero no permiten la propagación de aislamientos de campo, mientras que sí permiten la propagación de cepas vacunales como la Onderstepoort que están adaptadas al cultivo celular (Seki et al., 2003).

3.8. Cultivo de una cepa salvaje de VDC en células VeroSLAM

Con el objeto de estudiar y observar la presencia de efecto citopático producido por una cepa Argentina salvaje de VDC en células VeroSLAM, se procedió a la infección de las mismas con la cepa M107 Arg24 (“Bruno”).

Se sabe que cepas salvajes de VDC de Japón, crecen eficientemente en esta línea celular.

Se realizaron 3 pasajes, obteniéndose efecto citopático en todos ellos. En la Figura 32, se observa la formación de sincicios en células VeroSLAM, provocados por la cepa salvaje Argentina M107 Arg24 ‘Bruno’.

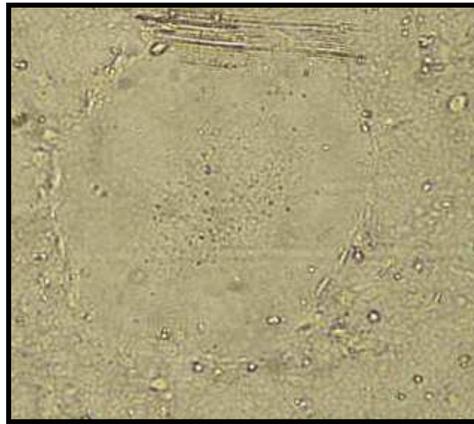


Figura 32 - Efecto citopático de una cepa local de VDC en células VeroSLAM. Formación de sincicios en células VeroSLAM por la replicación de una cepa salvaje de VDC Argentina aislada de un animal vacunado (M107 Arg24 "Bruno").

3.9. Ensayo de Inmunoperoxidasa (IPA)

Con el objeto de confirmar la presencia de VDC en los cultivos infectados y de esta manera corroborar la identidad del virus que provocó la formación de los sincicios en la monocapa celular, se realizó un ensayo de IPA con un anticuerpo monoclonal anti-NP.

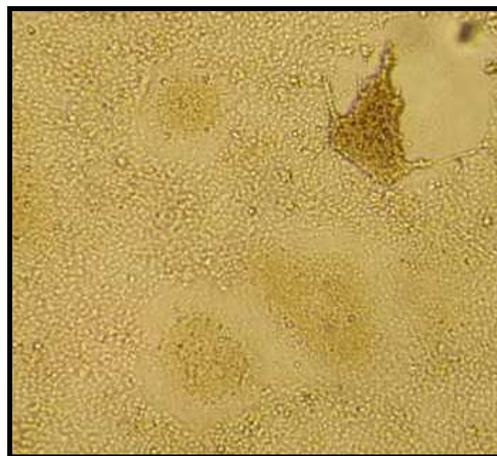


Figura 33 - Ensayo de Inmunoperoxidasa en células VeroSLAM. Células VeroSLAM infectadas con una cepa salvaje de VDC (M107 Arg24 "Bruno").

En la monocapa de células VeroSLAM infectadas, se observó que en los sincicios, se localizaba la mayor cantidad de NP de VDC.

3.10. Ensayo de Western blot

Para identificar la presencia de la NP viral en los cultivos infectados con la cepa salvaje de VDC, se realizó un ensayo de Western blot a partir de los lisados celulares de VeroSLAM infectados tanto con la cepa salvaje, como con la cepa vacunal. Se utilizó el mismo anticuerpo monoclonal utilizado para el ensayo de IPA.

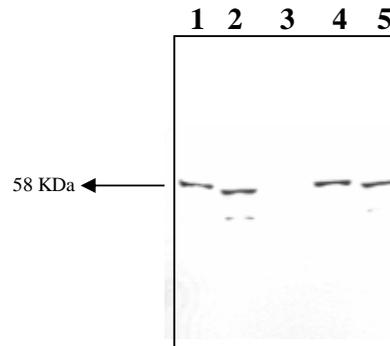


Figura 34 - Ensayo de Western blot con un mAb anti NP de VDC. Calles 1 y 4: cepa M107 Arg 24 “Bruno”, calles 2 y 5: cepa vacunal, calle 3: control negativo, células sin infectar.

Como se observa en la Figura 34, se obtuvieron bandas del tamaño esperado para la NP de VDC.

3.11. Análisis de secuencias nucleotídicas del fragmento de 871 pb de la hemaglutinina de VDC de la cepa Bruno aislada en células VeroSLAM

Con el fin de corroborar la presencia de la cepa salvaje de VDC en el cultivo de células VeroSLAM, se chequeó por secuenciación, el fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina para evaluar la presencia del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *NdeI* (marcador molecular de cepas salvajes).

```

Bruno          TATCATGACGGCAGTGGTTACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACGCTGGGAATATTGGG 60
BrunoVeroSLAM TATCATGACGGCAATGGTTACAAGATGGTATTCTAGTAGTGACGCTGGGAATATTGGG 60
*****

Bruno          GCAACACCTATGGATCAAGTTGAAGTGGTGATACCTGTCGCTCACCCATCAGTAGAAAA 120
BrunoVeroSLAM GCAACACCTATGGATCAAGTTGAAGAGGTGATACCTGTCGCTCACCCATCAGTAGAAAA 120
*****

Bruno          ATACATATAACAAATCACCGTGGGTTCAAAAAGATTCAAAAGCAATCTGGATGGTGCCT 180
BrunoVeroSLAM ATACATATAACAAATCACCGTGGGTTCAAAAAGATTCAAAAGCAATCTGGATGGTGCCT 180
*****

Bruno          GCATGGTCTCTGAGAAACAAGAGGAACAAAAAAATTGTCTGGAGTCGGCTTGTCAAAGA 240
BrunoVeroSLAM GCATGGTCTCTGAGAAACAAGAGGAACAAAAAAATTGTCTGGAGTCGGCTTGTCAAAGA 240
*****

Bruno          AAAACCTACCCTATGTGCAACCAACGTCATGGGAACCCTTTGGGGGAGGACAATTGCCA 300
BrunoVeroSLAM AAAACCTACCCTATGTGCAACCAACGTCATGGGAACCCTTTGGGGGAGGACAATTGCCA 300
*****

Bruno          TCCTATGGGCGGCTGACATTACCTCTAGATCCAAGTATTGACCTTCAACTTAACATATCG 360
BrunoVeroSLAM TCCTATGGGCGGCTGACATTACCTCTAGATCCAAGTATTGACCTTCAACTTAACATATCG 360
*****

Bruno          TTTACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGACGGTATGGATTATTATGAAAGCCCACTT 420
BrunoVeroSLAM TTTACATACGGTCCGGTTATACTGAATGGAGACGGTATGGATTATTATGAAAGCCCACTT 420
*****

Bruno          TTGACTCCGGATGGCTTACCATTCTCCAAAAACGGAACAGTCCTTGGATTGATAAAC 480
BrunoVeroSLAM TTGACTCCGGATGGCTTACCATTCTCCAAAAACGGAACAGTCCTTGGATTGATAAAC 480
*****

Bruno          AAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTCAGTGAATCCCCATGTGTTGACATTTGCGCCTAGG 540
BrunoVeroSLAM AAAGCAAGTAGAGGAGACCAGTTCAGTGAATCCCCATGTGTTGACATTTGCGCCTAGG 540
*****

Bruno          GAATCAGGTGGAATTTGTTATTTACCTATTCAAACCTCCAGATTATGGATAAAGATGTC 600
BrunoVeroSLAM GAATCAGGTGGAATTTGTTATTTACCCATTCAAACCTCCAGATTATGGATAAAGATGTC 600
*****

Bruno          CTTGCTGAGTCCAATTTAGTGGTGTGCTACACAGAATTTTAGATATGTCATAGCAACA 660
BrunoVeroSLAM CTTGCTGAGTCCAATTTAGTGGTGTGCTACACAGAATTTTAGATATGTCATAGCAACA 660
*****

Bruno          TATGATATATCCCGGACGATCATGCGATTGTTTATTATGTTTATGATCCAATCCGGACG 720
BrunoVeroSLAM TATGATATATCCCGGACGATCATGCGATTGTTTATTATGTTTATGATCCAATCCGGACG 720
*****

Bruno          ATTTCTTATACGTACCCATTTAGACTAACTACCAAGGGTAGACCTGATTTCTTAAGAATT 780
BrunoVeroSLAM ATTTCTTATACGTACCCATTTAGACTAACTACCAAGGGTAGACCTGATTTCTTAAGAATT 780
****

Bruno          GAATGTTTTGTATGGGATGACCAITTTGTTGTGTCATCAATTTACCATTGAGGCTGAC 840
BrunoVeroSLAM GAATGTTTTGTATGGGATGACCAITTTGTTGTGTCATCAATTTACCATTGAGGCTGAC 840
*****

Bruno          ATCACTAATCCACAACCAAGTGTGAAAATT 871
BrunoVeroSLAM ATCACTAATCCACAACCAAGTGTGAAAATT 871
*****

```

Figura 35 - Alineamiento de la secuencia nucleotídica del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de la cepa M107 “Bruno” antes y después del pasaje por células VeroSLAM. Las secuencias alineadas corresponden a la cepa salvaje M107 “Bruno” (secuencia obtenida directamente de la muestra de sangre) y a la misma cepa luego del pasaje en células. Se marcó el sitio de reconocimiento de la enzima CATATG

Figura 36 - Distribución geográfica de las muestras positivas por RT-PCR, para el fragmento de 287 pb del gen de la NP de VDC. Se muestra en cada partido, el número de muestras positivas para VDC (en blanco). Los números en negro indican los nombres de los diferentes partidos del conurbano bonaerense. 1: Malvinas Argentinas, 2: Ituzaingo, 3: Hurlingham, 4: Tres de Febrero, 5: General San Martín. Se obtuvo además, una muestra positiva procedente de Santa Fe, otra de Tucumán y 3 de las cuales se desconocía el lugar de origen.

De la Figura 36 se desprende que la mayor cantidad de casos de VDC provinieron del conurbano bonaerense.

3.12.2. Distribución temporal de las muestras analizadas

Se estudió la distribución temporal de las muestras analizadas.

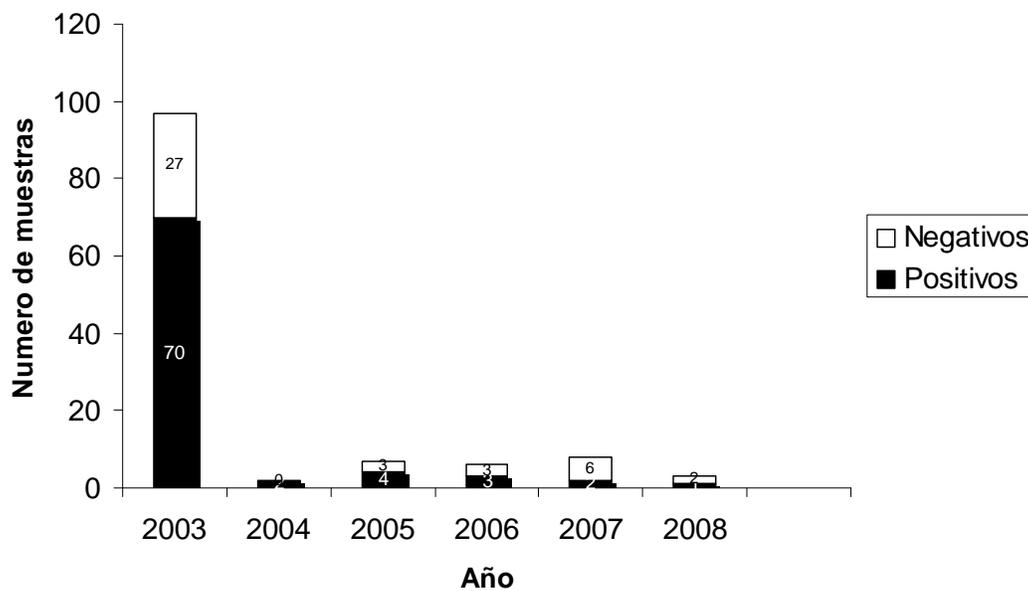


Figura 37 - Distribución temporal de las muestras analizadas. Se muestra el número de muestras analizadas en cada año.

Los datos presentados en la Figura 37 muestran que de un total de 123 muestras analizadas, 97 muestras fueron analizadas durante el año 2003, 2 muestras durante el año 2004, 7 muestras durante el año 2005, 6 muestras en el año 2006, 8 muestras en el año 2007 y 3 en el año 2008.

3.12.3. Relación entre el estado de vacunación y el diagnóstico de VDC por RT-PCR

Como se mencionó anteriormente, se recibieron y analizaron un total de 123 muestras, 81 de las cuales (66 %) provinieron de animales vacunados, 29 (24%) provinieron de animales sin vacunar y 13 (10%) provinieron de animales cuyo estado de vacunación se desconocía.

El ARN de VDC se detectó en 82 de las 123 muestras de sangre analizadas (67%, CI 95% 52.2-81.1), mientras que en 41 de las muestras analizadas (33%, CI 95% 18.9-47.8), no se detectó ARN de VDC.

Con respecto al estado de vacunación de los animales, cabe destacar que de un total de 82 animales diagnosticados como positivos para VDC, 57 animales (70%) estaban vacunados, 20 animales nunca habían sido vacunados (24%) y de 5 animales (6%), no se obtuvo información respecto del estado de vacunación (Figura 38).

Respecto de los 41 animales negativos, 24 animales estaban vacunados, 9 no estaban vacunados y de 8 no se conoce el estado de vacunación.

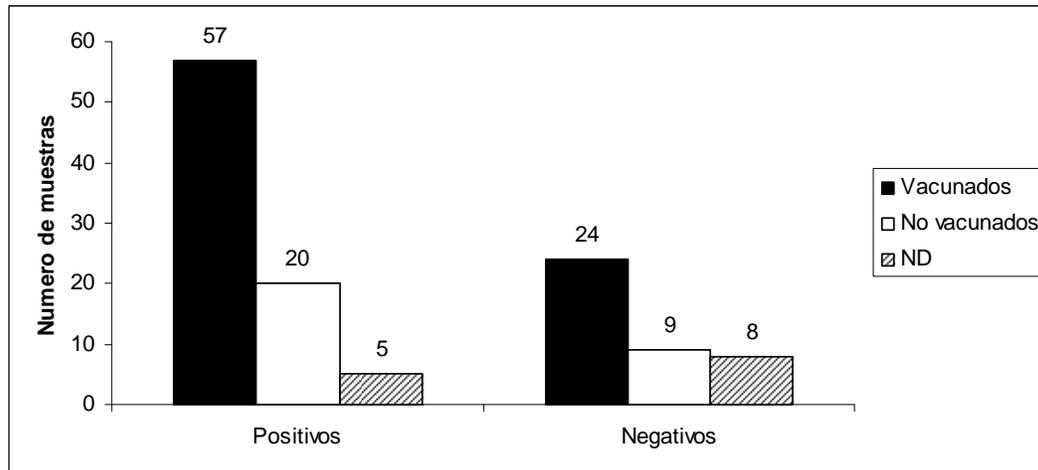


Figura 38 - Número de perros diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales vacunados y no vacunados. Resultado del diagnóstico por RT-PCR y estado de vacunación. ND: No determinado

Estos resultados, reflejan la presencia de una gran cantidad de animales vacunados e infectados con VDC.

Al analizar los datos de los 81 animales vacunados, se observó que 57 de ellos (70% 95% CI, 56.4-84.3) resultaron positivos para VDC por RT-PCR y 24 de ellos (30% 95% CI, 15.7-43.6) resultaron negativos por RT-PCR para VDC.

Al analizar los datos de los 29 animales no vacunados, se observó que 20 de ellos (69% 95% CI, 54.8-83.1) resultaron positivos para VDC por RT-PCR y 9 de ellos (31% 95% CI, 16.9-45.2) resultaron negativos por RT-PCR para VDC. En la Tabla 8, se observa un resumen de los datos.

TOTAL n 123	123		PCR +	PCR -
		n	82	41
		%	67%	33%
		95% CI	52.2 - 81.1	18.9 - 47.8
Vacunados n 81	81		PCR +	PCR -
		n	57	24
		%	70%	30%
		95% CI	56.4 - 84.3	15.7 - 43.6
Sin vacunar n 29	29		PCR +	PCR -
		n	20	9
		%	69%	31%
		95% CI	54.8 - 83.1	16.9 - 45.2
Desconocido	13			

Tabla 8 - Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales vacunados y de los animales no vacunados que resultaron positivos para la detección de VDC.

3.12.4. Relación entre la presencia de sintomatología clínica y el diagnóstico de VDC por RT-PCR

3.12.4.1. En animales vacunados

Asimismo, se determinó en los animales **vacunados**, la relación entre la sintomatología clínica y la detección de VDC.

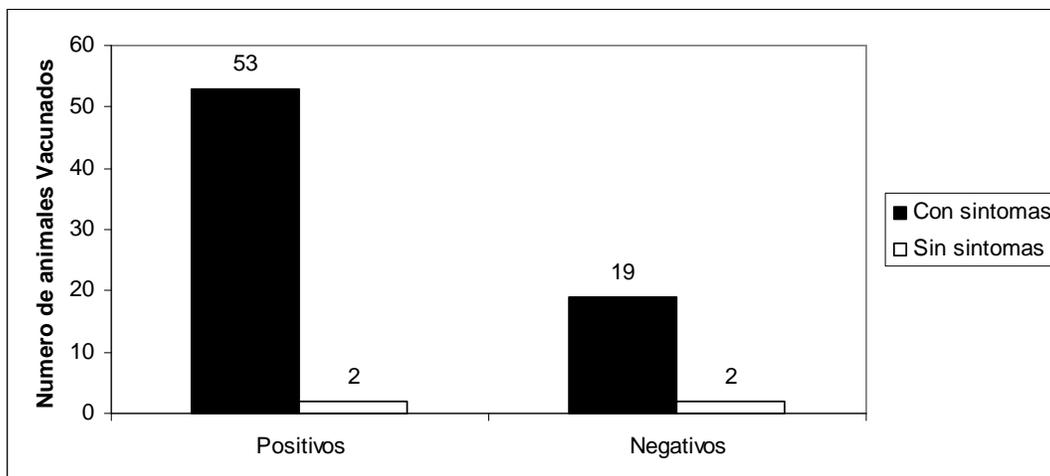


Figura 39 - Número de animales vacunados que resultaron diagnosticados como positivos ó negativos, entre los que presentaban sintomatología compatible con VDC ó no. Resultado del diagnóstico por RT-PCR, estado de vacunación y sintomatología.

Los datos de la Figura 39, muestran que de los 81 animales que estaban **vacunados**, 53 de ellos presentaba sintomatología compatible con VDC y resultaron diagnosticados como positivos y 2 de ellos aún siendo positivos, no habían manifestado signos clínicos de la enfermedad.

Estos resultados, confirman y extienden estudios previos realizados en Alemania (1994-1995), en los cuales se observaron casos de animales que aún estando vacunados, presentaban sintomatología clínica de acuerdo a la anamnesis (Haas et al., 1997).

De los 24 animales vacunados que resultaron negativos para VDC, 19 presentaban sintomatología, y 2 no.

De los 5 animales vacunados sin información acerca de la sintomatología, 2 resultaron RT-PCR positivos y 3 negativos.

3.12.4.2. En animales no vacunados

También se estudió en animales **no vacunados** la relación entre la sintomatología clínica y la detección de VDC (Figura 40).

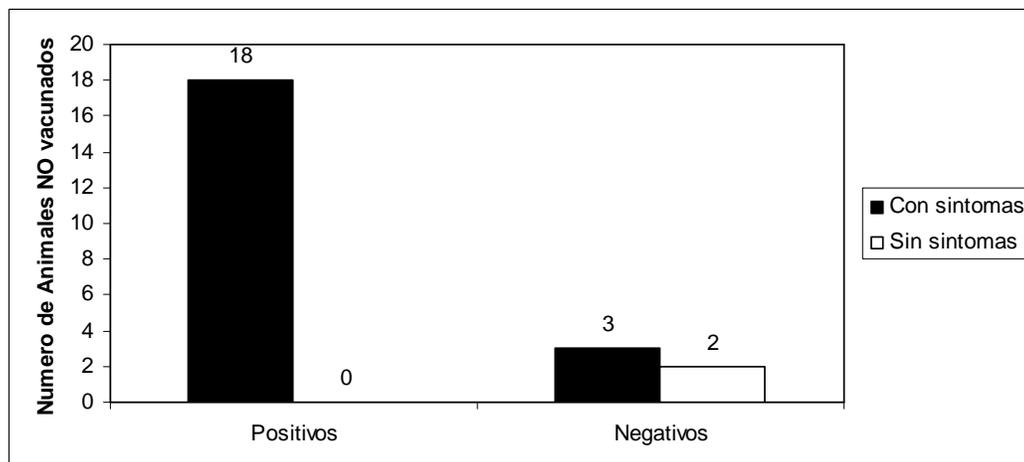


Figura 40- Número de animales no vacunados que resultaron diagnosticados como positivos ó negativos, entre los que presentaban sintomatología ó no. Resultado del diagnóstico por RT-PCR, estado de vacunación y sintomatología.

Del total de 29 animales **no vacunados**, 20 resultaron positivos, de los cuales 18 presentaban síntomas, no había ningún animal que no hubiera presentado síntomas y de 2 animales no se tenía la información respecto de la sintomatología.

De los 9 animales **no vacunados** que resultaron negativos, 3 habían presentado síntomas, 2 no habían presentado síntomas y de 4 no se tenía la información respectiva (Figura 40).

3.12.4.3. En todos los animales sin diferenciación del estado de vacunación

Se estudió también la relación la presencia de sintomatología clínica y el diagnóstico por RT-PCR en todos los animales sin diferenciación del estado de vacunación. Del total de 82 animales, cuyas muestras presentaron amplificación para la NP de VDC, 72 animales (88%, 95% CI, 80.7-94.9) habían mostrado sintomatología compatible con VDC, 2 animales no habían mostrado síntomas y de 8 animales, no se tenía registro de la sintomatología.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se observó una concordancia entre la sintomatología clínica y el diagnóstico de VDC por RT-PCR.

Con respecto a los 41 animales negativos, 25 habían presentado sintomatología, 4 no tenían síntomas y de 12 no se tenía la información respecto de si habían presentado síntomas ó no (Tabla 9).

TOTAL n 123		123	PCR +	PCR -
		n	82	41
		%	67%	33%
		95% CI	52.2 - 81.1	18.9 - 47.8
Con Sintomatología n 97		97	PCR +	PCR -
		n	72	25
		%	74%	26%
		95% CI	60.8 - 87.6	12.4 - 39.2
Sin Sintomatología n 6		6	PCR +	PCR -
		n	2	4
		%	33%	67%
		95% CI	19.8 - 47.8	52.2 - 81.1
Sin datos		20		

Tabla 9 - Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales con síntomas clínicos de VDC y de los animales sin sintomatología clínica que resultaron positivos y negativos para la detección de VDC.

3.12.5. Distribución de edades de los animales infectados con VDC

Se analizó la distribución de edades de los animales infectados con VDC (Figura 41).

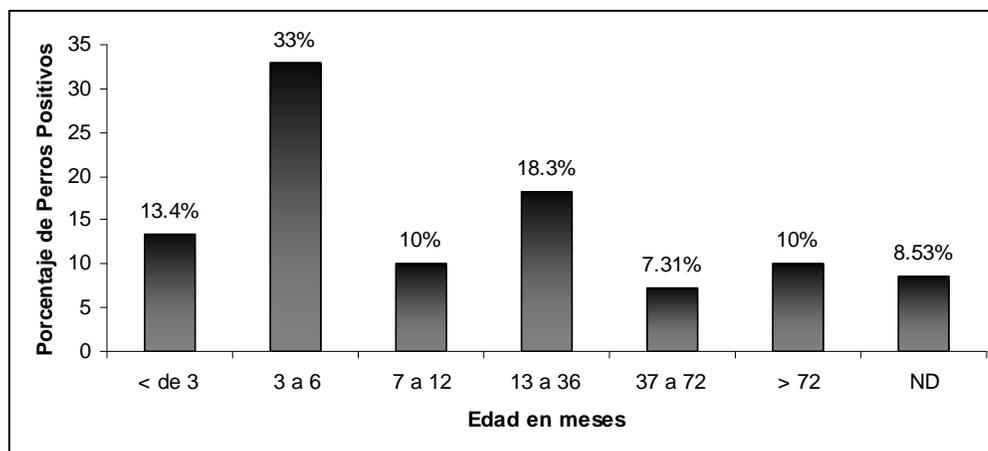


Figura 41 – Porcentaje de perros VDC positivos en diferentes grupos de edades. Distribución de edades de los perros con VDC. ND: no determinado. El 13,4% corresponde a 11 perros, el 33% a 27 perros, el 10% a 8 perros, el 18,3% a 15 perros, el 7.31 a 6 perros y el 8.53 a 7 perros.

En la Figura 41, se observa el porcentaje de animales positivos en cada grupo de edades. Estos resultados, sugieren que el grupo de animales que presenta mayor riesgo de infección, tiene entre 3 y 6 meses de edad, coincidiendo con el momento en el cual los animales pierden los anticuerpos maternos.

3.12.6. Estado de vacunación en diferentes grupos de edades

Se analizó el estado de vacunación en los diferentes grupos de edades, de animales diagnosticados como positivos.

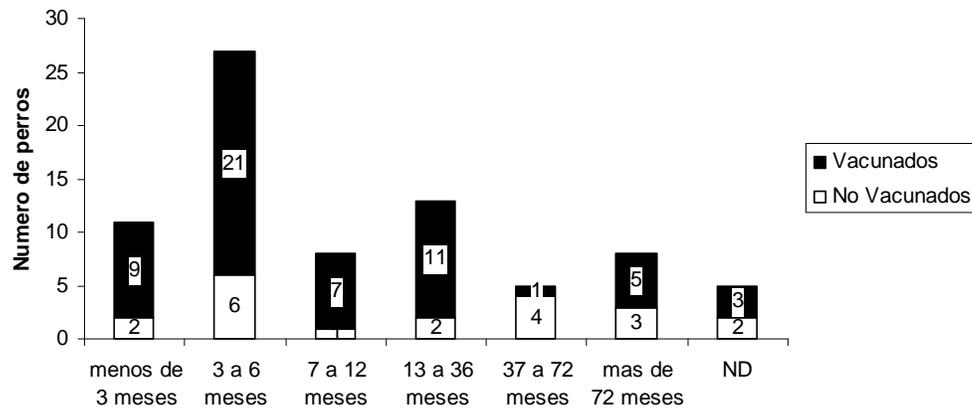


Figura 42 - Distribución de edades de animales VDC positivos, vacunados y no vacunados. Número de animales positivos, con diferente estado de vacunación en los diferentes grupos de edades. ND: no determinado.

De los resultados mostrados en la Figura 42, se desprende que si bien la mayoría de los animales de entre 3 y 6 meses de edad estaban vacunados, se infectaron con VDC.

Por otro lado, no se encontró una asociación entre el sexo del animal y el diagnóstico de VDC. De los animales diagnosticados positivos para VDC, 37 eran hembras, 34 eran machos y de 11 animales no se conoce el sexo.

**APARTADO: "DETECCION DE DISTEMPER CANINO EN ZORROS
SILVESTRES"**

AI 1. Detección de VDC en una muestra de un zorro silvestre

Durante el desarrollo del presente trabajo, se presentó un caso de extremo interés. Específicamente se trata del caso de un ejemplar silvestre (hembra) de zorro de Monte (*Cerdocyon thous*) (foto) hallado muerto y parcialmente predado en el Parque Nacional “El Palmar” de Entre Ríos.



Foto - Zorro de Monte (*Cerdocyon thous*)

Este ejemplar, fue el segundo animal detectado en el Parque Nacional, se estimó que tenía de 2 a 3 años de edad, y no tenía vacunas. El primer ejemplar, fue observado con síntomas nerviosos: incapacidad para caminar, masticación, anorexia, y heridas en cadera por probable automutilación.

De la necropsia, se obtuvo una muestra de cerebro que fue utilizada en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas la FVET (UBA) para el diagnóstico de VDC por inmunofluorescencia directa, obteniéndose un resultado positivo.

Por otro lado, la muestra fue remitida al Instituto de Zoonosis “Luis Pasteur” (Av. Díaz Vélez 4821, Buenos Aires) para el diagnóstico del virus de la Rabia, resultando negativa a este virus, mediante la técnica de Inmunofluorescencia directa.

Debido a la disponibilidad metodológica de nuestro laboratorio, se procedió al análisis de la muestra de cerebro.

Para poder obtener el diagnóstico molecular, se extrajo el ARN de la muestra con Trizol. Se intentó amplificar el fragmento de 287 pb del gen de la NP, no obteniéndose resultados favorables.

Por el contrario, se obtuvieron resultados favorables con la amplificación del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina.

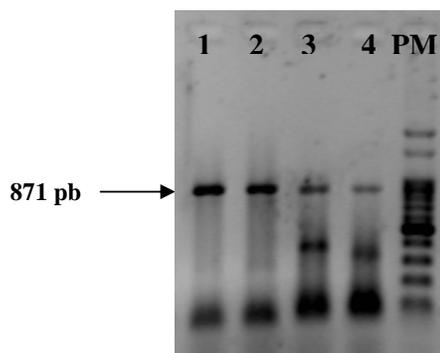


Figura 1 - Detección por RT-PCR del fragmento de 871 pb del gen de la H de VDC en la muestra de zorro. Calle 1: muestra zorro tubo 1, calle 2: muestra zorro tubo 2, calle 3: vacuna comercial control positivo, calle 4: muestra “Mara”, PM: marcador de peso molecular

El fragmento obtenido, fue digerido con la enzima de restricción *NdeI*, observándose el patrón de un sólo sitio de corte, como se obtuvo para las cepas de VDC provenientes de perros.

AI 2. Análisis de secuencia del fragmento de 871 pb del gen de la Hemaglutinina de VDC proveniente del zorro

El fragmento, fue clonado en pGemT y secuenciado; la secuencia obtenida (EU624414) se alineó con diferentes cepas de VDC. Los resultados indican que la cepa de VDC encontrada en la muestra de zorro, tiene un 95-99% de identidad con respecto a cepas salvajes de VDC proveniente de perros, en la secuencia aminoacídica deducida de la región de 871 pb de la hemaglutinina viral.

Por otro lado, la secuencia de la cepa del zorro, se alineó con la secuencia de otra cepa proveniente de un zorro de Italia, obteniéndose un 93% de identidad.

La cepa de VDC proveniente del zorro, presenta alrededor de un 88-90% de identidad con las cepas vacunales, resultado similar al obtenido para las cepas de VDC de perros.

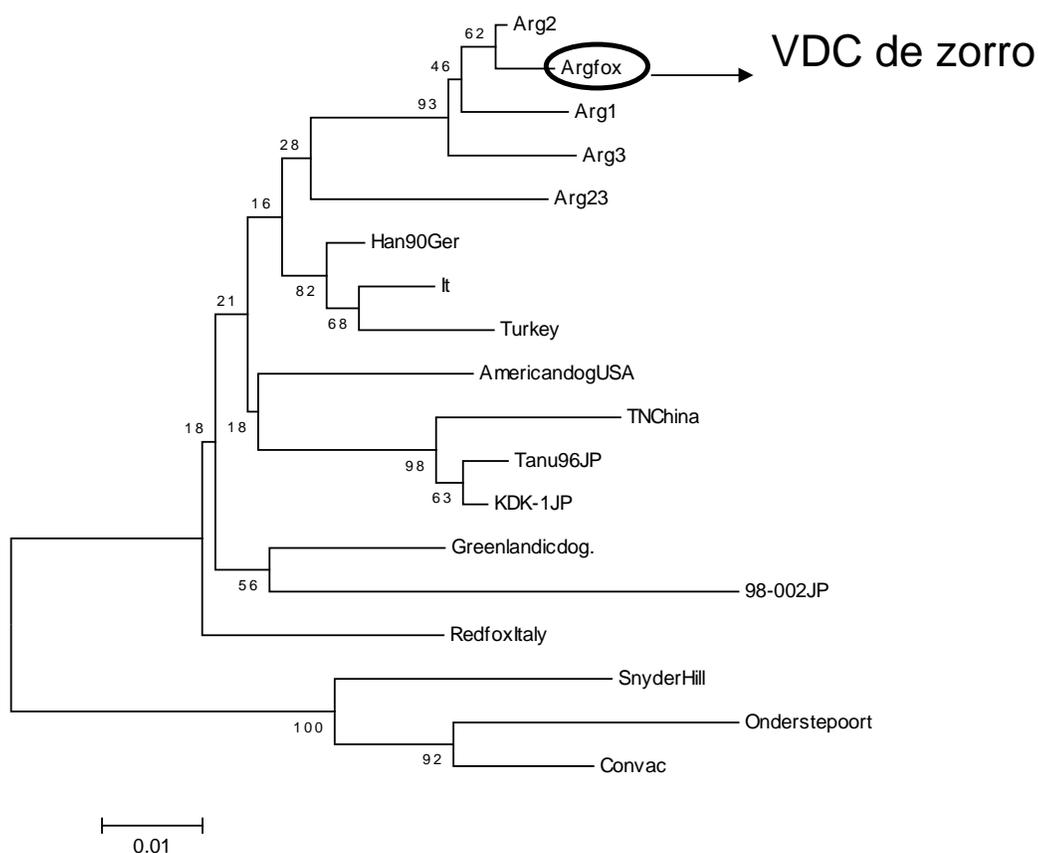


Figura 2: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas deducidas (290 aa) de los fragmentos de 871 pb del gen de la H de VDC de cepas locales e internacionales. Arg 1, 2, 3, 23: cepas Argentinas obtenidas de perros; Argfox, cepa de VDC obtenida del zorro. Las longitudes de las ramas del árbol, indican las distancias filogenéticas calculadas a partir de las matrices de distancias.

AI 3. Conclusiones

En un ejemplar de zorro de monte, se diagnosticó DC, con un alto grado de identidad en el fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina respecto del virus Distemper proveniente de perros.

Tal como se describió en la sección “Consideraciones Generales”, a consecuencia de la crisis económica del año 2001, se produjo un aumento considerable de perros abandonados y de animales que aún viviendo en sus hogares, dejaron de ser vacunados, debido al elevado costo de las vacunas comercialmente disponibles. La consecuencia directa de esta situación, fue una disminución de la cobertura vacunal poblacional y un eventual aumento de la circulación viral. Sumado a esta situación, se evidenció en el sistema asistencial, una necesidad importante de métodos que permitieran diagnosticar inequívocamente enfermedades virales caninas de gran letalidad y alto impacto sanitario, tales como el VDC y PVC.

El diagnóstico de VDC, se realiza de rutina, por el análisis de las manifestaciones clínicas, y por la observación de la evolución del animal. Eventualmente, el veterinario pide estudios complementarios tales como hemogramas, citología de secreciones oculares y/ó exámenes generales de laboratorio, para confirmar el diagnóstico presuntivo. El diagnóstico específico de laboratorio para VDC, se hace en nuestro país, por métodos de inmunofluorescencia (directa ó indirecta), ó ELISA.

En el caso de la inmunofluorescencia, se utilizan hisopados conjuntivales, de las amígdalas ó del epitelio respiratorio y si bien, este test es útil para confirmar casos clínicos de DC, se pueden obtener falsos negativos cuando el animal, se encuentra en la etapa de recuperación de la enfermedad (Pardo, 2006). Por otro lado, la detección de altos títulos de anticuerpos (IgM ó IgG) por ELISA puede deberse tanto a una infección reciente por VDC ó bien a la vacunación, por lo que no permite diferenciar animales vacunados de infectados.

En nuestro país, no hay laboratorios especializados en el diagnóstico molecular de enfermedades caninas por lo que es un área de vacancia. Como primer paso del presente trabajo, se planteó desarrollar y aplicar herramientas de biología molecular con el objetivo de detectar la presencia del ARN de VDC en muestras de perros con manifestaciones clínicas compatibles con VDC.

La herramienta primaria de “screening” diagnóstico utilizada, fue la amplificación por la técnica de RT-PCR, de un fragmento de 287 nt localizado en la región central del gen de la NP viral (Frisk et al., 1999). Esta región del genoma, se ha descrito en la literatura, como altamente conservada, otorgándole entonces a este fragmento una ventaja importante para el diagnóstico, con respecto a otras regiones del genoma.

El primer paso para el desarrollo de la metodología, fue el análisis de vacunas comerciales que contenían en su formulación VDC. Se analizaron 4 vacunas

comerciales (nacionales e importadas) y en todos los casos se detectó el fragmento de 287 pb esperado.

Con la metodología de extracción de ARN y la amplificación por RT-PCR de secuencias de VDC puestas a punto, se comenzaron a analizar, muestras provenientes de perros con diagnóstico clínico de DC, para implementar y evaluar el alcance del diagnóstico molecular de VDC.

Inicialmente, se trabajó a partir de sangre entera coagulada, suero, sangre con anticoagulante y plasma. Las muestras de sangre coagulada, resultaron ser las más adecuadas para el diagnóstico molecular, ya que además de ser eficientes para la detección de VDC, es el tipo de muestra que más se adapta a la idiosincrasia de la práctica de los veterinarios clínicos.

Entre los años 2003 y 2008 se analizaron 123 muestras de animales sospechados de haber contraído CD. En 82 de ellas (67%), se detectó la presencia del fragmento de 287 nt del ARN de VDC, mientras que 41 muestras (33%) fueron negativas (Figura 38).

La ausencia de detección por RT-PCR del ARN de VDC en estas muestras, pudo haberse debido a la presencia de inhibidores en las mismas, a la presencia de concentraciones subóptimas de ARN, ó bien a la ausencia de ARN.

A fin de descartar la presencia de inhibidores, algunas de las muestras negativas fueron mezcladas con muestras positivas. En todos los casos, se logró la amplificación del fragmento de 287 nt (resultados no mostrados).

Los fragmentos de 287 pb del gen de la NP de VDC obtenidos de 6 cepas de campo elegidas al azar y de una vacuna comercial, se clonaron y secuenciaron. En todos los casos, se obtuvo un 100% de identidad de las secuencias de las cepas nacionales e internacionales a nivel aminoacídico, confirmando el alto grado de conservación de este fragmento genómico y su alto valor para el diagnóstico de VDC (Figura 20).

Tanto en Argentina (datos del presente trabajo), como en diferentes regiones del mundo tales como Italia, Brasil y Polonia, se adoptó esta misma región del genoma (287 nt), para diagnóstico por RT-PCR de VDC (Scagliarini et al., 2003), (Amude et al., 2006), (Jozwik and Frymus, 2005). Asimismo, la misma región del genoma, obtenida por RT-PCR de muestras conjuntivales, fue clonada y expresada en bacterias, para la producción de un antígeno específico, apto para la detección por ELISA, de anticuerpos anti-VDC en sueros de animales enfermos (Latha et al., 2007).

De los datos presentados, resulta claro que la técnica de RT-PCR es una herramienta diagnóstica rápida, específica y sensible para detectar la presencia de secuencias genómicas de VDC en muestras de perros con enfermedad clínica compatible con VDC. Se investigó luego la variabilidad genética de las cepas salvajes de VDC detectadas en los animales objeto de este estudio.

Es bien conocido que los virus con genoma a ARN, son los parásitos moleculares más abundantes que infectan humanos, animales y plantas; y que explotan todos los mecanismos biológicos conocidos de variación genética para asegurar su supervivencia. Las características distintivas de la replicación de los virus a ARN, incluyen altas tasas de mutación ($10^{-3}/10^{-4}$) y cortos tiempos replicativos generando “cuasiespecies” que pueden ser eventualmente seleccionadas por presión inmunológica, concluyendo con la aparición de sub-poblaciones virales portadoras de importantes cambios genéticos y antigénicos (Domingo and Holland, 1997) que podrían ser pobremente neutralizadas por los anticuerpos vacunales.

El VDC posee dos proteínas en la envoltura viral: la hemaglutinina (H) que es la glicoproteína responsable de la unión del virus a las células hospedadoras y la proteína F que produce la fusión de las membranas viral y celular, permitiendo así la entrada del complejo ribonucleoproteico del virus al citoplasma.

De acuerdo a la bibliografía internacional, las secuencias aminoacídicas de la proteína F muestran sólo un 4% de variabilidad entre las diferentes cepas de VDC, mientras que la variabilidad de la proteína H es de aproximadamente un 10% (von Messling et al., 2001).

A fin de estudiar la variabilidad genética de las cepas de VDC obtenidas en nuestro país, de perros infectados y clínicamente enfermos, se analizó una región de 871 nt del gen de la hemaglutinina por RFLP y secuenciamiento.

En todas las muestras Argentinas en las cuales se había detectado la NP de VDC, se procedió a amplificar el fragmento de 871 nt del gen de la H. Este fragmento fue estudiado asimismo en 5 vacunas comerciales de Argentina. La amplificación de este fragmento fue posible sólo en 24 (30%) de las 82 muestras de campo positivas para VDC y en las 5 vacunas comerciales analizadas.

Se ignoran al momento las razones de la falta de amplificación del fragmento de 871 nt en aquellas muestras en las que se había detectado ARN de la NP de VDC. Entre las razones posibles se pueden considerar: la variabilidad genética en esta región del genoma, la longitud del fragmento, y una eventual degradación del ARN.

Para confirmar la presencia del ARN del gen de la H en algunas de las muestras que habían sido positivas para el gen de la NP, se amplificó otra región del gen de la H, de 347 nt, comprendida entre la posición 206 y la 553 (Figura 13). Este fragmento se estudió en 3 muestras, 2 de las cuales habían sido negativas para el fragmento de 871 nt (M 74, “Marcos” y M 7, “Marga”) y la restante, había resultado positiva para el fragmento de 871 nt (M 40 Arg 4 -“Kalua”). La amplificación de este fragmento fue posible en la muestra que ya había sido positiva para el fragmento de 871 nt M40 (Arg 4 - “Kalua”) y en la muestra M 7, “Marga”.

Los fragmentos obtenidos, fueron clonados y secuenciados, obteniéndose un alto porcentaje de identidad entre las 2 cepas locales (99%) y de 91-92% con respecto a las cepas vacunales.

Se estudió luego, un fragmento de 174 nt localizado al comienzo del gen de la H (Figura 14), el que de acuerdo a datos bibliográficos, estaría más conservado. Efectivamente, el fragmento pudo amplificarse en las 3 muestras analizadas (Arg 4 -“Kalua”, M 74 “Marcos” y M 7 “Marga”) y el análisis de las secuencias de aminoácidos deducidas, mostró un mayor grado de conservación entre todas las cepas (100% de identidad entre las cepas locales) (Tabla 7). Cabe destacar además, que este fragmento es utilizado para detectar VDC de rutina por RT-PCR, en muestras de perros y zorros, particularmente en Japón e Italia (Mochizuki et al., 1999), (Martella et al., 2002).

Estos resultados sugieren que el gen de la H estaría presente al menos en algunas de las muestras que fueron negativas para los fragmentos de 871 nt (y positivas para la NP) y que la falta de amplificación se debería a la variabilidad del gen en la región de hibridización de los primers utilizados.

El trabajo se continuó con el análisis por RFLP de las 24 muestras locales en las que se detectó el fragmento de 871 nt del gen de la H.

La digestión de este fragmento con la enzima de restricción *NdeI*, permite la diferenciación entre cepas salvajes y vacunales (Hashimoto et al., 2001). En el trabajo mencionado, se reportó la presencia de 2 genotipos de cepas salvajes de VDC circulantes en Japón. El genotipo (H1, KDK-1), posee dos sitios de reconocimiento para la enzima a lo largo del fragmento, lo cual resulta en la generación de 3 fragmentos de restricción (de 366, 294 y 211 pb). El otro genotipo (H2, 98-002), posee sólo un sitio de reconocimiento para la enzima, generando 2 fragmentos de restricción: uno de 660 y otro de 211 pb.

Dado este antecedente, se estudió si las cepas salvajes Argentinas habían adquirido durante su evolución, el sitio de reconocimiento de la enzima *NdeI*.

Se encontró que las cepas de VDC Argentinas, presentaron en todos los casos, un sólo sitio de reconocimiento para la enzima *NdeI*, asimilándose al genotipo H2 presente en Japón y confirmando la presencia de genotipos salvajes en las muestras clínicas (Figura 22).

Al no poseer las cepas presentes en las vacunas, el sitio de reconocimiento para la enzima *NdeI*, se descarta que la detección de VDC por RT-PCR, corresponda a la detección de cepas vacunales y confirma que los virus detectados por RT-PCR, como causantes de la enfermedad, son cepas salvajes de VDC circulantes en nuestro país. Más aún, hay estudios que muestran que después de los 14 días post-vacunación no se detecta por RT-PCR la cepa vacunal (Kim et al., 2001), (Shin et al., 1995).

De los 24 fragmentos de 871 pb del gen de la H obtenidos de cepas locales en el presente trabajo, 20 (83%) provenían de perros que habían recibido alguna vacunación, 3 provenían de animales no vacunados y uno, de un animal cuyo estado de vacunación se desconocía. De los 20 animales vacunados, 13 habían recibido la última vacunación hacía un mes ó más tiempo, 5 animales habían recibido la última vacunación hacía menos de un mes (Mac Arg 1, 18 días; Magui Arg 15, 29 días; Lier Arg 14, 13 días; Mancha Arg 17, 25 días y Bruno Arg 24, 7 días), y de 2 animales se desconocían los datos de la última vacunación.

Se ignora si la aparición del sitio de reconocimiento de la enzima *NdeI* en la posición 660 del fragmento (posición 1572 del gen completo de la H) en cepas salvajes tanto de Argentina como del resto del mundo, se correlaciona con algún parámetro biológico pero se observó que no se traduce en cambios en la secuencia aminoacídica. Sin embargo, provee un marcador molecular que permite diferenciar a las cepas salvajes de las cepas vacunales, generando una herramienta diagnóstica de gran relevancia.

Para continuar el estudio de la variabilidad genética del gen H, se clonaron y secuenciaron los 24 fragmentos (871 pb) obtenidos de las cepas de campo y de las 5 cepas vacunales.

Análisis filogenéticos realizados con cepas provenientes de diferentes regiones del mundo, revelaron que los aislamientos de campo recientes forman un cluster separado de las cepas vacunales, sugiriendo la presencia de diferentes linajes de VDC distribuidos en el todo el mundo (Ohashi et al., 1998).

El análisis filogenético del fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina de las cepas salvajes de VDC, confirmó la presencia de un linaje Argentino con alto grado de identidad aminoacídico entre las cepas (97.2–99.3%) (Tabla 5). Las cepas locales, pudieron ser agrupadas en un cluster filogenético claramente separado de las cepas vacunales y de otras cepas salvajes de VDC, caracterizadas en otras regiones del mundo (Figura 26).

Mochizuki et al. (Mochizuki et al., 1999) propuso que las cepas pertenecientes al mismo clado, comparten más del 95% de identidad entre sus aminoácidos en el gen de la Hemaglutinina, lo cual lleva a pensar que la cepa Arg 23 podría pertenecer a otro genotipo por permanecer alejada filogenéticamente de otras cepas locales (Arg 13, Arg 16 y Arg 19, 94.5% de identidad).

Las cepas locales, mostraron sólo un 87.2–89.3% de identidad con respecto a la cepa de vacunal de referencia Onderstepoort, y un porcentaje de identidad similar con respecto a las vacunas utilizadas actualmente en la Argentina (Vac 1- 4 y vacuna “Recombitek”) (Tabla 5).

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman y extienden resultados previos obtenidos en otras regiones del mundo, que mostraron una clara diferenciación entre cepas salvajes y vacunales (Bolt et al., 1997), (Iwatsuki et al., 1997).

El hecho de haber establecido que las cepas salvajes y no las vacunales son las responsables de la enfermedad, permite garantizar a los veterinarios y criadores la seguridad de las vacunas y su utilización como herramienta preventiva descartando una eventual reversión a la virulencia de las cepas vacunales.

De las 24 muestras en las cuales se pudo detectar y analizar el fragmento de 871 pb, sólo en 2 de ellas pudo amplificarse el gen completo de la hemaglutinina.

El análisis de las secuencias del gen completo, mostró la presencia de cambios importantes con respecto a las cepas vacunales, en las mismas posiciones que en las cepas de VDC salvajes de todo el mundo.

Aminoácidos tales como la prolina y la cisteínas, que son importantes para determinar la estructura secundaria de las proteínas, se encuentran altamente conservados en el gen de la H de VDC (Haas et al., 1997). Sin embargo, tal como en el caso de las cepas salvajes internacionales, en las cepas Argentinas, se encontraron también, sitios potenciales de glicosilación adicionales que no están presentes en la cepa vacunal prototipo Onderstepoort. Si bien, no se conoce el rol que juega en la respuesta inmune la

aparición de estos sitios, podrían eventualmente contribuir, a la falta de neutralización cruzada entre las cepas.

En nuestro país, las cepas vacunales, son indistinguibles de las cepas presentes en las vacunas del resto del mundo, es decir están formuladas con cepas “viejas” (desarrolladas en los años 50s). Cabe destacar, por otro lado, que el proceso de atenuación de cepas de campo para la actualización de vacunas, es de larga duración, tedioso y poco práctico.

Si bien, las vacunas actualmente utilizadas hasta el momento, han probado en general ser efectivas en el control de la enfermedad, la aparición de nuevas variantes en perros vacunados de la República Argentina y otras regiones del mundo, sugiere la necesidad de la actualización de las cepas vacunales, tanto las que se encuentran en las vacunas atenuadas como en la vacuna recombinante. Resultados de este trabajo, mostraron que existe un 98.6% de identidad entre la secuencia de la cepa vacunal ancestral Onderstepoort y la secuencia presente en la vacuna Recombitek, en el fragmento de 871 pb del gen de la hemaglutinina (Tabla 5).

En este sentido, el presente trabajo de tesis, sienta las bases para la futura actualización de las vacunas, al disponer de la secuencia del gen completo de la Hemaglutinina de dos cepas salvajes locales de VDC (una del año 2005 y otra del año 2003) para su clonado en vectores tales como “Canarypox” el cual ya fue utilizado en la generación de vacunas recombinantes ó bien como herramienta para el desarrollo de vacunas genéticas (a ADN) (Griot et al., 2004), y recombinantes a subunidades.

El aislamiento de cepas locales en cultivo de células, no pudo ser realizada en el presente trabajo, de manera sistemática, ya que solamente se disponía en la gran mayoría de los casos de la sangre coagulada de los animales. Dado que el objetivo inicial del trabajo fue desarrollar y evaluar el diagnóstico molecular de VDC, se solicitaba a los veterinarios que tomaran una muestra de sangre coagulada.

Con el transcurso del tiempo, surgió la idea y la necesidad de aislar el virus en cultivo de células, y se solicitó a los veterinarios que tomaran además de la muestra de sangre coagulada, otra muestra de sangre con anticoagulante que representa el material de partida para la purificación de PBMC. Las muestras obtenidas de esta manera, fueron sólo 10, con lo cual no se contó con el material adecuado para realizar diferentes aislamientos. Sin embargo, se logró aislar una cepa salvajes de VDC en células en cultivo. Estudios moleculares realizados con esta cepa luego de tres pasajes in vitro, demostraron que la misma es representativa de la población salvaje estudiada en el

presente trabajo, y que es un excelente material para estudios inmunológicos y biológicos y un valioso stock de material genético para el desarrollo de vacunas de nueva generación.

Los títulos obtenidos en cultivo para el aislamiento citado, fueron bajos (aproximadamente 10^2 DICT50%/ml) pero se realizaron pruebas preliminares de purificación y concentración en gradientes de sacarosa (20 a 60%) obteniéndose resultados favorables.

La replicación de la cepa salvaje en las células VeroSLAM, se detectó por la visualización de efecto citopático (formación de grandes sincicios) y con un ensayo de inmunoperoxidasa realizado con un anticuerpo monoclonal anti NP de VDC. Asimismo, se realizó un ensayo de western blot con material recuperado de las células infectadas.

Finalmente, se corroboró la presencia de la cepa salvaje en las células VeroSLAM, con la secuenciación del fragmento de 871 pb del gen de la H, observándose la presencia del sitio de reconocimiento de la enzima *NdeI* indicador de la presencia de la cepa salvaje.

A fin de establecer, eventuales correlaciones entre los parámetros epidemiológicos y los diagnósticos moleculares determinados en este trabajo, se solicitó a los veterinarios que adjuntaran datos clínicos relacionados con los pacientes, cuyas muestras fueron enviadas a nuestro laboratorio.

Con esta información, se configuró una base de datos que permitió elaborar algunas conclusiones relacionadas con la epidemiología de VDC.

Con respecto a la distribución geográfica de los casos analizados, (Figura 36), la mayor cantidad de casos de VDC se detectaron en el conurbano Bonaerense, sugiriendo un mejor estado de protección vacunal de los animales de la Capital con respecto a los animales del conurbano, en donde los recursos económicos son por lo general, menores.

Con respecto a la distribución temporal, la mayor cantidad de muestras, fue recibida durante el año 2003. A fines de ese año, la tecnología desarrollada en el presente trabajo para la detección molecular de VDC, fue transferida a la empresa (Kam Biotec S.R.L.). La misma, se estableció en la Ciudad de Buenos Aires, para ofrecer servicios de análisis moleculares y diagnóstico de enfermedades genéticas ó adquiridas, a veterinarios, propietarios y criadores de animales domésticos. Es por ello, que a partir de ese momento, la mayoría de las muestras, fueron derivadas a la empresa.

Los datos obtenidos en el presente trabajo, asignan una mayor prevalencia del VDC en animales de entre 3 y 6 meses (Figura 41). Es posible que esto se deba a un “gap”

inmunológico generado por la pérdida de la inmunidad materna y/o a la falta de cobertura vacunal apropiada (Pardo, 2006).

Los resultados obtenidos confirman y extienden estudios previos (Jozwik and Frymus (2002) en los cuales se observó en una población canina urbana de Polonia, que la prevalencia de DC, era más alta entre los 3 y 6 meses de edad.

Como no hay diseñado un esquema de vacunación que pueda superar la brecha de protección que existe entre la inmunidad materna pasiva y la inmunidad activa, deben aplicarse medidas profilácticas que incluyan el aislamiento de los perros jóvenes de la población general, hasta que se haya alcanzado el nivel de protección adecuado inducido por la vacuna (Blixenkrone-Moller et al., 1993).

La protección de los anticuerpos maternos, se pierde aproximadamente a las 12 semanas, es por esto que en Argentina, las recomendaciones para las vacunaciones son las siguientes:

El plan inicial para cachorros es de 3 dosis: la primera dosis se aplica a los dos meses de edad (8 semanas), aunque los anticuerpos maternos interfieran con el desarrollo de una buena respuesta. La segunda dosis se debe aplicar después de 3 ó 4 semanas y la tercera dosis a las 15-16 semanas de vida. Se sugieren refuerzos anuales de por vida.

Este plan difiere del aplicado por ejemplo en EEUU, Canadá ó Europa, en donde se están cambiando los protocolos de vacunación evitando la revacunación anual, sugiriendo que se puede revacunar hasta con intervalos de 3 años. Esto se debe a que el nivel de cobertura de las mascotas en esos países, es mayor y por lo tanto el riesgo de infección es menor.

En cuanto a la relación entre el estado de vacunación y el diagnóstico de VDC por RT-PCR, debe aclararse que la mayoría de las muestras analizadas en este trabajo, provinieron de perros cuyos dueños habían efectuado reclamos respecto de las vacunas utilizadas. Es por eso, que la mayoría de los animales (70%) en los cuales se detectó VDC por RT-PCR, se encontraban vacunados (Tabla 8). No obstante, el desarrollo de la infección en animales vacunados es preocupante y resalta la necesidad de la actualización de las vacunas.

De acuerdo a lo observado en la Tabla 9, se estableció una concordancia entre la presencia de sintomatología clínica y la detección de VDC por RT-PCR. Sin embargo, hubo 19 animales vacunados que habían mostrado sintomatología compatible con VDC, en cuyas muestras no se detectó la presencia de VDC por RT-PCR. Si bien no podemos

descartar que se trate de falsos negativos, tampoco puede descartarse la posibilidad de que los síntomas se hayan debido a alguna otra patología.

Por otro lado, se encontraron 2 animales sin sintomatología clínica, con diagnóstico molecular positivo para VDC, cuyas muestras fueron enviadas al laboratorio preventivamente por estar en contacto con animales clínicamente enfermos. De esta manera, se detectó infección sin enfermedad (portadores asintomáticos).

Del análisis de este trabajo, podemos concluir que las infecciones presentadas por los animales, se debieron a la presencia de cepas salvajes, diferentes genéticamente de las cepas vacunales. Las cepas de calle, pudieron haberse generado por presión inmunológica selectiva de la vacunación ó bien, pudieron haber sido introducidas por el comercio ilegal de animales, problema conocido a nivel mundial, que puede modificar la epidemiología de VDC introduciendo cepas nuevas en áreas vírgenes ó contribuyendo a la emergencia de nuevas cepas de VDC (Martella et al., 2007).

Apartado I: “Detección de Distemper Canino en Zorros Silvestres”

Los aislamientos de VDC tienen implicancias epidemiológicas importantes tanto para la población canina como para la población de animales silvestres, ya que la interacción entre estas dos poblaciones de huéspedes es frecuente y puede generar la aparición de nuevas variantes del virus.

Durante, el año 2006 se percibió una aparente disminución de la población de zorros de monte (*Cerdocyon thous*) en el Parque Nacional “El Palmar”, Provincia de Entre Ríos, coincidentemente con varios avistajes de ejemplares con síntomas neurológicos y el hallazgo de 6 individuos muertos. En el 2007 se detectó un zorro de monte con síntomas nerviosos (paresia, auto mutilación, signos de masticación) y otro animal muerto. El individuo con síntomas nerviosos fue eutanasiado y ambos fueron sometidos a necropsias.

El análisis molecular realizado en nuestro laboratorio a partir de una muestra de cerebro de zorro, confirmó la presencia de VDC con un alto porcentaje de identidad en las secuencias deducidas de aminoácidos del fragmento de 871 pb del gen de la H, con respecto a las cepas de VDC recuperadas de perros. Asimismo, se detectó en este fragmento, el sitio de reconocimiento de la enzima *NdeI* que contribuye a la determinación de la presencia de una cepa de VDC salvaje en la muestra de zorro.

En el Parque Nacional “El Palmar” los zorros de monte viven en simpatría con otras especies silvestres carnívoras como el zorro gris (*Lycalopex gymnocercus*), el lobo de río (*Lontra longicaudis*), el oso lavador (*Procyon cancrivorus*) y hurón menor (*Galictis cuja*), por lo que se asume que existen riesgos potenciales de contagio a estas especies.

Los esfuerzos en Argentina para implementar estrategias sanitarias preventivas en unidades de conservación son escasos y los riesgos de transmisión de enfermedades entre poblaciones silvestres y animales domésticos son una realidad tangible. Desde este enfoque, la integración de las ciencias de la salud a las políticas actuales de conservación, será clave para promover medidas sanitarias preventivas con particular atención a las áreas protegidas.

Este trabajo, constituye el primer reporte de DC en carnívoros silvestres de Argentina.

- Amude, A.M., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., 2006, Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Vet Res Commun* 30, 679-687.
- Appel, M.J., 1969, Pathogenesis of canine distemper. *Am J Vet Res* 30, 1167-1182.
- Appel, M.J., Shek, W.R., Summers, B.A., 1982, Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect Immun* 37, 592-600.
- Appel, M.J., Mendelson, S.G., Hall, W.W., 1984a, Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. *J Virol* 51, 643-649.
- Appel, M.J., Shek, W.R., Shesberadaran, H., Norrby, E., 1984b, Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch Virol* 82, 73-82.
- Appel, M.J., Summers, B.A., 1995, Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol* 44, 187-191.
- Appel, M.J., 1999, Forty years of canine vaccination. *Adv Vet Med* 41, 309-324.
- Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., Richardson, C.D., 1985, Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* 53, 908-919.
- Bellini, W.J., Englund, G., Richardson, C.D., Rozenblatt, S., Lazzarini, R.A., 1986, Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J Virol* 58, 408-416.
- Bergman, J.G., Muniz, M., Sutton, D., Fensome, R., Ling, F., Paul, G., 2006, Comparative trial of the canine parvovirus, canine distemper virus and canine adenovirus type 2 fractions of two commercially available modified live vaccines. *Vet Rec* 159, 733-736.
- Blancou, J., 2004, Dog distemper: imported into Europe from South America? *Hist Med Vet* 29, 35-41.
- Blixenkrone-Moller, M., Pedersen, I.R., Appel, M.J., Griot, C., 1991, Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet Diagn Invest* 3, 3-9.
- Blixenkrone-Moller, M., Svansson, V., Have, P., Orvell, C., Appel, M., Pedersen, I.R., Dietz, H.H., Henriksen, P., 1993, Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet Microbiol* 37, 163-173.
- Bohm, J., Blixenkrone-Moller, M., Lund, E., 1989, A serious outbreak of canine distemper among sled-dogs in northern Greenland. *Arctic Med Res* 48, 195-203.
- Bolt, G., Jensen, T.D., Gottschalck, E., Arctander, P., Appel, M.J., Buckland, R., Blixenkrone-Moller, M., 1997, Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J Gen Virol* 78 (Pt 2), 367-372.
- Bush, M., Montali, R.J., Brownstein, D., James, A.E., Jr., Appel, M.J., 1976, Vaccine-induced canine distemper in a lesser panda. *J Am Vet Med Assoc* 169, 959-960.
- Cabasso, V.J., Cox, H.R., 1952, A distemper-like strain of virus derived from a case of canine encephalitis: its adaptation to the chick embryo and subsequent modification. *Cornell Vet* 42, 96-107.
- Carpenter, J.W., Appel, M.J., Erickson, R.C., Novilla, M.N., 1976, Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *J Am Vet Med Assoc* 169, 961-964.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K., Billeter, M.A., 1989, Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* 56, 759-764.
- Chappuis, G., 1995, Control of canine distemper. *Vet Microbiol* 44, 351-358.

- Cherpillod, P., Tipold, A., Griot-Wenk, M., Cardozo, C., Schmid, I., Fatzer, R., Schobesberger, M., Zurbriggen, R., Bruckner, L., Roch, F., Vandeveld, M., Wittek, R., Zurbriggen, A., 2000, DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine* 18, 2927-2936.
- Cornwell, H.J., Thompson, H., McCandlish, I.A., Macartney, L., Nash, A.S., 1988, Encephalitis in dogs associated with a batch of canine distemper (Rockborn) vaccine. *Vet Rec* 122, 54-59.
- Coyne, M.J., Burr, J.H., Yule, T.D., Harding, M.J., Tresnan, D.B., McGavin, D., 2001, Duration of immunity in dogs after vaccination or naturally acquired infection. *Vet Rec* 149, 509-515.
- Dahl, L., Jensen, T.H., Gottschalck, E., Karlskov-Mortensen, P., Jensen, T.D., Nielsen, L., Andersen, M.K., Buckland, R., Wild, T.F., Blixenkroner-Moller, M., 2004, Immunization with plasmid DNA encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein confers robust protection against a lethal canine distemper virus challenge. *Vaccine* 22, 3642-3648.
- De Paula, S.O., de Melo Lima, C., Torres, M.P., Pereira, M.R., Lopes da Fonseca, B.A., 2004, One-Step RT-PCR protocols improve the rate of dengue diagnosis compared to Two-Step RT-PCR approaches. *J Clin Virol* 30, 297-301.
- De Jong, M.C., Bouma, A., 2001, Herd immunity after vaccination: how to quantify it and how to use it to halt disease. *Vaccine* 19, 2722-2728.
- De Vries, P., Uytdehaag, F.G., Osterhaus, A.D., 1988, Canine distemper virus (CDV) immune-stimulating complexes (Iscoms), but not measles virus iscoms, protect dogs against CDV infection. *J Gen Virol* 69 (Pt 8), 2071-2083.
- Deem, S.L., Spelman, L.H., Yates, R.A., Montali, R.J., 2000, Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *J Zoo Wildl Med* 31, 441-451.
- Di Guardo, G., Marruchella, G., Agrimi, U., Kennedy, S., 2005, Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 52, 88-93.
- Domingo, E., Holland, J.J., 1997, RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 51, 151-178.
- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L., 1997, Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec* 141, 380-383.
- Ek-Kommonen, C., Rudback, E., Anttila, M., Aho, M., Huovilainen, A., 2003, Canine distemper of vaccine origin in European mink, *Mustela lutreola*--a case report. *Vet Microbiol* 92, 289-293.
- Fischer, L., Tronel, J.P., Minke, J., Barzu, S., Baudu, P., Audonnet, J.C., 2003, Vaccination of puppies with a lipid-formulated plasmid vaccine protects against a severe canine distemper virus challenge. *Vaccine* 21, 1099-1102.
- Flynn, J.J., Finarelli, J.A., Zehr, S., Hsu, J., Nedbal, M.A., 2005, Molecular phylogeny of the carnivora (mammalia): assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. *Syst Biol* 54, 317-337.
- Frisk, A.L., Konig, M., Moritz, A., Baumgartner, W., 1999, Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J Clin Microbiol* 37, 3634-3643.
- Gaskin, J.M., 1974, Canine distemper virus in domesticated cats and pigs. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 40, 803-806.

- Gemma, T., Watari, T., Akiyama, K., Miyashita, N., Shin, Y.S., Iwatsuki, K., Kai, C., Mikami, T., 1996, Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J Vet Med Sci* 58, 547-550.
- Gerald, C., Buckland, R., Barker, R., Freeman, G., Wild, T.F., 1986, Measles virus haemagglutinin gene: cloning, complete nucleotide sequence analysis and expression in COS cells. *J Gen Virol* 67 (Pt 12), 2695-2703.
- Griot, C., Moser, C., Cherpillod, P., Bruckner, L., Wittek, R., Zurbriggen, A., Zurbriggen, R., 2004, Early DNA vaccination of puppies against canine distemper in the presence of maternally derived immunity. *Vaccine* 22, 650-654.
- Haas, L., Martens, W., Greiser-Wilke, I., Mamaev, L., Butina, T., Maack, D., Barrett, T., 1997, Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res* 48, 165-171.
- Haas, L., Liermann, H., Harder, T.C., Barrett, T., Lochelt, M., von Messling, V., Baumgartner, W., Greiser-Wilke, I., 1999, Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. *Vet Microbiol* 69, 15-18.
- Haig, D., 1956, Canine distemper immunisation with avianised virus. *Onderstepoort J Vet Res* 27, 19-53.
- Halbrooks, R.D., Swango, L.J., Schnurrenberger, P.R., Mitchell, F.E., Hill, E.P., 1981, Response of gray foxes to modified live-virus canine distemper vaccines. *J Am Vet Med Assoc* 179, 1170-1174.
- Harder, T.C., Osterhaus, A.D., 1997, Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* 5, 120-124.
- Hashimoto, M., Une, Y., Mochizuki, M., 2001, Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. *Arch Virol* 146, 149-155.
- Hirano, A., Wang, A.H., Gombart, A.F., Wong, T.C., 1992, The matrix proteins of neurovirulent subacute sclerosing panencephalitis virus and its acute measles virus progenitor are functionally different. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8745-8749.
- <http://pathmicro.med.sc.edu/mhunt/dna1.htm>, VIROLOGY - CHAPTER THREE.
- Iwatsuki, K., Miyashita, N., Yoshida, E., Gemma, T., Shin, Y.S., Mori, T., Hirayama, N., Kai, C., Mikami, T., 1997, Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J Gen Virol* 78 (Pt 2), 373-380.
- John, T.J., Samuel, R., 2000, Herd immunity and herd effect: new insights and definitions. *Eur J Epidemiol* 16, 601-606.
- Jozwik, A., Frymus, T., 2002, Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49, 413-414.
- Jozwik, A., Frymus, T., 2005, Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet Res Commun* 29, 347-359.
- Kai, C., Ochikubo, F., Okita, M., Iinuma, T., Mikami, T., Kobune, F., Yamanouchi, K., 1993, Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J Vet Med Sci* 55, 1067-1070.
- Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P.D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van de Bildt, M.W., Osterhaus, A.D., Eybatov, T., Duck, C., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Wilson, S., 2000, Mass die-Off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg Infect Dis* 6, 637-639.

- Kim, Y.H., Cho, K.W., Youn, H.Y., Yoo, H.S., Han, H.R., 2001, Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *J Vet Sci* 2, 59-63.
- Kovamees, J., Blixenkrone-Moller, M., Norrby, E., 1991, The nucleotide and predicted amino acid sequence of the attachment protein of canine distemper virus. *Virus Res* 19, 223-233.
- Krakovka, S., Olsen, R., Confer, A., Koestner, A., McCullough, B., 1975, Serologic response to canine distemper viral antigens in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *J Infect Dis* 132, 384-392.
- Krakovka, S., Wallace, A.L., 1979, Lymphocyte-associated immune responses to canine distemper and measles viruses in distemper-infected gnotobiotic dogs. *Am J Vet Res* 40, 669-672.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004, MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150-163.
- Lan, N.T., Yamaguchi, R., Furuya, Y., Inomata, A., Ngamkala, S., Naganobu, K., Kai, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Y., Uchida, K., Tateyama, S., 2005, Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet Microbiol* 110, 197-207.
- Latha, D., Geetha, M., Ramadass, P., Narayanan, R.B., 2007, Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 119, 278-286.
- Lednicky, J.A., Dubach, J., Kinsel, M.J., Meehan, T.P., Bocchetta, M., Hungerford, L.L., Sarich, N.A., Witecki, K.E., Braid, M.D., Pedrak, C., Houde, C.M., 2004, Genetically distant American Canine distemper virus lineages have recently caused epizootics with somewhat different characteristics in raccoons living around a large suburban zoo in the USA. *Virol J* 1, 2.
- Leisewitz, A.L., Carter, A., van Vuuren, M., van Blerk, L., 2001, Canine distemper infections, with special reference to South Africa, with a review of the literature. *J S Afr Vet Assoc* 72, 127-136.
- Liston, P., Briedis, D.J., 1994, Measles virus V protein binds zinc. *Virology* 198, 399-404.
- Lund, G.A., Tyrrell, D.L., Bradley, R.D., Scraba, D.G., 1984, The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids. *J Gen Virol* 65 (Pt 9), 1535-1542.
- Martella, V., Pratelli, A., Cirone, F., Zizzo, N., Decaro, N., Tinelli, A., Foti, M., Buonavoglia, C., 2002, Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy. *Mol Cell Probes* 16, 77-83.
- Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Blixenkrone-Moller, M., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2006, Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Vet Microbiol* 116, 301-309.
- Martella, V., Elia, G., Lucente, M.S., Decaro, N., Lorusso, E., Banyai, K., Blixenkrone-Moller, M., Lan, N.T., Yamaguchi, R., Cirone, F., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2007, Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol* 122, 32-42.

- Martino, P.E., Montenegro, J.L., Preziosi, J.A., Venturini, C., Bacigalupe, D., Stanchi, N.O., Bautista, E.L., 2004, Serological survey of selected pathogens of free-ranging foxes in southern Argentina, 1998--2001. *Rev Sci Tech* 23, 801-806.
- Massé, N., 2004. Étude moléculaire de la glycoprotéine d'attachement du virus de la rougeole: identification et caractérisation des domaines d'interaction avec les récepteurs CD46 et SLAM. Doctorat Université Claude Bernard - Lyon.
- Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hagiwara, S., Yoshida, Y., Ishiguro, S., 1999, Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol* 37, 2936-2942.
- Mori, T., Shin, Y.S., Okita, M., Hirayama, N., Miyashita, N., Gemma, T., Kai, C., Mikami, T., 1994, The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. *J Gen Virol* 75 (Pt 9), 2403-2408.
- Mos, L., Ross, P.S., McIntosh, D., Raverty, S., 2003, Canine distemper virus in river otters in British Columbia as an emergent risk for coastal pinnipeds. *Vet Rec* 152, 237-239.
- Mossong, J., Muller, C.P., 2000, Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. *Epidemiol Infect* 124, 273-278.
- Norrby, E., Utter, G., Orvell, C., Appel, M.J., 1986, Protection against canine distemper virus in dogs after immunization with isolated fusion protein. *J Virol* 58, 536-541.
- Olson, P., Finnsdottir, H., Klingeborn, B., Hedhammar, A., 1997, Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. *Vet Rec* 141, 654-655.
- Organización Panamericana de la Salud 2001. Aislamiento e Identificación del Virus del Sarampión en cultivo de Células. Centro Nacional de Enfermedades Infecciosas. División de Enfermedades Víricas y Rickettsiales. Sección de Virus Respiratorios y Entéricos. Unidad de Virus del Sarampión.
- Ohashi, K., Iwatsuki, K., Nakamura, K., Mikami, T., Kai, C., 1998, Molecular identification of a recent type of canine distemper virus in Japan by restriction fragment length polymorphism. *J Vet Med Sci* 60, 1209-1212.
- Osterhaus, A., 1989, Distemper virus in Baikal seals. *Nature* 338, 209-210.
- Osterhaus, A.D., de Swart, R.L., Vos, H.W., Ross, P.S., Kenter, M.J., Barrett, T., 1995, Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of the genus. *Vet Microbiol* 44, 219-227.
- Pardo, I.D.R., 2006. Phylogenetic characterization of Canine Distemper Viruses detected in naturally infected North American dogs. Master of Science. University of Missouri-Columbia.
- Pardo, M.C., Bauman, J.E., Mackowiak, M., 1997, Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *Am J Vet Res* 58, 833-836.
- Patronek, G.J., Glickman, L.T., Johnson, R., Emerick, T.J., 1995, Canine distemper infection in pet dogs: II. A case-control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. *J Am Anim Hosp Assoc* 31, 230-235.
- Povey, R.C., 1986, Distemper Vaccination of Dogs: Factors Which Could Cause Vaccine Failure. *Can Vet J* 27, 321-323.
- Reed, M.a., 1938, A simpler method of estimating fifty percent end points. *Amer J Hyg* 27, 493-497.

- Rikula, Ulla Kaisa "Canine distemper in Finland – vaccination and epidemiology"
Faculty of Veterinary Medicine -University of Helsinki, Finland. Research Department,
Veterinary Virology. Department of Production Animal Medicine. 29 February 2008.
- Rockborn, G., 1959, An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture.
Nature 184 (Suppl 11), 822.
- Roth, J.A., 1999, Mechanistic bases for adverse vaccine reactions and vaccine failures.
Adv Vet Med 41, 681-700.
- Saito, T.B., Alfieri, A.A., Wosiacki, S.R., Negrao, F.J., Morais, H.S., Alfieri, A.F.,
2006, Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase
chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis.
Res Vet Sci 80, 116-119.
- Sambrook, F., Maniatis, 1989, *Molecular Cloning. A laboratory manual.*
- Scagliarini, A., Battilani, M., Ciulli, S., Prosperi, S., Morganti, L., 2003, Molecular
analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. *Vet Res Commun* 27 Suppl 1,
355-357.
- Schultz, R.D., 2006, Duration of immunity for canine and feline vaccines: a review. *Vet
Microbiol* 117, 75-79.
- Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., Yanagi, Y., 2003, Efficient isolation of wild strains of
canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their
adaptability to marmoset B95a cells. *J Virol* 77, 9943-9950.
- Shek, W.R., Schultz, R.D., Appel, M.J., 1980, Natural and immune cytolysis of canine
distemper virus-infected target cells. *Infect Immun* 28, 724-734.
- Shen, D.T., Gorham, J.R., 1980, Survival of pathogenic distemper virus at 5C and 25C.
Vet Med Small Anim Clin 75, 69-72.
- Shen, D.T., Gorham, J.R., Pedersen, V., 1981, Viruria in dogs infected with canine
distemper. *Vet Med Small Anim Clin* 76, 1175-1177.
- Shin, Y., Mori, T., Okita, M., Gemma, T., Kai, C., Mikami, T., 1995, Detection of
canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood
mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci* 57, 439-445.
- Sixt, N., Cardoso, A., Vallier, A., Fayolle, J., Buckland, R., Wild, T.F., 1998, Canine
distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and
protects against a lethal intracerebral challenge. *J Virol* 72, 8472-8476.
- Soma, T., Ishii, H., Hara, M., Ohe, K., Hagimori, I., Ishikawa, Y., Taneno, A., 2003,
Detection of canine distemper virus antigen in canine serum and its application
to diagnosis. *Vet Rec* 153, 499-501.
- Stephensen, C.B., Welter, J., Thaker, S.R., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E., 1997,
Canine distemper virus (CDV) infection of ferrets as a model for testing
Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDV
recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71, 1506-1513.
- Summers, M.J.G.A.a.B.A. 1999. *Canine Distemper: Current Status* (James A. Baker
Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University,
Ithaca, New York, USA.). www.ivis.org.
- Taylor, J., Pincus, S., Tartaglia, J., Richardson, C., Alkhatib, G., Briedis, D., Appel, M.,
Norton, E., Paoletti, E., 1991, Vaccinia virus recombinants expressing either the
measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine
distemper virus challenge. *J Virol* 65, 4263-4274.
- Tsukiyama, K., Sugiyama, M., Yoshikawa, Y., Yamanouchi, K., 1987, Molecular
cloning and sequence analysis of the rinderpest virus mRNA encoding the
hemagglutinin protein. *Virology* 160, 48-54.

- van de Bildt, M W.G., Kuiken T., Visee, A. M., Lema, S., Fitzjohn T.R., Osterhaus, A.D.M.E., 2002, Distemper Outbreak and Its Effect on African Wild Dog Conservation Emerging infectious diseases Vol. 8, No. 2. www.cdc.gov/Ncidod/EID/vol8no2/01-0314.htm
- van den Hof, S., Meffre, C.M., Conyn-van Spaendonck, M.A., Woonink, F., de Melker, H.E., van Binnendijk, R.S., 2001, Measles outbreak in a community with very low vaccine coverage, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 7, 593-597.
- Visser, I.K., Vedder, E.J., van de Bildt, M.W., Orvell, C., Barrett, T., Osterhaus, A.D., 1992, Canine distemper virus ISCOMs induce protection in harbour seals (*Phoca vitulina*) against phocid distemper but still allow subsequent infection with phocid distemper virus-1. *Vaccine* 10, 435-438.
- von Messling, V., Harder, T.C., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L., 1999, Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol* 37, 1049-1056.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., Cattaneo, R., 2001, The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 75, 6418-6427.
- Webster, A.C., 1975, The adverse effect of environment on the response to distemper vaccination. *Aust Vet J* 51, 488-490.
- Welter, J., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E., Stephensen, C.B., 2000, Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *J Virol* 74, 6358-6367.
- WHO (2007) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/print.html> accessed in September 2007
- Wikipedia, t.f.e. 2008. Henipavirus.

**CAPITULO II: ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL
PARVOVIRUS CANINO**

1. Introducción

Tabla 1: Variaciones aminoacídicas en la VP2 de los diferentes tipos de PVC-2.....8

2. Materiales y Métodos

Tabla 2: Reactividad de los Anticuerpos monoclonales a los diferentes tipos PVC-2 en el test de inhibición de la hemaglutinación.....30

3. Resultados

Tabla 3: Reactividad de los Anticuerpos monoclonales frente a las diferentes cepas Argentinas. Test de Inhibición de la hemoaglutinación. Muestras Daysi, Sandokan y Leg.....36

Tabla 4: Reactividad de los Anticuerpos monoclonales frente a las diferentes cepas Argentinas. Test de Inhibición de la hemoaglutinación. Muestras Gaya, Leg, Simón, Sandokan.....37

Tabla 5: Identificación de los animales en cuyas muestras se detectó PVC.....40

Tabla 6: Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales vacunados y de los animales no vacunados que resultaron positivos para la detección de PVC.....46

Tabla 7: Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales con sintomatología que resultaron positivos ó negativos para PVC.....48

1. Introducción

Figura 1: Esquema del origen y evolución de PVC.....	2
Figura 2: Esquema de la familia Parvoviridae.....	3
Figura 3: Estructura del PVC.....	3
Figura 4: Estructura del ADN de PVC.....	4
Figura 5: Tipos antigénicos de los aislamientos de PVC colectados desde 1978 hasta 1990 de perros clínicamente enfermos de EEUU.....	7
Figura 6: Distribución geográfica actual de las variantes antigénicas de PVC reportadas en Europa.....	9
Figura 7: Vellosidades y microvellosidades intestinales.....	13
Figura 8: Antígeno viral de PVC detectado por inmunofluorescencia.....	17
Figura 9: Partículas de PVC en las heces de un perro infectado.....	18
Figura 10: "Período crítico" para la vacunación contra PVC, debido a la persistencia de los anticuerpos maternos.....	21

2. Materiales y Métodos

Figura 11: Alineamiento nucleotídico de las cepas PVC-2 (CPVd), PVC-2a (CPV15) y PVC-2b (CPV39) y el genoma de VPF.....	25
--	----

3. Resultados

Figura 12: Detección por PCR de un fragmento de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en vacunas comerciales de la República Argentina.....	31
Figura 13: Amplificación por PCR del ADN obtenido de una vacuna comercial, en un gradiente de temperaturas.....	32
Figura 14: Amplificación por PCR del ADN obtenido de una vacuna comercial, (PVC-2) y de una muestra clínica tipificada como PVC-2b en un gradiente de temperaturas.....	32
Figura 15: Determinación del límite de sensibilidad para la detección de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC.....	33
Figura 16: - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 681 pb del gen de la VP2 obtenido para 2 vacunas comerciales junto con la cepa de referencia PVC-2.....	33
Figura 17: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del gen completo de la VP2 obtenido para una vacuna comercial junto con la cepa de referencia PVC-2.....	34
Figura 18: Detección por PCR de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en muestras clínicas de 3 casos de la República Argentina.....	35
Figura 19: Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de 427 pb obtenidos con el par de primers Pb para las cepas Argentinas junto con la secuencia del primer Pb y 3 cepas de referencia.....	38
Figura 20: Detección por PCR del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC en 3 muestras de la República Argentina.....	39
Figura 21: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 427 pb del gen de la VP2 obtenido para 20 cepas Argentinas, junto con 3 cepas de referencia PVC-2, PVC-15 (PVC-2a) y PVC-39 (PVC-2b), tres cepas internacionales de PVC-2c y las	

secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 obtenido para 3 cepas Argentinas.....39

Figura 22: Análisis con la enzima de restricción *MboII* de 3 cepas locales.....41

Figura 23: Alineamiento del fragmento Pab obtenidos para 2 cepas locales, una tipificada como PVC-2a y la otra como PVC-2b, junto con las cepas de referencia, PVC-2, CPV15 (CPV-2a) y CPV39 (PVC-2b).....42

Figura 24: Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos del fragmento de 583 pb obtenido para 2 cepas locales de PVC y tipificadas como PVC-2a.....43

Figura 25: Distribución de las diferentes cepas de PVC entre los años 2002 y 2008.....43

Figura 26: Distribución geográfica de las muestras positivas por PCR.....44

Figura 27: Distribución temporal de las muestras analizadas.....45

Figura 28: Número de perros diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales vacunados y no vacunados.....46

Figura 29: Diagnóstico de animales vacunados con sintomatología clínica de PVC.....47

Figura 30: Porcentaje de perros positivos para PVC por PCR, en los diferentes grupos de edades.....49

Figura 31: Distribución de edades de animales PVC positivos.....49

1.1. Historia del PVC

Las primeras evidencias sobre la existencia de la enteritis viral de los caninos, datan de 1977. Sin embargo, el verdadero interés por la enfermedad surgió en 1978 cuando en los Estados Unidos se empezó a identificar el síndrome, caracterizado por vómito y diarrea hemorrágica severa, el cual tuvo una aparición súbita, causando un fuerte impacto económico en criaderos de perros, debido a las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (Appel et al., 1979). Las primeras investigaciones sugerían la asociación de partículas similares a Parvovirus en la materia fecal de los animales enfermos, y lesiones intestinales muy parecidas a las que se producen en casos de panleucopenia felina.

Durante los 2 años que siguieron a la aparición de este síndrome, se realizaron numerosas investigaciones que demostraron que el agente causal era un parvovirus y que la enfermedad se había diseminado prácticamente en todos los Estados Unidos (Robinson et al., 1979b), (Robinson et al., 1980b). Poco tiempo después, se identificaron brotes de enteritis parvoviral en perros en Canadá, Australia y algunos países de Europa (Robinson et al., 1980b), (Burtonboy et al., 1979). Una serie de estudios realizados en los Estados Unidos, empleando muestras de sueros de perros recolectados en años anteriores a 1978, indicaron que en ninguno de los casos examinados había anticuerpos contra Parvovirus (Carmichael et al., 1980), (Meunier et al., 1981). Asimismo en estudios retrospectivos hechos con sueros de perros que fueron recolectados antes de 1978 en Japón, Australia y Nueva Zelandia, los resultados fueron similares (Jones et al., 1982). Un grupo de investigadores realizó estudios similares en Bélgica, en los que encontraron 3 sueros positivos, de un total de 56 sueros obtenidos entre junio de 1976 y junio de 1977.

En México, Carmichael realizó un estudio en 1978 en el cual encontró anticuerpos contra parvovirus canino (PVC) en sueros de una colonia de perros Beagle, y unos meses después, a principios de 1979, logró el aislamiento de parvovirus a partir de heces de Beagles de la misma colonia. En dicha colonia no se habían observado manifestaciones clínicas de enteritis parvoviral.

Simultáneamente, se identificó otro síndrome en cachorros, caracterizado por muerte súbita, asociada con miocarditis no supurativa (van Rensburg et al., 1979), (Carpenter et al., 1980). Poco tiempo después, se confirmó que el síndrome era causado por el mismo parvovirus responsable del síndrome gastroentérico. Lo anterior ha propiciado

numerosas especulaciones que sugieren que este virus es producto de una mutación que se produjo en el Virus de la Panleucopenia Felina (VPF), ó bien en el virus de la enteritis viral del visón (VEV). Sin embargo, estas teorías no han podido confirmarse por lo que persiste el interrogante respecto del origen de este agente etiológico. En la Figura 1 se observa un esquema de la posible evolución del PVC. Otra hipótesis, es que el PVC emergió de una vacuna de VPF después de su propagación en cultivo de tejidos y que inicialmente, se diseminó con estas vacunas (Truyen, 1999).



Figura 1 - Esquema del origen y evolución de PVC. El PVC emergió de un virus similar al VPF aparentemente de un carnívoro salvaje como podría ser el zorro. Del virus ancestral, los linajes de PVC se desarrollaron en el tipo original PVC-2 siendo el predominante hasta el fin de los años 1970s. Este tipo fue rápidamente reemplazado por los tipos nuevos PVC-2a y PVC-2b que tienen un rango de huésped extendido y se replican ambos, en perros y en gatos. (VPF: virus de la panleucopenia felina; VEV: virus de la enteritis del visón, PVM: parvovirus del mapache; PVC: parvovirus canino) (Truyen, 1999).

1.2. Agente etiológico

El agente causal de la gastroenteritis viral de los caninos es miembro de la familia *Parvoviridae* (Figura 2).



Figura 2 - Esquema de la familia Parvoviridae. Se muestran los diferentes Géneros de la Familia.

Los parvovirus se han aislado a partir de numerosos huéspedes vertebrados tales como bovinos, porcinos, perros, conejos, gansos, visones y gatos.

Los parvovirus, tienen entre 18-26 nm de diámetro, simetría icosaédrica (Figura 3), no poseen envoltura y su genoma está compuesto por ADN lineal monocatenario de aproximadamente 5 Kb. Esta hebra de ADN posee secuencias palindrómicas (de 100 a 300 nucleótidos de longitud) que forman estructuras de horquillas (Figura 4) que son importantes para el inicio de la replicación.

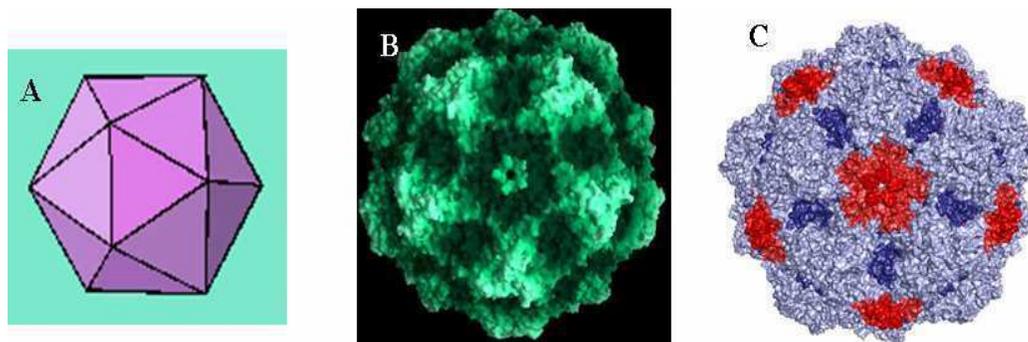


Figura 3 - Estructura del PVC. A: Estructura de un icosaedro. B: cristalografía de rayos X del PVC (Hueffer and Parrish, 2003). C: Estructura de la superficie del PVC. La superficie de la cápside, consiste en regiones de depresiones dobles (azul), regiones de protusiones triples (celeste) y estructuras cilíndricas quintuples (rojo). La figura se realizó con el PyMOL Molecular Graphics System, basado en el análisis de la estructura con una resolución de 2.9 (Paloheimo, 2007).

replicación, de manera que los tumores le ofrecen condiciones favorables para multiplicarse. Por esta misma razón, los fetos ó los animales recién nacidos son sumamente susceptibles a estos virus.

1.3. Entrada y ruta de infección de PVC

La entrada del PVC tiene lugar por endocitosis. Para infectar la célula huésped, se une al receptor de transferrina (RTf) en la superficie celular (Parker et al., 2001). Después de la unión al receptor, el virus es transportado dentro de la célula en vesículas cubiertas de clatrina, vía una ruta endocítica dependiente de dinamina. Si bien las cápsides de PVC co-localizan con la transferrina endocitada (Tf) (Parker and Parrish, 2000), (Hueffer and Parrish, 2003) todavía no se conoce cómo el PVC se libera del receptor. Después de la liberación del receptor de transferrina, PVC atraviesa el citoplasma utilizando microtúbulos del citoesqueleto y se dirige hacia el núcleo donde tienen lugar la replicación del ADN, la expresión génica y el ensamble del parvovirus. El núcleo provee los factores celulares necesarios para la amplificación y transcripción del genoma y para los procesos post-transcripcionales del mRNA.

La cápside de PVC es en teoría lo suficientemente pequeña como para atravesar el complejo del poro nuclear (CPN) sin necesidad que ésta se deforme ó se desensamble (Paloheimo, 2007).

Si bien el PVC tiene como genoma ADN simple cadena y utiliza la maquinaria celular para su replicación, su tasa de sustitución nucleotídica está mas cercana a la de los virus a ARN que a la de los virus de ADN doble cadena (Shackelton et al., 2005).

Se sugiere que la tasa de variación es de 1×10^{-4} a 4×10^{-4} cambios/nt/año (Buonavoglia et al., 2001).

El pH bajo en las vesículas endocíticas induce cambios conformacionales en la cápside viral, que son esenciales para permitir la entrada. El transporte de PVC al área perinuclear, es también dependiente de una temperatura fisiológica y de una red microtubular intacta.

El citoplasma, no permite la libre difusión de moléculas de tamaño mayor a 500 KDa por la presencia de organelas, el citoesqueleto y la alta concentración proteica, es por ello que el movimiento pasivo de los viriones ó de partículas subvirales es virtualmente

imposible, implicando que el tráfico citoplasmático, debe ser un proceso activo (Paloheimo, 2007).

1.4. Aislamiento y evolución del PVC

En 1970, se logró el primer aislamiento de un Parvovirus canino cultivando muestras de hisopos rectales de cuatro perros clínicamente sanos (Binn et al., 1970). Este fue denominado con las siglas MVC (Minute Virus of Canine). Aunque en la actualidad no se ha determinado con exactitud el papel de este agente como causa de procesos patológicos, se considera que es un agente apatogénico y se sabe que es totalmente distinto al PVC responsable de los brotes de enteritis viral que surgieron en 1978 en los Estados Unidos. De manera que en la actualidad se acepta que existen 2 tipos de Parvovirus canino, antigénicamente diferentes: uno de ellos, que no causa enfermedad entérica pero que causa abortos en perras preñadas, conocido como MVC ó parvovirus canino tipo 1, y otro patogénico, llamado también PVC tipo 2 (PVC-2).

El parvovirus canino tipo 2, resulta antigénicamente indiferenciable del VPF. Existe también una fuerte relación antigénica entre el VPF, el PVC y (VEV), que puede ser demostrada mediante pruebas de seroneutralización, y de hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación (Carmichael et al., 1980). Esta correlación antigénica propició el establecimiento de estrategias de inmunización de perros con vacunas preparadas con VPF, poco tiempo después que se identificó la enfermedad, (Chapek et al., 1980).

El VPF tiene más del 99% de identidad de secuencia con el PVC, pero un rango de huésped diferente, (Parrish et al., 1991) no se replica en células caninas *in vitro* y tiene sólo una replicación limitada en perros *in vivo*, sin llegar a establecer una verdadera infección, ni producir enfermedad. Sin embargo, el PVC infecta productivamente tanto líneas celulares caninas como felinas (Paloheimo, 2007).

En el estudio realizado por Parrish et al, se mostró que durante el año 1979, una variante de PVC llamada PVC-2a, se había diseminado por todo el mundo. (Parrish et al., 1985), (Parrish et al., 1988).

Esta cepa, difiere de la PVC-2 en que perdió al menos un epítopo reconocido por un anticuerpo monoclonal, y en que ganó uno nuevo. Para 1981, la cepa PVC-2a era la más frecuentemente aislada de perros domésticos con enfermedad clínica en los Estados

Unidos, Japón, Dinamarca, y Australia y el PVC-2 fue detectado en muy pocas ocasiones después de ese momento (Parrish et al., 1988), (Senda et al., 1988).

La variante del PVC tipo 2b (PVC-2b) apareció alrededor del año 1984.

La Figura 5, muestra la evolución del PVC a través de los años, en Estados Unidos.

	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990
CPV- type 2	a, b, 12 16, 17	d, 9, 10 18, 19, 20 89, 90, 91	c, 21, 22 59, 60, 63	103, 104				48			165, 167		
CPV- type 2a		e	92, 93, 97 98, 105	13, 23, 24 43, 44, 45 46, 47, 100 101, 102	25, 26	14, 27, 29 30, 31, 32 33	15, 34, 35 37, 38, 40	61, 69, 70	72, 73, 74		164, 171		177, 130
CPV- type 2b							36, 39			106	108, 159, 160 161, 163, 166 168, 169, 170 172	129, 132	126, 127, 131 133, 173, 174 180, 182, 183 184

Figura 5 - Tipos antigénicos de los aislamientos de PVC colectados desde 1978 hasta 1990 de perros clínicamente enfermos de EEUU. La tipificación se realizó con un panel de anticuerpos monoclonales. Los números en los cuadrados indican diferentes aislamientos (Parrish et al., 1991).

Estas nuevas variantes virales (PVC-2a y PVC-2b), podrían resultar de una adaptación de los nuevos virus a su huésped, pero estas variantes muestran también un rango de huésped mayor. Si bien PVC-2 no replica en gatos, ambas variantes lo hacen eficientemente (Truyen, 1999).

Por otro lado, PVC-2a y PVC-2b, son liberadas en mayores títulos (determinados por HA) en materia fecal respecto de la cepa original PVC-2 (Carmichael, 1994).

Actualmente, la cepa original PVC-2, como se mencionó anteriormente, no circula más en la población canina mientras que las variantes PVC-2a y PVC-2b están distribuidas en todo el mundo (Mochizuki et al., 1993), (de Ybanez et al., 1995), (Greenwood et al., 1996), (Truyen et al., 1996), (Sagazio et al., 1998), (Buonavoglia et al., 2000), (Pereira et al., 2000).

Luego de la aparición y rápida diseminación de las variantes PVC-2a y PVC-2b, hubo poca evidencia respecto de la evolución antigénica: salvo pocas excepciones, los análisis de las cepas de PVC aisladas de gatos domésticos ó salvajes y de caninos, mostraron que hasta el año 2000 ambos tipos PVC-2a y PVC-2b retuvieron su configuración antigénica definida originalmente.

Sin embargo, a partir del año 2000, se empezó a detectar en Italia, una variante antigénica de PVC inusual (Buonavoglia et al., 2001). Esta variante, tiene una sustitución aminoacídica de un ácido Aspático (Asp) por un ácido Glutámico (Glu) en la posición 426 (Desario et al., 2005).

El aminoácido 426, está localizado en el sitio antigénico más importante de PVC (epitope A), sobre la triple espiga de la cápside. La mutación de Asn-426-Asp permite diferenciar a la cepa PVC-2b de los tipos PVC-2 y PVC-2a, pero también del VPF y del VEV. Contrariamente, el residuo 555 se encuentra en un sitio antigénico menos importante y el cambio en esta posición de una Isoleucina (Ile) a Valina (Val) representa una reversión ó una retención de la secuencia del tipo original PVC-2 (Buonavoglia et al., 2001).

La variante PVC-2 Glu426 fue descrita por primera vez en Italia (Martella et al., 2004) y luego detectada en Vietnam, (Nakamura et al., 2004), España (Decaro et al., 2006a), Reino Unido, Portugal, Alemania, (Decaro et al., 2007a), EEUU (Kapil et al., 2007), (Hong et al., 2007) y Uruguay (Perez et al., 2007).

La Tabla 1 muestra las variaciones aminoacídicas de la Vp2, en las diferentes cepas de PVC.

			Cambios aminoacídicos						
			101	297	300	305	375	426	555
Posiciones nucleotídicas			3087–3089	3675–3677	3684–3686	3699–3701	3909–3911	4062–4064 ^b	4449–4451 ^b
Codones observados			ATT (Ile) ACT (Thr)	TCT (Ser) GCT (Ala)	GCT (Ala) GGT (Gly)	GAT (Asp) TAT (Tyr)	AAT (Asn) GAT (Asp)	AAT (Asn) GAT (Asp) GAA (Glu)	GTA (Val) ATA (Ile)
CPV-2	CPV-b	U.S., 1978	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val
	CPV-Norden	U.S., 1978	Ile	Ser	Ala	Asp	Asp	Asn	Val
CPV-2a	CPV-15	U.S., 1984	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asn	Ile
	CPV-31	U.S., 1983	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asn	Ile
CPV-2b	CPV-39	U.S., 1984	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
	CPV-33	U.S., 1990	Thr	Ser	Gly	Tyr	Asp	Asp	Val
CPV-2 Glu-426	136/00	Italy, 2000	ND	Ala	Gly	Tyr	Asp	Glu	Val
	56/00	Italy, 2000	ND	Ala	Gly	Tyr	Asp	Glu	Val

Tabla 1 - Variaciones aminoacídicas en la VP2 de los diferentes tipos de PVC-2 (Desario et al., 2005). Se observan los codones y aminoácidos que cambian de una cepa respecto a la otra.

1.5. Distribución Europea de PVC

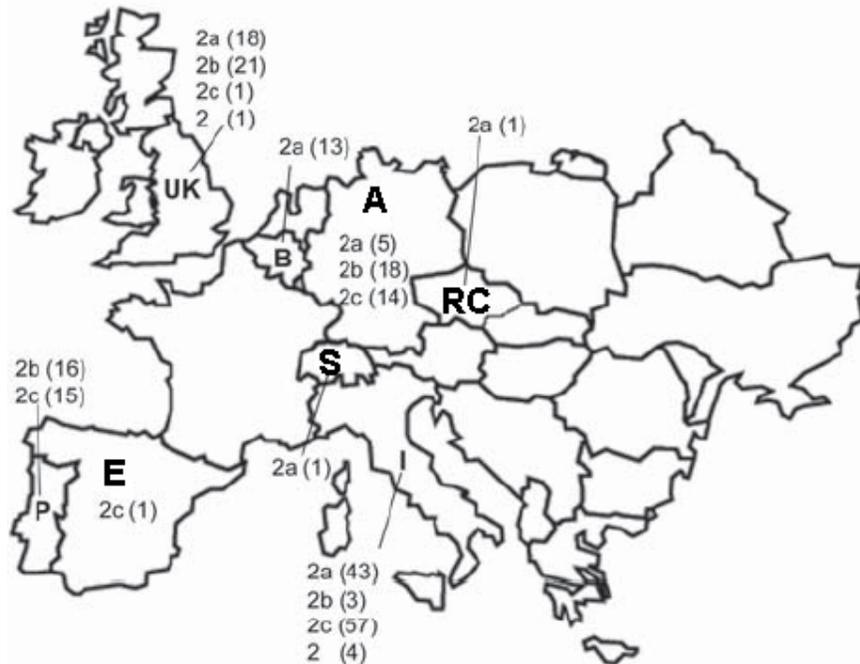


Figura 6 - Distribución geográfica actual de las variantes antigénicas de PVC reportadas en Europa. Muestras fecales positivas para PVC ó aislamientos virales provenientes de diferentes países analizados por métodos moleculares. Las cepas PVC-2, 2a, 2b y 2c están indicadas para cada país con números entre paréntesis. Las muestras fueron colectadas durante el 2005 al 2006, excepto por muestras de Alemania 1996–2005.

P, Portugal; E, España; UK, United Kingdom (Reino Unido); B, Bélgica; S, Suiza, A, Alemania; RC, República Checa (Decaro et al., 2007a).

1.6. Animales susceptibles

La capacidad del parvovirus canino de causar enfermedad parece estar limitada a la especie canina. Existen publicaciones que fundamentan la enfermedad en el perro doméstico (*Canis familiaris*), coyotes (*Canis latrans*), algunas variedades de zorros (*Cerdocyon thous* y *Alopex lagopus*), incluyendo al zorro azul, así como a ciertas variedades de lobos (*Chrysocyon bracyurus*) (Chapek et al., 1980).

Con respecto a los perros domésticos, se cree que algunas razas como los Rottweilers, Doberman Pinschers, Labrador Retrievers y Pit bull terriers pueden ser más susceptibles a PVC.

Se ha demostrado que la inoculación del PVC en los gatos domésticos (*Felis domesticus*), puede dar origen a una infección, pero esta es autolimitante y no genera

enfermedad. Se produce una ligera replicación viral en los órganos linfoides y el virus es eliminado en corto tiempo (Parrish et al., 1984).

Un grupo de investigadores publicó un artículo en el que sugería que el PVC era capaz de producir enfermedad en mapaches (*Procyon lotor*) (Nettles et al., 1980). Sin embargo, otros investigadores, han demostrado que el agente causal de tal enfermedad no era PVC sino que se trataba de otro parvovirus propio de los mapaches que posee variedades antigénicas que producen reacciones cruzadas con el PVC y con el VPF.

En lo referente a la capacidad del PVC de producir una infección en Mustélidos, algunos trabajos publicados, señalan que estos no son susceptibles. La exposición oral con materia fecal conteniendo PVC, no produjo una seroconversión, ni ocasionó manifestaciones clínicas en hurones (*Mustela luro*). De igual manera, la exposición de los visones (*Mustela vison*) con PVC, no originó una verdadera infección en estos animales (Parrish et al., 1984).

1.7. Transmisión y patogénesis

La principal vía de infección es oral. Numerosos estudios, demuestran que la exposición oral de perros susceptibles a materia fecal contaminada, ó bien a filtrados de cultivos de tejidos conteniendo PVC, da como resultado el cuadro clínico característico (Robinson et al., 1980b), (O'Sullivan et al., 1984). El cuadro clínico puede reproducirse experimentalmente, al inocular perros por vía oronasal, nasal, intramuscular, intravenosa y subcutánea (Robinson et al., 1980b), (Appel et al., 1979), (Pollock, 1982), (McAdaragh et al., 1982) (Flores Castro, 1987).

Aún no se conoce si la infección natural puede ocurrir por vías diferentes a la oral. Se desconoce también la dosis mínima infecciosa.

Los animales infectados eliminan el virus en las heces, habiéndose demostrado que durante la fase aguda de la enfermedad, se llegan a alcanzar títulos de hasta 10^9 viriones infecciosos por gramo de materia fecal (Pollock, 1982). Es probable que durante la fase de viremia, el virus sea eliminado también en algunas secreciones.

La eliminación del virus en las heces de perros infectados ocurre durante aproximadamente dos semanas, a partir del tercer día posterior a la infección experimental por vía oral. En algunos casos la fase de eliminación puede prolongarse

hasta por 25 días después que ha ocurrido la infección, (Pollock, 1982), (Carmichael et al., 1981), de manera que la amplia diseminación de la enfermedad parece deberse más al hecho que el virus es sumamente resistente a factores ambientales, que a la diseminación por perros crónicamente infectados (Pollock, 1982), (Pollock and Carmichael, 1979), (Carmichael et al., 1981). Se ha demostrado que el PVC mantuvo su capacidad infectante después de haber permanecido en muestras de materia fecal durante 6 meses a temperatura ambiente (Pollock, 1982). Además de la transmisión mediante materia fecal, existen evidencias de transmisión a través de fomites (objetos en contacto con el animal enfermo ó portador, que pueden estar contaminados y transmitir agentes infecciosos) (Studdert et al., 1983), (Merickel et al., 1980).

El PVC es sumamente resistente a los cambios bruscos de temperatura y pH, al éter, al cloroformo y a la acción de los desinfectantes comunes, por lo que las infecciones se diseminan con facilidad, persistiendo por tiempo prolongado en áreas contaminadas. El PVC es sensible a la acción del formol en concentración 1:30 (Scott, 1980).

El PVC es linfocitotrópico, de manera que al entrar al organismo tiende a invadir tejido linfoide de la región bucofaríngea y los ganglios linfáticos mesentéricos.

Posteriormente la infección se generaliza a consecuencia de una fase de viremia aproximadamente 12 horas después de la infección. Es entonces cuando el virus está presente en prácticamente todos los tejidos, incluyendo órganos conteniendo células en rápida división, como la médula ósea y células del epitelio intestinal (Pollock, 1982), (McAdaragh et al., 1982).

Los signos clínicos suelen aparecer poco tiempo después de que se ha iniciado la eliminación del virus en las heces y el título del agente en materia fecal se va incrementando durante los 2 ó 3 días siguientes, lo que coincide con los días en que el animal presenta el cuadro clínico más evidente.

A partir del octavo día, la cantidad de virus presente en las heces empieza a declinar desapareciendo a partir de la segunda semana posterior a la infección. Es factible que la ausencia de virus en materia fecal se deba a que para entonces ya han aparecido niveles suficientes de inmunoglobulinas específicas a nivel intestinal (Rice et al., 1982).

1.8. Signos Clínicos

La infección por PVC en perros puede dar origen a dos formas clínicas diferentes, una de carácter entérico y una forma cardíaca ó miocárdica.

La mortalidad es superior en la forma cardíaca. En la forma entérica, algunos animales llegan a recuperarse, aún sin tratamientos.

1.8.1. Forma entérica

Esta forma clínica puede producirse en perros de cualquier edad. Los signos clínicos más comunes son: vómitos y diarrea, que en la mayoría de los casos es de color grisáceo y frecuentemente hemorrágica. Al inicio de la enfermedad hay depresión, anorexia y fiebre; la diarrea se hace aparente durante las 6 a 24 horas siguientes a la aparición de los primeros indicios de enfermedad. El vómito puede ocurrir simultáneamente con la presentación de la diarrea; sin embargo, en numerosos casos puede estar ausente.

La diarrea propicia un cuadro de deshidratación severa, la cual es más frecuente en los casos en que la diarrea es hemorrágica (Flores Castro, 1987).

Las células de las vellosidades intestinales, tienen una vida media relativamente corta y son rápidamente reemplazadas por nuevas células. La fuente de las células nuevas es una zona de activa división celular en la base de las vellosidades llamada cripta de Lieberkuhn. Es ahí donde el PVC ataca, impidiendo la salida de las nuevas células de la cripta, importantes para la reestructuración de las vellosidades e impidiendo la correcta absorción de los nutrientes.

Aquellos animales en los que no hay hemorragia, tienen más probabilidad de sobrevivir que aquellos en los que se produce el cuadro hemorrágico, independientemente de que se aplique ó no algún tipo de terapia. La muerte suele estar asociada a estados severos de deshidratación (O'Sullivan et al., 1984), (Pollock and Carmichael, 1979) (Flores Castro, 1987).

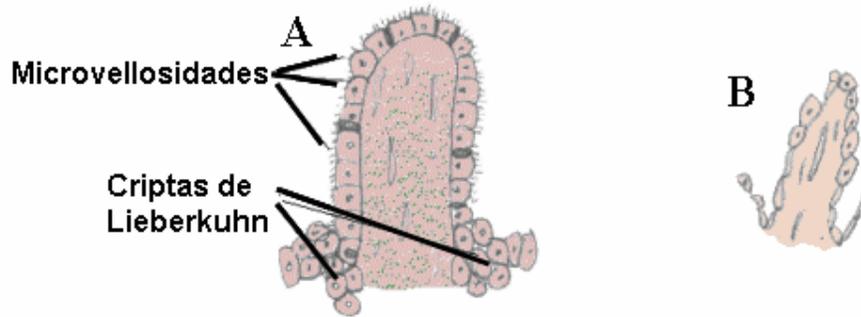


Figura 7 - Vellosidades y microvellosidades intestinales. A: células normales. B: células afectadas por PVC (Brooks, 2008).

En la Figura 7, se muestra un dibujo de la estructura de las vellosidades y microvellosidades intestinales normales (Figura 7 A), y vellosidades afectadas por PVC. (Figura 7 B)

Es posible identificar, en perros clínicamente afectados, cierto grado de leucopenia. En la médula ósea, el virus es responsable de la destrucción de las células del sistema inmune, lo cual produce una disminución en el conteo de células blancas.

En aquellos animales en los que la leucopenia es más marcada, es mayor la severidad de la infección.

1.8.2. Forma cardiaca

Esta forma de presentación de la parvovirus en perros, se ha diagnosticado solamente en cachorros menores de 12 semanas de edad.

La forma cardiaca se produce con una tasa de mortalidad superior al 50% en camadas afectadas. Los miembros de la camada que logran sobrevivir, son animales aparentemente normales, pero al practicar en ellos electrocardiogramas, se pueden identificar indicios de miocarditis, (Robinson et al., 1980a), (Robinson et al., 1979a) que por lo general, ocurre aún en ausencia de signos de enteritis, ó bien puede manifestarse de 3 a 6 semanas después de que los animales se han recuperado del cuadro entérico (Carpenter et al., 1980), (Hayes et al., 1979), (Lenghaus and Studdert, 1982), (Robinson et al., 1980a), (Flores Castro, 1987).

Los cachorros muestran postración y dolor; a la auscultación se pueden identificar arritmias cardíacas, disnea e incluso edema pulmonar.

Es común encontrar al cachorro muerto sin que se haya manifestado signo alguno de enfermedad. En ocasiones la muerte se produce pocas horas después de diagnosticar el padecimiento, independientemente que se aplique ó no algún tratamiento.

La muerte se produce a consecuencia de fallas en la conducción de impulsos nerviosos a nivel de miocardio (Carpenter et al., 1980).

1.9. Patología

Los ganglios linfáticos mesentéricos se encuentran frecuentemente aumentados de tamaño y edematosos (Nelson et al., 1979).

En la médula ósea se produce necrosis y por consiguiente se reduce notablemente la población de células precursoras y células maduras de la series mieloides y eritroides.

En la forma entérica, se producen alteraciones en la capacidad de absorción intestinal, provocando problemas de indigestión (Nelson et al., 1979). Las deficiencias de absorción del epitelio intestinal, debido a la descamación, propician cambios de permeabilidad y favorece la aparición de diarrea.

La deshidratación, ocasiona un desbalance electrolítico, que puede ocasionar paro cardíaco y muerte. Otros factores que podrían estar involucrados como causas de la muerte, son las endotoxinas de bacterias Gram negativas que al pasar a través de las mucosas lesionadas pueden causar un shock endotóxico. Por último, es probable que se produzcan septicemias de carácter secundario que pongan en riesgo la vida del animal (Flores Castro, 1987).

1.10. Diagnóstico

1.10.1. Diagnóstico clínico

Es evidente que las manifestaciones clínicas de la infección por PVC, por ser tan variables, no siempre permiten establecer un diagnóstico confiable. Por lo general, el diagnóstico clínico es de carácter presuntivo y permite al veterinario iniciar una terapia de sostén, sin embargo, existen otros procesos patológicos que podrían presentar un cuadro clínico parecido al de la enteritis por PVC, y que hay que tenerlos en cuenta para el diagnóstico diferencial.

Entre los más importantes se incluyen las infecciones por Coronavirus, Virus Distemper Canino (VDC), hepatitis, gastroenteritis hemorrágica, enteritis parasitarias e infecciones bacterianas.

1.10.2. Diagnóstico diferencial

Una de las infecciones virales que más se asemeja a la enteritis por PVC, es la enteritis causada por Coronavirus; sin embargo, se considera en términos generales que esta última sigue un curso menos severo que la infección por PVC, siendo menores los porcentajes de mortalidad.

La infección de cachorros con el virus de VDC frecuentemente se asocia a un cuadro entérico, que se manifiesta con diarreas, sin embargo, suele incluir además, problemas respiratorios y/o, nerviosos que permiten la diferenciación de otras formas de enteritis viral (Appel et al., 1979).

Las enteritis de origen parasitario deben considerarse en el diagnóstico diferencial, especialmente en cachorros jóvenes; la coccidiosis y la presencia de *Ancylostoma spp.* suelen producir enteritis severas. Otros Nematodos podrían también ocasionar cuadros parecidos a la enteritis por PVC. En ocasiones los cachorros pueden padecer simultáneamente enteritis por PVC y una parasitosis intestinal. El laboratorio es de gran utilidad para establecer el diagnóstico.

1.10.3. Diagnóstico de laboratorio

Son numerosos los métodos utilizados en los laboratorios para establecer el diagnóstico de PVC. A continuación se hace una breve descripción de cada uno de ellos:

1.10.3.1. Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación (HA-IHA)

El PVC es capaz de aglutinar a los glóbulos rojos de cerdo, de manera que para determinar la presencia de parvovirus en heces, se centrifugan suspensiones de materia fecal y con el sobrenadante se hacen diluciones; a cada dilución se le añaden eritrocitos de cerdo; con este procedimiento es posible establecer el título hemoaglutinante del virus de la muestra. Posteriormente, se inhibe tal reacción, repitiendo la prueba en presencia de suero anti-PVC. Esta prueba es de utilidad durante la fase activa de eliminación del PVC en heces, lo que ocurre durante las 2 semanas siguientes a la infección.

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación puede emplearse también para identificar la presencia de anticuerpos en el suero de perros, utilizando un PVC de título conocido y glóbulos rojos de cerdo. El título del suero será la mayor dilución del mismo capaz de inhibir la aglutinación de los eritrocitos porcinos, por parte del PVC (Carmichael et al., 1980).

Es probable encontrar anticuerpos específicos en perros que han estado en contacto previo con el virus, ya sea porque fueron vacunados, ó tal vez porque sufrieron una infección a la cual sobrevivieron; así, la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en el suero de un perro no constituye en sí un diagnóstico definitivo.

Además, para esta técnica, son necesarios eritrocitos frescos y de buena calidad, ya que el resultado de la misma, se ve afectado por la alteración del coeficiente de sedimentación de los eritrocitos (esto ocurre si el cerdo donante esta enfermo ó estresado) (Desario et al., 2005).

1.10.3.2. Neutralización

Esta prueba ofrece resultados equivalentes a las pruebas de HA e IHA, sin embargo, se requiere una mayor infraestructura para su realización, puesto que se utilizan cultivos de tejidos. Por su parte, es una prueba que necesita varios días, por lo que no se utiliza como técnica de rutina (Carmichael et al., 1980).

1.10.3.3. Técnica de Inmunofluorescencia

Este procedimiento se utiliza en muchos laboratorios para determinar la posible presencia de partículas virales en tejidos de animales (Figura 8).

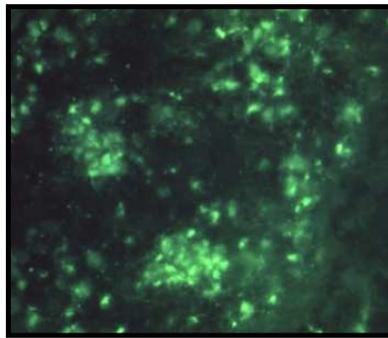


Figura 8 - Antígeno viral de PVC detectado por inmunofluorescencia. Se observa el nódulo linfático mesentérico, 4 días después de la infección oro-nasal. (Truyen, 2000)

Esta técnica, también se utiliza para establecer si existen anticuerpos específicos en el suero de un animal sospechoso (Hayes et al., 1979).

1.10.3.4. Aislamiento de Parvovirus

El diagnóstico definitivo de parvovirus se puede lograr mediante el aislamiento del virus, utilizando para ello varias líneas celulares e incluso cultivos primarios de células de diferentes tejidos entre los que se encuentran: células de riñón de perro (MDCK) y células de riñón de gato (CRFK). El virus se puede aislar a partir de heces de perros infectados, durante las 2 semanas siguientes a la infección.

El aislamiento de PVC a partir de heces ha sido descrito por numerosos autores (Carmichael et al., 1980), (Appel et al., 1979), lo mismo que el aislamiento a partir de miocardio (Robinson et al., 1980b), (Hayes et al., 1979). Este método diagnóstico es sin duda el más preciso, pero resulta costoso y delicado, por lo que no se emplea rutinariamente.

1.10.3.5. Microscopía electrónica

La observación de suspensiones de materia fecal mediante microscopía electrónica, permite identificar las partículas de virus cuando las mismas están siendo eliminadas en heces. Con este método es factible diferenciar con facilidad entre PVC, Coronavirus y Rotavirus.

En la Figura 9, se observan partículas de PVC en materia fecal por microscopía electrónica.

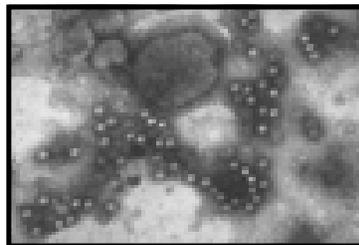


Figura 9 - Partículas de PVC en las heces de un perro infectado. Caso de campo. (Foto micrografía electrónica X 30.000) (Truyen, 2000).

1.10.3.6. PCR

Aunque, la vacunación con vacunas vivas modificadas, dentro de los 14 días, puede causar falsos positivos, (www.antechdiagnostics.com), la reacción de PCR se caracteriza por la alta sensibilidad, especificidad y rapidez, y se ha utilizado ampliamente para detectar PVC en materia fecal (Pereira et al., 2000), (Costa et al., 2005), (Decaro et al., 2005c), (Zkul et al), (Senda et al., 1995).

1.11. Tratamiento Sintomático

No existen productos que actúen específicamente en contra del PVC, por lo que el tratamiento se recomienda como medida auxiliar para contrarrestar los efectos de la deshidratación y evitar la aparición de infecciones secundarias causadas por bacterias. Tan pronto como se identifica el problema, es necesario administrar una terapia a base de líquidos. La vía de administración más recomendable es la intravenosa porque la vía oral, suele ser inadecuada ya que el vómito, expulsa los líquidos administrados con fines terapéuticos.

La administración de antibióticos se recomienda para prevenir la presentación de infecciones secundarias. La ampicilina es el antibiótico de elección. Otros tratamientos incluyen gentamicina ó cefalosporinas.

1.12. Respuesta inmunológica e inmunización

1.12.1. Respuesta a la infección

En los sueros de la mayoría de los perros, aparecen anticuerpos específicos contra PVC casi al mismo tiempo que se hacen evidentes los signos clínicos; los títulos se incrementan rápidamente durante el curso de la enfermedad, permaneciendo a niveles elevados durante aproximadamente 2 años. Al exponer perros susceptibles por vía oral y nasal, Pollock y Carmichael (Pollock and Carmichael, 1983) observaron que los máximos niveles de anticuerpos se alcanzaron entre los 3 y 6 días siguientes a la exposición. Al tratar los sueros de estos animales con 2-mercaptoetanol, se observó una considerable reducción en los títulos de anticuerpos (por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación) en los sueros que fueron colectados entre la tercera y la cuarta semana posterior a la exposición; esto, sugiere fuertemente que en este período predominaron los anticuerpos de la clase IgM; por otro lado los sueros colectados después de la 6ta semana, no sufrieron modificación respecto al título de inhibición de la hemoaglutinación, después del tratamiento con el 2-mercaptoetanol.

Se supone que la mayoría de los animales que logran recuperarse de una infección quedan inmunes de por vida, pero esto aún no está confirmado.

La mayoría de los perros que tienen títulos bajos de anticuerpos séricos, al ser desafiados experimentalmente, no desarrollan una enfermedad clínica; sin embargo, eliminan activamente el virus patógeno en las heces. Esto sugiere que los títulos bajos confieren protección contra la enfermedad, pero no evitan que se continúe diseminando el agente causal, lo que representa serios riesgos en áreas en donde se congregan numerosos perros, como criaderos y clínicas veterinarias.

1.12.2. Inmunización

Existen vacunas efectivas para la prevención de la infección por PVC-2. Tanto las vacunas vivas como las inactivadas demostraron tener capacidad de inmunizar cachorros eficientemente. Las vacunas inactivadas, sin embargo, sólo proveen inmunidad a corto plazo. Si bien los perros pueden estar protegidos por varios meses, pueden presentar enfermedades subclínicas. Por otro lado, las vacunas vivas modificadas han mostrado proteger a los animales por al menos 2 ó 3 años (Pratelli et al., 2001).

1.12.2.1. Vacunas vivas atenuadas de PVC

Las vacunas atenuadas de parvovirus derivan de cepas patógenas, que a través de numerosos pasajes en cultivos celulares, sufrieron una considerable reducción de su virulencia.

Es común que la cepa vacunal sea eliminada en las heces de los animales vacunados; pero esto ocurre por períodos cortos y con títulos de virus muy bajos.

Es posible identificar anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación 3 ó 4 días después de aplicar este tipo de vacunas, aún cuando el número de partículas virales contenidas en la dosis vacunal resulte bajo.

No se han observado indicios de una posible reversión a la virulencia en ninguna de las cepas que se utilizan para elaborar vacunas vivas con fines comerciales.

La eficacia de las vacunas vivas de origen canino, para prevenir la infección natural del parvovirus en más de 6 mil perros estudiados por Carmichael y sus colaboradores (Carmichael et al., 1983), fue mayor al 98% en animales que eran seronegativos al momento de la vacunación; sin embargo, sólo alcanzó 50% de efectividad cuando se vacunaron animales con cierto grado de anticuerpos maternos (títulos de 1:10 a 1:20).

1.12.2.2. Los anticuerpos maternos y su interferencia con la vacunación

Durante la ingestión del calostro, los cachorros nacidos de perras inmunes contra parvovirus ingieren cantidades suficientes de anticuerpos específicos contra este agente, de manera que llegan a tener títulos de anticuerpos séricos casi equivalentes a los de la madre.

Esta inmunidad pasiva tiene una duración que varía entre 5 y 12 semanas de manera que los cachorros se tornan susceptibles conforme esta inmunidad va desapareciendo (Figura 10).

En esta fase, cuando los anticuerpos maternos son insuficientes para prevenir la infección, los cachorros entran en lo que se denomina “período crítico”, puesto que la presencia de anticuerpos maternos si bien no protege contra la enfermedad, sí, es capaz de bloquear la inmunización activa que se pretende lograr mediante la vacunación. Este período crítico puede durar entre 2 y 4 semanas dependiendo de los niveles de anticuerpos maternos existentes en el cachorro. La mayoría de los casos de fallas vacunales en cachorros, tiene su origen y es consecuencia de la interferencia causada por los anticuerpos maternos (Pollock and Carmichael, 1983), (Pollock and Carmichael, 1982).

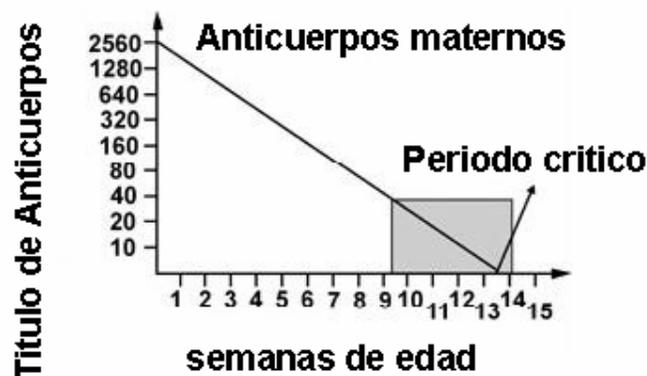


Figura 10- "Período crítico" para la vacunación contra PVC, debido a la persistencia de los anticuerpos maternos. Títulos inferiores a 1:40 brindan un grado de protección variable, pero pueden interferir con la vacunación.

Esta situación, crea un conflicto respecto a la edad en la que se recomienda vacunar a los cachorros. No existen datos definitivos; pero se sabe que la duración de la inmunidad materna en los cachorros, está estrechamente vinculada con los niveles de anticuerpos de la madre, de manera que en hembras con bajos títulos, el periodo crítico de los cachorros, ocurre más temprano. Lo contrario se produce en casos de cachorros nacidos de hembras con niveles elevados de anticuerpos.

Un criterio utilizado en términos generales, sugiere que en aquellos casos en los que los cachorros procedan de perras no vacunadas, la inmunización debe realizarse entre la 8va y la décima semana de edad, mientras que los cachorros procedentes de hembras vacunadas deben inmunizarse a partir de la 12ava semana.

2.1. Vacunas comerciales y muestras clínicas

Se reconstituyeron en esterilidad, siguiendo instrucciones de los fabricantes, 3 vacunas comerciales contra PVC, disponibles en la Argentina. Las mismas son: Vanguard® Plus CPV de Pfizer (Vac 1), Duramune® Max 5 (VDC- Adenovirus tipo 2- Parainfluenza- PVC) de Fort Dodge (Vac 2), y la vacuna séxtuple del laboratorio Paul (Vac 3), (Moquillo- Hepatitis- Tos de las perreras- Parainfluenza- PVC- Coronavirus) que son vacunas a virus vivo modificado.

Por otro lado, entre los años 2002 y 2008 se obtuvieron 43 muestras (hisopados rectales, ó materia fecal y/ó sangre) de perros domésticos con sintomatología compatible con PVC. Las muestras provinieron de animales de la Ciudad de Buenos Aires y alrededores, y de Mar del Plata, Tandil, Bahía Blanca y Río Negro.

Como en el caso del diagnóstico de VDC, se solicitó a los veterinarios, (que eran las personas que tomaban las muestras y los intermediarios entre los pacientes y nuestro laboratorio); que remitieran al laboratorio junto con la muestra, una breve historia clínica del animal con datos epidemiológicos. En la mayoría de los casos analizados, pudo obtenerse información relevante acerca de los animales cuyas muestras fueron analizadas. Con la información general y específica, se creó una base de datos.

Además, se analizaron 4 muestras gentilmente cedidas por Danilo Bucafusco, Médico Veterinario del Área de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires.

2.2. Técnicas de Biología Molecular aplicadas a cepas vacunales y muestras clínicas

2.2.1. Extracción de ADN de PVC

Se realizaron pruebas de extracción de ADN con kits comerciales, y se determinó que la mejor relación costo-beneficio al momento de poner a punto el método diagnóstico, fue la de extraer el ADN con buffer de lisis (50mM Tris HCl pH 8, 100 mM NaCl, 25 mM Sacarosa, 10 mM EDTA, 1% SDS) y fenol-cloroformo luego de la preincubación de las muestras a 56 °C durante una hora con proteinasa K (100 ug/ml).

Además, se definió al hisopado rectal como el material de partida más adecuado para la detección de PVC por PCR en animales enfermos.

2.2.2. Detección por PCR de 2 fragmentos del gen de la VP2 de PVC

Se amplificaron por PCR, fragmentos de 681 y 427 pb correspondientes a la región variable del gen de la VP2 de PVC.

Los oligonucleótidos iniciadores (primers) diferenciales, fueron diseñados por Pereira et al. (Pereira et al., 2000) (P2 y Pb) teniendo en cuenta las secuencias de las cepas PVC-2, PVC-2a y PVC-2b.

Los primers Pab fueron descritos en el trabajo de Senda et al (Senda et al., 1995).

Los primers, Pabs/Pabas y P2s/P2as que reconocen las variantes (PVC-2a – PVC-2b) y la cepa original (PVC-2) respectivamente, fueron seleccionados en posiciones superpuestas (3025-3045 para Pabs y P2s; 3685-3706 para Pabas y P2as). La diferencia en las secuencias nucleotídicas entre los primers, está restringida a una base en el extremo 3' de cada primer. Como los productos de PCR resultan del mismo tamaño, los primers se utilizan en reacciones separadas.

El par de primers Pb/Pbas (4043-4062 y 4449-4470) reconoce al tipo PVC-2b selectivamente. La amplificación diferencial del tipo PVC-2b se asegura por la variación de un único nucleótido en el extremo 3' de cada primer, y estas variaciones (A→G en el 4062 y de una G→A en 4449) corresponden a cambios aminoacídicos estratégicos de Asn-426 a Asp y de Ile-555 a Val que determina la variación antigénica del tipo PVC-2a al tipo PVC-2b (Buonavoglia et al., 2001), con lo cual la falta de amplificación por PCR con el par de primers Pb, sugiere la presencia de la cepa PVC-2a en una muestra determinada.

Se realizaron pruebas en donde se optimizó la temperatura de unión de los oligonucleótidos al templado; la cantidad y la duración de los ciclos de desnaturalización y extensión y la concentración de MgCl₂.

Las condiciones elegidas fueron las siguientes: en un volumen de reacción de 30 µl; se agregan 2 µl del ADN a una mezcla conteniendo: 50 pmoles de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 unidades de la Taq DNA Polimerasa, Recombinante de Invitrogen®.

El ciclado se realizó de la siguiente manera: 5 minutos a 95 °C, luego el proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó 30 veces con 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 60 °C y 1 minuto a 72 °C.

Cada muestra clínica, se analizó con los 3 juegos de oligonucleótidos iniciadores (P2, Pab, Pb) en 3 reacciones separadas, para poder determinar la cepa viral con la que fue infectado el animal. Como controles se utilizaron vacunas comercialmente disponibles.

La reacción de amplificación con los primers siguientes, detecta la presencia de la cepa PVC-2:

P2 5'GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATA A 3' sense y

P2 5'CCT ATA TCA CCA AAG TTA GTA G 3' antisense,

La reacción de amplificación con los primers siguientes detecta la presencia de las cepas PVC-2a y PVC-2b:

Pab 5'GAA GAG TGG TTG TAA ATA ATT 3' sense y

Pab 5'CCT ATA TAA CCA AAG TTA GTA C 3' antisense,

La reacción de amplificación con los primers siguientes, detecta la presencia de la cepa PVC-2b:

Pb 5' CTT TAA CCT TCC TGT AAC AG 3' sense y

Pb 5' CAT AGT TAA ATT GGT TAT CTA C 3' antisense.

En la Figura 11 se observa el genoma de PVC-2 (CPV-d), y las secuencias de los primers P2, Pab y Pb.

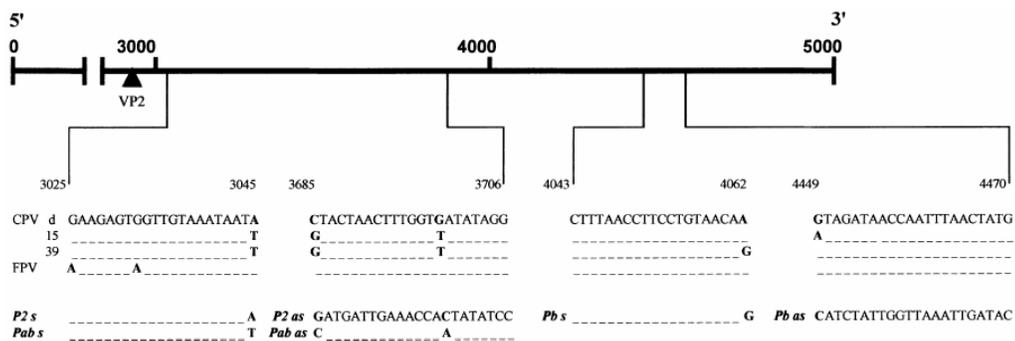


Figura 11 - Alineamiento nucleotídico de las cepas PVC-2 (CPVd), PVC-2a (CPV15) y PVC-2b (CPV39) y el genoma de VPF. Se muestra el esquema de los primers para distinguir entre los tipos de PVC (Pereira et al., 2000).

Se determinó el límite de sensibilidad de la técnica, que fue de 100 partículas virales para el par de primers P2 y de 150 partículas virales para los pares de primers Pab y Pb. Brevemente, se incubaron diluciones virales de título conocido con el lavado de un hisopado proveniente de un animal previamente diagnosticado por PCR, como negativo. Luego se extrajo y se amplificó el ADN y se determinó la dilución en la cual dejaba de visualizarse la señal de amplificación.

2.2.3. Clonado en pGEM® -T Easy Vector de los fragmentos amplificados por PCR

La purificación de los fragmentos de ADN obtenidos por la técnica PCR a partir de geles de agarosa, el clonado de los mismos en pGEM®-T Easy Vector, la preparación de ADN plasmídico mediante lisis alcalina y la secuenciación de los fragmentos amplificados por PCR se realizó con la metodología descrita en la sección “Materiales y Métodos” 2.2.3 -2.2.4 - 2.2.5. y 2.2.6 del CAPITULO I (VDC).

2.2.4. Análisis de las secuencias del fragmento de 681 pb y de 427 pb de la VP2 de PVC

Los cromatogramas obtenidos, se analizaron y editaron. Las secuencias obtenidas, se alinearon con el programa ClustalW.

Los números de acceso de las secuencias publicadas de las cepas Argentinas son:

Fragmento “Pab” Arg3 (FJ349323) y Arg4 (FJ349324).

Las secuencias de los fragmentos “Pb”, son: Arg 3, (FJ349305), Arg 5 (FJ349306), Arg 8 (FJ349307), Arg 10 (FJ349308), Arg12 (FJ349309), Arg13 (FJ349310), Arg14 (FJ349311), Arg 15 (FJ349312), Arg 16 (FJ349313), Arg 19 (FJ349314), Arg 20 (FJ349315), Arg 21 (FJ349316), Arg 22 (FJ349317), Arg 23 (FJ349318), Arg 24 (FJ349319), Arg 25 (FJ349320), Arg 26 (FJ349321) y Arg 27 (FJ349322).

Por otro lado, también se obtuvieron del Genbank las siguientes secuencias: PVC-2 (M38245), PVC-2a CPV15 (M24003), PVC-2b CPV39 (M74849).

“Uy-12/06” (EF375479) es una cepa PVC-2c de Uruguay, “It56/00” (AY380577) es una cepa PVC-2c de Italia y “HNI-4-1” es una cepa Japonesa PVC-2c (BAD34656).

2.2.5. Detección por PCR del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC

De acuerdo con (Buonavoglia et al., 2001), se seleccionó otro par de primers:

555for (f) 5' CAG GAA GAT ATC CAG AAG GA 3' 4003-4022 y

555rev (r) 5' GGT GCT AGT TGA TAT GTA ATA AAC A 3' 4585-4561

para amplificar un fragmento de 583 pb del gen de la VP2.

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: en un volumen de reacción de 50 µl; se agregaron 2 µl del ADN a una mezcla conteniendo: 50 pmoles de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 unidades de la Taq DNA Polimerasa, Recombinante de Invitrogen.

El ciclado se realizó de la siguiente manera: 10 minutos a 94 °C, luego el proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizó en 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 50 °C y 1 minuto a 72 °C.

Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en gel de agarosa 1,5% y se visualizaron bajo luz UV luego de la tinción con Bromuro de Etidio.

2.2.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 583 pb

El cambio de Asp a Glu en la posición 426 es debido a una mutación en la tercera posición del codón, en el nucleótido 4064 del gen de la VP2. Las variantes PVC-2c son erróneamente reconocidas como PVC-2b por la estrategia de PCR (Pereira et al., 2000) y por los mAbs desarrollados por el Dr. Parrish (Desario et al., 2005). Sin embargo, esta mutación creó un sitio único de reconocimiento para la enzima de restricción *MboII* (GAAGA) en esta nueva variante PVC-2c, que permite distinguirla de las cepas PVC-2a y PVC-2b.

Con 3 de las muestras que habían sido caracterizadas como PVC-2b por la PCR convencional, se realizó el análisis de Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), para poder detectar a las mutantes Glu426.

El fragmento de 583 pb del gen de la VP2 generado con los primers 555for/555rev fue digerido con 10 U de la endonucleasa *MboII* (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). Veinte microlitros del ADN obtenido, se digirieron a 37 °C durante 2 horas. Los resultados se visualizaron utilizando geles de agarosa 2,5%.

La digestión del fragmento de 583 pb con la enzima *MboII*, en las cepas CPV-2c da como resultado la formación de 2 fragmentos, uno de 510 y el otro de 73 pb.

2.2.7. Secuenciamiento del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC

El fragmento de 583 pb, tiene 40 nt más río arriba y 116 nt más, río abajo del fragmento obtenido con los primers Pb (427 pb). Además de incluir al sitio informativo 426, otorga la posibilidad de ser secuenciado directamente a partir del producto de PCR, resultando en una ventaja económica y tecnológica apreciable a la hora del diagnóstico, evitando los costos del clonado. Esto se debe a que el sitio 426, se encuentra en el nucleótido 58 del fragmento amplificado, alejado del inicio del mismo, en donde se producen la mayor cantidad de errores en el secuenciamiento.

Entre 20 y 30 ul (de concentración 50 ng/ul) de los productos de PCR obtenidos, sin purificar, fueron enviados a Macrogen Inc para su secuenciación directa. Esto es posible gracias a que el Tm de los primers 555 for y 555 rev utilizados para amplificar y secuenciar este fragmento, se encuentra entre 50-58 °C (50 °C), condición necesaria para el servicio de secuenciación directa a partir de producto de PCR, de Macrogen Inc.

Este procedimiento se realizó para 2 cepas tipificadas como PVC-2a y para 3 cepas del año 2008 caracterizadas por la estrategia de PCR, como PVC-2b.

2.2.8. Detección por PCR del gen completo de la VP2 de PVC

Se amplificó además el gen completo de la VP2 con los siguientes primers en una vacuna comercial:

VP2/10 5' GTG CAG GAC AAG TAA AA 3' (f)

VP2/end 5' TCT AGG TGC TAG TTG ATA TG 3' (r)

Los primers fueron gentilmente cedidos por el Med Vet Danilo Bucafusco de la cátedra de Virología de la FVET-UBA.

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera: en un volumen de reacción de 50 µl, se agregaron 2 µl del ADN a una mezcla conteniendo: 50 pmoles de cada primer, 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 unidades de la Taq DNA Polimerasa, Recombinante de Invitrogen®.

El ciclado se realizó de la siguiente manera: 2 minutos a 94 °C, luego el proceso de desnaturalización, unión de los primers al templado y extensión, se realizaron 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 51 °C y 5 minutos a 72 °C y una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

Los productos de PCR se detectaron por electroforesis en geles de agarosa 1 % y se visualizaron bajo luz UV luego de la tinción con Bromuro de Etidio.

2.3. Células

2.3.1. Cultivo e infección de células CRFK

Las células se crecieron en medio mínimo Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), glutamina, aminoácidos no esenciales, piruvato, bicarbonato de sodio 0,075%, Hepes 0,01M y antibióticos (6x10⁵ U/l de Penicilina, 150 U/l Estreptomicina).

La metodología utilizada para el mantenimiento de las células fue la siguiente: cuando la monocapa celular alcanzó la confluencia, las células fueron desprendidas con tripsina 0,05% en solución salina de fosfatos (PBS) (137,5 mM NaCl; 2,5 mM KCl, 8,5 mM Na₂H PO₄ pH 7,2) y 0,02 N EDTA.

Una vez tripsinizadas, las células se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de crecimiento y se trasvasaron en proporciones de 1:2 a 1:4 del volumen a un recipiente de igual superficie con medio de crecimiento nuevo para ser incubadas a 37°C.

Para poder realizar la tipificación con anticuerpos monoclonales, para la cual es necesario tener altos títulos de antígeno viral, se infectaron células CRFK (pasaje 206) en placas de 24 pocillos con 5 de las muestras positivas analizadas por PCR (Gaya, Simón, Sandokan, Leg, Daisy). Las muestras fueron previamente tratadas con antibióticos (materia fecal, y lavados en PBS de los hisopados), y clarificadas por centrifugación.

Las infecciones se realizaron en medio con 2% SFB sobre una monocapa preformada en un 70-80% de confluencia.

2.3.2. Test de Inhibición de la Hemoaglutinación (IH). Tipificación con anticuerpos monoclonales (mAbs)

Se intentó la tipificación de PVC con anticuerpos monoclonales (gentilmente cedidos por el Dr. Colin Parrish del James A. Baker Institute; College of Veterinary Medicine de la Universidad Cornell, Ithaca), con las 5 muestras crecidas en células CRFK.

La reacción consiste en la aglutinación de glóbulos rojos de cerdo por el virus, seguido por la inhibición de la hemoaglutinación con los diferentes anticuerpos monoclonales que reaccionan selectivamente con las distintas cepas de PVC.

Se necesitan 8 unidades HA de cada antígeno viral en PBS-albúmina 0,05% (pH 6,2) para realizar el test de inhibición de la hemoaglutinación.

Cada anticuerpo monoclonal (25 µl) fue incubado en pocillos de una placa de 96, con 25 µl del antígeno viral por una hora a temperatura ambiente; luego se agregó una suspensión de 0,5% de glóbulos rojos y se incubó la placa a 4 °C durante 8 horas.

Los anticuerpos monoclonales reaccionan de la siguiente manera: A2F8, A3B10 y B6D5: con todas las cepas de PVC; C1D1 reacciona con PVC-2a y PVC-2b y no con PVC-2; el B4A2 reacciona con las cepas PVC-2 y PVC-2a y no con la cepa PVC-2b, y B4E1 reacciona con la cepa PVC-2 y no reacciona con las cepas PVC-2a y PVC-2b.

Los anticuerpos monoclonales que permiten la diferenciación entre las cepas son: A4E3 (A2F8), B4A2, C1D1, B4E1. En la Tabla 2, se indican las reactividades de los diferentes anticuerpos monoclonales.

Virus	Anticuerpos monoclonales			
	A4E3	B4A2	C1D1	B4E1
Tipo original 2	+	+	-	+
2a	+	+	+	-
2b	+	-	+	-
Glu-426 mutante	+	-	+	-

(+) Reacción positiva (-) Reacción negativa

Tabla 2- Reactividad de los Anticuerpos monoclonales frente a los diferentes tipos PVC-2 en el test de inhibición de la hemoaglutinación (HI) (Desario et al., 2005).

3.1. Detección por PCR de 2 fragmentos del gen de la VP2 de PVC en vacunas comerciales de la Argentina

Con el objeto de evaluar la efectividad de la técnica de PCR para la detección de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC, se analizaron 3 vacunas comerciales disponibles en la Argentina. En la Figura 12, se muestra el resultado de la amplificación de las 3 vacunas comerciales.

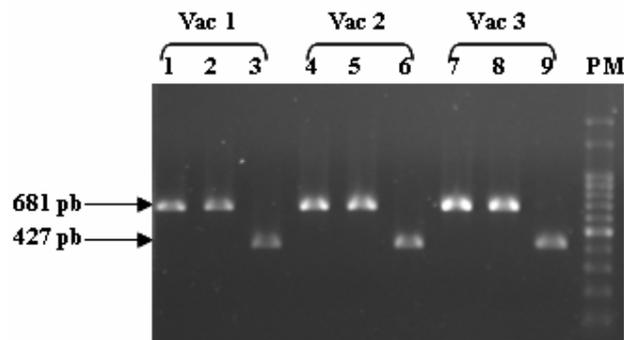


Figura 12 - Detección por PCR de fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en vacunas comerciales de la República Argentina. Calle 1-3: vacuna 1, calle 4-6: vacuna 2, calle 7-9: vacuna 3. En todos los casos los primers utilizados fueron: P2, Pab y Pb respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

El análisis del ADN obtenido de las cepas vacunales, mostró amplificación con los primers P2 como era esperable (Calles 1, 4 y 7), pero también con los primers Pab (calles 2, 5, 8) y Pb (calles 3, 6, 9). Este resultado fue de alguna manera, inesperado ya que la cepa original PVC-2 es la cepa utilizada en la mayoría de las vacunas comerciales (Martella et al., 2005), (Spibey et al., 2008) y los primers Pab y Pb fueron diseñados para reconocer solamente a las variantes PVC-2a/PVC-2b y PVC-2b, respectivamente.

(Decaro et al., 2006b) realizó una observación similar, y fue atribuida a una hibridación inadecuada (“mismatch”) de los primers Pab y Pb en las cepas vacunales. Por eso, con el objetivo de eliminar amplificaciones inespecíficas, se llevaron a cabo reacciones a temperaturas más estrictas. El “mismatch” de los primers Pab y Pb con las cepas vacunales, fue eliminado aumentando la temperatura de hibridación de los primers de 60 °C a 63.4 °C (Figura 13 y 14).

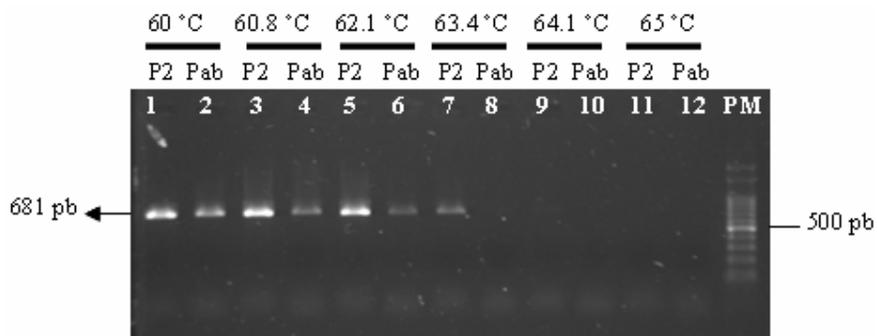


Figura 13 - Amplificación por PCR del ADN obtenido de una vacuna comercial, en un gradiente de temperaturas. Se utilizaron los pares de primers P2 (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11) y Pab (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12) a 60 °C, 60.8 °C, 62.1 °C, 63.4 °C, 64.1 °C y 65 °C respectivamente.

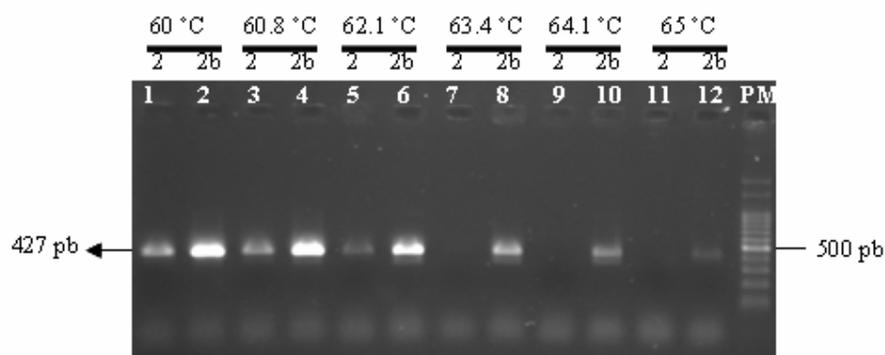


Figura 14 - Amplificación por PCR del ADN obtenido de una vacuna comercial, (PVC-2) y de una muestra clínica tipificada como PVC-2b en un gradiente de temperaturas. Se utilizó el par de primers Pb para la amplificación de la cepa vacunal (calles 1, 3, 5, 7, 9, 11) y la variante PVC-2b (calles 2, 4, 6, 8, 10, 12) a 60 °C, 60.8 °C, 62.1 °C, 63.4 °C, 64.1 °C y 65 °C respectivamente.

En la Figura 13, se observa la eliminación del “mismatch” del set de primers Pab con la cepa vacunal PVC-2, a 63.4 °C.

En la Figura 14, se observa la eliminación del “mismatch” del set de primers Pb con la cepa vacunal PVC-2, a 63.4 °C.

3.2. Determinación del límite de sensibilidad para la detección de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC

El límite de sensibilidad de la técnica, fue de 100 partículas virales (PV) para el set de primers P2 y de 150 PV para los sets de primers Pab y Pb.

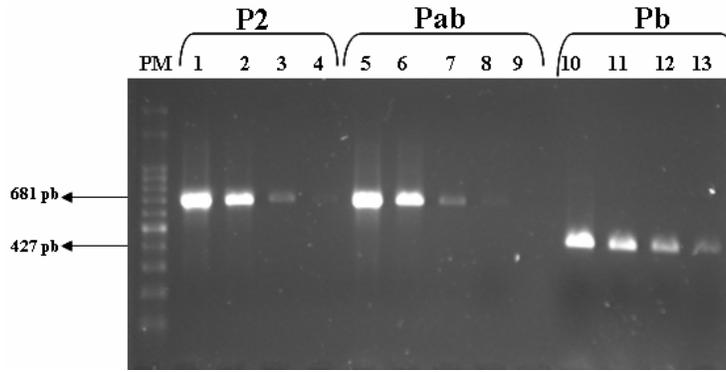


Figura 15 - Determinación del límite de sensibilidad para la detección de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC. PM: marcador de peso molecular. Calles 1-4: 1×10^4 PV, 1×10^3 PV, 1×10^2 PV, 10 PV respectivamente (amplificación con el par de primers P2), calles 5-9: 1.5×10^4 PV, 1.5×10^3 PV, 1.5×10^2 PV, 15 PV (amplificación con el par de primers Pab), calles 10-13: 1.5×10^5 PV, 1.5×10^4 PV, 1.5×10^3 PV, 1.5×10^2 PV (amplificación con el par de primers Pb).

3.3. Análisis de las secuencias obtenidas con los primers P2, en vacunas comerciales

Con el objeto de analizar con mayor profundidad, las cepas presentes en las vacunas comerciales, se clonaron y secuenciaron los fragmentos obtenidos con el set de primers P2 en 2 vacunas comerciales.

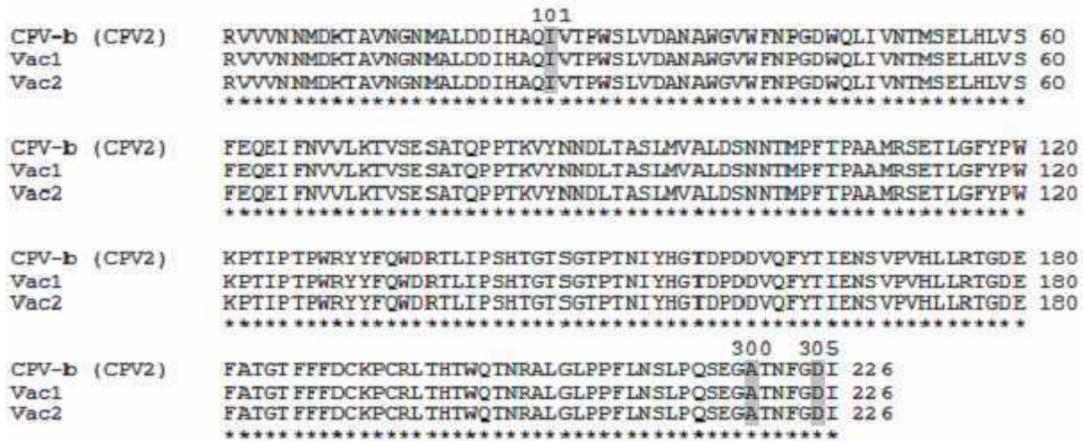


Figura 16 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 681 pb del gen de la VP2 obtenido para 2 vacunas comerciales junto con la cepa de referencia PVC-2. En las posiciones 101, 300 y 305 se observan los aminoácidos correspondientes a la cepa PVC-2.

El alineamiento de los fragmentos P2 obtenidos de 2 vacunas comerciales (Figura 16), mostró los aminoácidos esperados para la posición 101 (I), 300 (A) y 305 (D) para la cepa PVC-2. Estas posiciones, cambian en las variantes PVC-2a y PVC-2b con respecto a la cepa PVC-2. Los cambios son I-T (101), A-G (300) y D-Y (305) (Desario et al., 2005).

3.4. Análisis de la secuencia completa del gen de la VP2 en una vacuna comercial

Con el objeto de estudiar la secuencia completa del gen de la VP2 en una vacuna comercial, se amplificó por PCR el gen de la VP2, se clonó y secuenció.

Los resultados en la Figura 17 muestran el alineamiento de la secuencia obtenida para la vacuna comercial y la secuencia de la cepa de referencia PVC-2.

```

CPV-b (CPV2)  MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGI STGTFNNQTEFKFLENGWVE 60
Vac 1         MSDGAVQPDGGQPAVRNERATGSGNGSGGGGGGGSGGVGI STGAFNNQTEFKFLENGWVE 60
                *****:*****
                                101
CPV-b (CPV2)  I TANS SRLVHLNMPESENYRRVVVNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPW SLVDANAWGVW 120
Vac 1         I TANS SRLVHLNMPESENYRRVVVNMDKTAVNGNMALDDIHAQIVTPW SLVDANAWGVW 120
                *****:*****

CPV-b (CPV2)  FNPGDWQLIVNTMSE LHLVSVFEQEI FNVVLKTVSE SATQP PTKVYNNDLTASLMVALDSN 180
Vac 1         FNPGDWQLIVNTMSE LHLVSVFEQEI FNVVLKTVSE SATQP PTKVYNNDLTASLMVALDSN 180
                *****:*****

CPV-b (CPV2)  NTMPFTPAAMRSETLGFYPWKPTIIPWRY YFQWDRILIP SHTGTS GTP TNIYHGTDPDD 240
Vac 1         NTMPFTPAAMRSETLGFYPWKPTIIPWRY YFQWDRILIP SHTGTS GTP TNIYHGTDPDD 240
                *****:*****

CPV-b (CPV2)  VQFYTIENSVPVHLLRTGDE FATGT FFFDCKPCRLTHTWQINRALGLPP FLNSLPQSEGA 300
Vac 1         VQFYTIENSVPVHLLRTGDE FATGT FFFDCKPCRLTHTWQINRALGLPP FLNSLPQSEGA 300
                *****:*****
                                297 300
                                305
CPV-b (CPV2)  TNFGDIGVQQDKRRGVTQMGNTNYI TEATIMRPAE VGYSAPYYSFEASTQGPFKTPIAAG 360
Vac 1         TNFGDIGVQQDKRRGVTQMGNTNYI TEATIMRPAE VGYSAPYYSFEASTQGPFKTPIAAG 360
                *****:*****

CPV-b (CPV2)  RGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGOQKTTT TGETPERFTY IAHQDTGRY PEGDWIQNINF 420
Vac 1         RGAQTDENQAADGNPRYAFGRQHGOQKTTT TGETPERFTY IAHQDTGRY PEGDWIQNINF 420
                *****:*****
                                375
                                426
CPV-b (CPV2)  NLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNT YGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP 480
Vac 1         NLPVTNDNVLLPTDPIGGKTGINYTNIFNT YGPLTALNNVPPVYPNGQIWDKEFDTDLKP 480
                *****:*****

CPV-b (CPV2)  RLHVNAPFVQCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWVKGLVFKAKLR 540
Vac 1         RLHVNAPFVQCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSDFWVKGLVFKAKLR 540
                *****:*****
                                555
CPV-b         ASHTWNPIQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLY 584
Vac 1         ASHTWNPIQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVFEKSQLAPRKLY 584
                *****:*****
    
```

Figura 17 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del gen completo de la VP2 obtenido para una vacuna comercial junto con la cepa de referencia PVC-2. En las posiciones 101, 300 y 305 se observan los aminoácidos correspondientes a la cepa PVC-2.

De la Figura 17 se desprende que la cepa presente en la vacuna comercial, tiene los aminoácidos esperados para la cepa PVC-2.

3.5. Detección por PCR de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en hisopados rectales de perros de Argentina. Estudio de los casos analizados

De un total de 43 muestras analizadas, el ADN de PVC se detectó en 32 de ellas (74.4%), mientras que 11 muestras (25.6%) fueron negativas.

Las muestras en las cuales no se detectó PVC fueron re-extraídas una segunda vez y se repitió la reacción confirmando el resultado. Como la finalidad del presente trabajo de tesis no era definir la etiología de la enfermedad presentada por los animales, las muestras consideradas como negativas, no fueron posteriormente estudiadas y se decidió trabajar sólo con las muestras positivas.

En la Figura 18, se muestran los resultados de la amplificación por PCR de 3 muestras de la República Argentina.

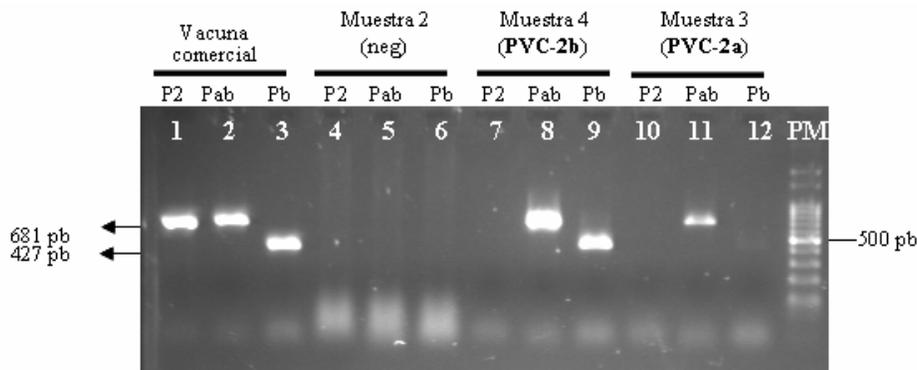


Figura 18 – Detección por PCR de los fragmentos de 681 y 427 pb del gen de la VP2 de PVC en muestras clínicas de 3 casos de la República Argentina. calles 1-3: vacuna comercial, calles 4 - 6: muestra “2”, calles 7-9: muestra “4”, calles 10- 12: muestra “3”. En todos los casos, los primers utilizados fueron P2, Pab y Pb respectivamente. PM: marcador de peso molecular.

La muestra 2 es negativa; la muestra 4, presenta amplificación de PVC con los primers Pab y Pb sugiriendo la presencia de la cepa PVC-2b y la muestra 3 presenta

amplificación sólo con el par de primers Pab, sugiriendo la presencia de la cepa PVC-2a en la misma (Figura 18).

No se observó amplificación con el par de primers P2, en ninguno de los 43 casos analizados (resultados no mostrados). Esto confirma y extiende resultados anteriores que indican que en la actualidad, la cepa PVC-2 no se encuentra circulando en la población canina, aunque sí se encuentra en las vacunas (Decaro et al., 2006a, Decaro et al., 2006b).

3.6. Tipificación con anticuerpos monoclonales (mAbs)

Los resultados obtenidos con la técnica de IHA utilizando mAbs para las cepas locales no fueron concluyentes.

El análisis con mAbs, debe ser aplicado en muestras fecales con óptima actividad hemaglutinante, ó con aislamientos obtenidos en cultivos celulares (Desario et al., 2005), que en nuestro caso resultó ser muy engorroso dado que fue difícil evitar contaminaciones al infectar las células con clarificados de materia fecal, sangre ó lavados de hisopados rectales.

Además, se obtuvieron resultados dispares con la técnica inhibición de la hemoaglutinación (IHA), respecto de la tipificación previamente obtenida por PCR (Tabla 3).

mAB Muestra	A2F8	A3B10	B6D5	C1D1	B4A2	B4E1	Título HA
Daysi	++	-	++	-	+	-	1:64
Sandokan	++	-	++	-	+	-	1:128
Leg	++	-	++	-	+	ND	1:128

Tabla 3 - Reactividad de los Anticuerpos monoclonales frente a las diferentes cepas Argentinas. Test de Inhibición de la hemoaglutinación. Muestras Daysi, Sandokan y Leg.

En la Tabla 3, se observa que las 3 cepas reaccionaron de una manera similar (habiendo sido tipificadas por PCR como PVC-2a (Daysi y Sandokan) y PVC-2b (Leg).

También, se obtuvo reactividad con los anticuerpos monoclonales, con títulos de hemoaglutinación inferiores a los necesarios (Tabla 4).

mAB Muestra	A2F8	A3B10	B6D5	C1D1	B4A2	B4E1	Título HA
Gaya	++	+	-	-	+	-	-
Leg	-	-	+	+	++	+	-
Simón	-	-	-	-	+	-	-
Sandokan	+	-	+	-	+	-	1:64

Tabla 4 - Reactividad de los Anticuerpos monoclonales frente a las diferentes cepas Argentinas. Test de Inhibición de la hemoaglutinación. Muestras Gaya, Leg, Simón, Sandokan.

Los tipos PVC-2a y PVC-2b, difieren por la falta de reactividad con el mAb B4A2, pero este no es capaz de reconocer la variante PVC-2c (mutante Glu426) (Desario et al., 2005). Además, se ha reportado en la literatura que muestras conteniendo grandes cantidades de ADN viral, calculado por real-time PCR, fueron negativas ó débilmente positivas por HA, (Decaro et al., 2005b), (Desario et al., 2005), (Desario et al., 2006c) así como se han descrito cepas de PVC que no hemoaglutinan (Cavalli et al., 2001). Es por ello que se decidió continuar con la identificación de PVC por PCR y no por IHA.

3.7. Análisis por PCR de cepas de PVC presentes en perros de la República Argentina

La triple reacción de PCR que se utilizó en este trabajo para diagnóstico, tampoco sirve para distinguir las variantes PVC-2b de las nuevas variantes PVC-2c; ya que la diferencia entre ellas reside en un aminoácido en la posición 426 de la VP2.

Es por esto que se decidió efectuar la secuenciación de los fragmentos de PCR obtenidos, para tener certeza del número de muestras PVC-2c, que inicialmente pudieron haberse definido erróneamente como PVC-2b por PCR.

Del análisis inicial por PCR, se definió que de las 32 muestras positivas, 9 pertenecían al genotipo PVC-2a y 23 al PVC-2b.

3.8. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos con los primers Pb en muestras de perros de la República Argentina

Con el objetivo de analizar las secuencias genómicas de las cepas de PVC que circulan en la Argentina, se procedió al clonado y secuenciamiento de la región de 427 pb del gen de la VP2 amplificada para 20 muestras con el set de primers Pb.

En la Figura 19, se observa el alineamiento nucleotídico del primer Pb junto con los 20 fragmentos obtenidos en muestras locales con el set de primers Pb, y 3 cepas de referencia (PVC-2, PVC-2a y PVC-2b).



Figura 19 – Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de 427 pb obtenidos con el par de primers Pb para las cepas Argentinas junto con la secuencia del primer Pb y 3 cepas de referencia. En celeste, se muestra la adenina presente en las cepas PVC-2 y PVC-2a que evita la unión del primer ya que éste termina con una G. En amarillo se muestra el codón GAT que codifica para un Asp (D) en las cepas PVC-2b y en rosa, se muestra el codón GAA que codifica para un Glu (E) en las cepas PVC-2c.

De la Figura 19 se desprende que de las 20 muestras inicialmente tipificadas como PVC-2b, sólo 4 pertenecían efectivamente al tipo PVC-2b y 16 pertenecían al tipo PVC-2c.

3.9. Amplificación y secuenciación de un fragmento de 583 pb del gen de la VP2

Con el objeto analizar el uso de otra herramienta alternativa, que permita la diferenciación entre cepas de PVC (Buonavoglia et al., 2001), se amplificó y secuenció, un fragmento de 583 pb que se superpone con el fragmento amplificado por los primers Pb, pero que empieza río arriba en el gen de la VP2.

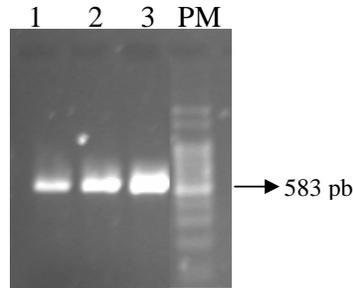


Figura 20 - Detección por PCR del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 de PVC en 3 muestras de la República Argentina. Calle 1: Ar32008, calle 2: Arlechino2008, calle 3: Apricot 2008. PM: marcador de peso molecular.

En la Figura 20, se observa la amplificación del fragmento de 583 pb de las últimas 3 muestras recibidas en el año 2008, previamente tipificadas por PCR (primers Pab/Pb) como PVC-2b. Los fragmentos obtenidos, se secuenciaron en forma directa, sin la necesidad del clonado, por encontrarse el sitio informativo 426 alejado del inicio del fragmento.

CPV-bCPV2	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
is15CPV2a	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
is39CPV2b	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Simon2003	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Vicky2003	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Flopi2003	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Leg2003	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
DAF2005	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
M294952005	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
CL22007	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
CL32007	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
YorkMDQ12007	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Scot2008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
DA1BB2008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
DA2BB	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
DA3BB	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
DA4BB	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Toto2008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Tango2008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
RN12008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
RN32008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Ar12008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Ar22008	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
Ar32008	GR Y	P	E	G	D	W	I	Q	N	I	F	N	L	P	V	T	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	60
Arlechino2008	GR Y	P	E	G	D	W	I	Q	N	I	F	N	L	P	V	T	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	60
Apricot2008	GR I	S	E	G	D	W	I	Q	N	I	F	N	L	P	V	T	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	60
Glu426Uruguay	-----D	W	I	Q	N	I	F	N	L	P	V	T	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	54				
It56/00	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														
JpHNI-4-1	-----FNL	PVT	DNV	L	L	P	T	D	P	I	G	G	K	T	G	I	N	T	N	I	F	N	T	Y	G	P	L	T	A	L	N	N	V	P	P	V	Y	P	N	47														

Figura 21 - Alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 427 pb del gen de la VP2 obtenido para 20 cepas Argentinas (Simón, Vicky, Flopi, Leg, DAF, M28495, CL2, CL3, YorkMDQ1, Scot, DA1BB, DA2BB, DA3BB, DA4BB, Toto, Tango, RN1, RN3, Ar1, Ar2) junto con 3 cepas de referencia PVC-2, PVC15 (PVC-2a) y PVC39 (PVC-2b), tres cepas internacionales de PVC-2c (una de Japón, una de Uruguay, una de Italia) y las secuencias de aminoácidos deducidas del fragmento de 583 pb del gen de la VP2 obtenido para 3 cepas Argentinas (Ar3, Arlechino, Apricot). En celeste, se muestra el aminoácido Asparragina Asn (N) presente en las cepas PVC-2 y PVC-2a. En amarillo se muestra el aminoácido ácido Aspártico Asp (D) en las cepas PVC-2b y en rosa, se muestra el aminoácido ácido Glutámico Glu (E) en las cepas PVC-2c.

En la Figura 21, se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas, de todos los fragmentos obtenidos de las cepas inicialmente caracterizadas por PCR como PVC-2b.

El análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos con el set de primers Pb, y con el par de primers 555for y 555 rev, determinó que del total de 23 muestras inicialmente tipificadas como PVC-2b, sólo 5 eran realmente PVC-2b y 18 eran PVC-2c, ya que tenían una Glu en la posición 426 de la VP2.

La información sanitaria de los animales en cuyos hisopados se detectó PVC, están resumidos en la Tabla 5, junto a los datos de tipificación.

Muestra	Cepa	Año	Edad (meses)	Sexo	Raza	Vacunación	Signos Clínicos	Cepa PVC	Procedencia
Rott	Arg 1	2002	ND	ND	R	ND	ND	CPV2a	ND
Gaya	Arg 2	2003	4	H	D	V	S	CPV2a	CABA
Simon	Arg 3	2003	6	M	R	NV	S	CPV2b	Victoria
Bartolo	Arg 4	2003	4	M	LR	V	S	CPV2a	San Isidro
Vicky	Arg 5	2003	135	M	ND	V	S	CPV2b	San Isidro
Rodrigo	Arg 6	2003	5	M	Mest	V	S	CPV2a	Merlo
Mushu	Arg 7	2003	ND	H	Mest	V	S	CPV2a	Merlo
Flopi	Arg 8	2003	6	H	C	V	S	CPV2c	Villa Martelli
Sandokan	Arg 9	2003	5	M	Mest	NV	S	CPV2a	San Andres
Leg	Arg 10	2003	4	H	R	V	S	CPV2b	Caseros
Daisy	Arg 11	2003	4	H	M	V	S	CPV2a	CABA
DAF	Arg 12	2005	ND	M	DA	ND	ND	CPV2c	CABA
M28495	Arg 13	2005	ND	ND	ND	NV	ND	CPV2c	CABA
CL2	Arg 14	2007	1	M	ST	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
CL3	Arg 15	2007	ND	M	FTS	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
MDQ1	Arg 16	2007	3	M	YT	V	ND	CPV2b	Mar del Plata
MDQ2	Arg 17	2007	3	H	Can	V	ND	CPV2a	Mar del Plata
Canmuer	Arg 18	2007	2	M	Can M	V	S	CPV2a	Mar del Plata
Scot	Arg 19	2008	2	M	R	V	S	CPV2c	Tigre
DA1	Arg 20	2008	2	ND	DA	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
DA2	Arg 21	2008	2	ND	DA	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
DA3	Arg 22	2008	2	ND	DA	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
DA4	Arg 23	2008	2	ND	DA	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
Toto	Arg 24	2008	5	M	Mest	V	S	CPV2c	Tigre
Tango	Arg 25	2008	2	H	SM	V	S	CPV2c	Tandil
RN1	Arg 26	2008	2	M	PA	V	S	CPV2c	Rio Negro
RN3	Arg 27	2008	2	M	PA	V	S	CPV2c	Rio Negro
Ar1	Arg 28	2008	3	H	Can	V	S	CPV2c	Olivos
Ar2	Arg 29	2008	2	M	Can	V	S	CPV2c	Olivos
Ar3	Arg 30	2008	19	M	Can	V	S	CPV2b	Olivos
Arlechino	Arg 31	2008	4	M	FTS	V	S	CPV2c	Bahia Blanca
Apricot	Arg 32	2008	1	M	Can	NV	S	CPV2c	Olivos

Tabla 5 - Identificación de los animales en cuyas muestras se detectó PVC. H: hembra; M: macho; Mest: Mestizo; LR: Labrador Retriever; PA: Pastor Alemán; R: Rottweiler; D: Doberman; DA: Dogo Argentino; SM: Schnauzer Miniatura; ST: Skye Terrier; YT: Yorkshire Terrier; FTS: Fox Terrier Smooth; C: Cocker; Can: Caniche; Can M: Caniche Miniatura. V: vacunado; NV: no vacunado; ND: información no disponible. S: Sí

3.10. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del fragmento de 583 pb

Los fragmentos amplificados de las muestras Arlechino y Apricot, fueron digeridos con la enzima *MboII* obteniéndose, como era de esperar por pertenecer ambas al genotipo PVC-2c, 2 fragmentos, uno de 510 pb y otro de 73 pb (Figura 22).

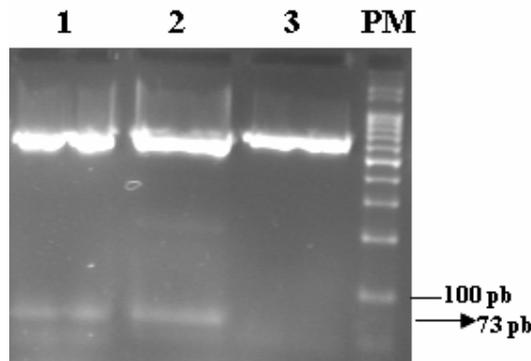


Figura 22 -Análisis con la enzima de restricción *MboII* de 3 cepas locales. Calle 1: Arlechino2008, calle 2: Apricot2008, calle 3: Simón2003 (PVC-2b).

3.11. Análisis de las secuencias de los fragmentos obtenidos con los primers Pab

Con el objeto de analizar otra región del gen de la VP2 en 2 cepas locales (una tipificada como PVC-2a y la otra tipificada como PVC-2b), se clonaron y secuenciaron los productos de PCR obtenidos con el par de primers Pab.

En la Figura 23, se observa el alineamiento de las secuencias de aminoácidos deducidas, obtenidas con el par de primers Pab para 2 cepas de PVC locales junto con cepas de referencia.

```

                                101
CPV-bCPV2      RVVVNNMDKTAVNGNMLALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSE LHLVS 60
PVC15CPV2a    RVVVNNLDKTAVNGNMLALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSE LHLVS 60
PVC39CPV2b    RVVVNNLDKTAVNGNMLALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSE LHLVS 60
Arg3CPV2b     RVVVNNLDKTAVNGNMLALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSE LHLVS 60
Arg4CPV2a     RVVVNNLDKTAVNGNMLALDDIHAQIVTPWSLVDANAWGVWFNPGDWQLIVNTMSE LHLVS 60
*****:*****

CPV-bCPV2      FEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTA SLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYFW 120
PVC15CPV2a    FEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTA SLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYFW 120
PVC39CPV2b    FEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTA SLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYFW 120
Arg3CPV2b     FEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTA SLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYFW 120
Arg4CPV2a     FEQEIFNVVLKTVSESATQPPTKVYNNDLTA SLMVALDSNNTMPFTPAAMRSETLGFYFW 120
*****

CPV-bCPV2      KPTIPTPWRYYFQWDR TLIPSHTGTS GTPTNIYHGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDE 180
PVC15CPV2a    KPTIPTPWRYYFQWDR TLIPSHTGTS GTPTNIYHGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDE 180
PVC39CPV2b    KPTIPTPWRYYFQWDR TLIPSHTGTS GTPTNIYHGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDE 180
Arg3CPV2b     KPTIPTPWRYYFQWDR TLIPSHTGTS GTPTNIYHGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDE 180
Arg4CPV2a     KPTIPTPWRYYFQWDR TLIPSHTGTS GTPTNIYHGTDPDDVQFYTIENSVPVHLLRTGDE 180
*****

                                297 300 305
CPV-bCPV2      FATGTFFFDCKPCRLTHWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGT NFGYI 226
PVC15CPV2a    FATGTFFFDCKPCRLTHWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGT NFGYI 226
PVC39CPV2b    FATGTFFFDCKPCRLTHWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGT NFGYI 226
Arg3CPV2b     FATGTFFFDCKPCRLTHWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGT NFGYI 226
Arg4CPV2a     FATGTFFFDCKPCRLTHWQTNRALGLPPFLNSLPQSEGGT NFGYI 226
*****.***.***

```

Figura 23 - Alineamiento del fragmento Pab obtenidos para 2 cepas locales, una tipificada como PVC-2a y la otra como PVC-2b, junto con las cepas de referencia, PVC-2 (M38245), CPV15 (CPV-2a) y CPV39 (CPV-2b). Los fragmentos obtenidos con el set de primers pab (reconoce cepas PVC-2a y PVC-2b) para 2 cepas locales Arg3 (PVC-2b) y Arg4 (PVC-2a), se alinearon en la figura.

En la Figura 23, se observa la presencia de una mutación única en la posición 297 Ser→Asn en ambas cepas Argentinas. Las posiciones 101, 300 y 305 muestran los aminoácidos esperados para las cepas PVC-2a (Arg4) y PVC-2b (Arg3).

3.12. Análisis del fragmento de 583 pb en cepas PVC-2a

Con el fin de corroborar la presencia de la cepa PVC-2a, en las muestras cuya amplificación fue positiva con los primers Pab y negativa con los primers Pb, se eligieron al azar 2 muestras y en ellas, se amplificó el fragmento de 583 pb para su secuenciamiento directo a partir del producto de PCR.

Como se observa en la Figura 24, estas cepas (anteriormente tipificadas como PVC-2a), presentan en la posición 426, una Asparragina (N), típica de las cepas PVC-2a.

```

                                426
SandokanArg9      GRYPEGDWIQNINFNLPVITNDVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPN 60
CanichemuertoArg18 GRYPEGDWIQNINFNLPVITNDVLLPTDPIGGKTGINYTNI FNTYGPLTALNNVPPVYPN 60
*****

SandokanArg9      GQIWDKEFDTDLKPRHLVNAFFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSD 120
CanichemuertoArg18 GQIWDKEFDTDLKPRHLVNAFFVCQNNCPGQLFVKVAPNLTNEYDPDASANMSRIVTYSD 120
*****

SandokanArg9      FWWKGKLVFKAKLRASHTWNPIQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLYHT 180
CanichemuertoArg18 FWWKGKLVFKAKLRASHTWNPIQQMSINVDNQFNYPVPSNIGGMKIVYEKSQLAPRKLYHT 180
*****

SandokanArg9      YYVFMFITYHLA 192
CanichemuertoArg18 YYVFMFITYHPH 192
*****
    
```

Figura 24 - Alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos del fragmento de 583 pb obtenido para 2 cepas locales de PVC tipificadas como PVC-2a. Se observa el aminoácido N (Asparagina) en la posición 426.

3.13. Evolución de PVC en Argentina

La Figura 25 muestra la distribución de las diferentes cepas tipificadas entre los años 2002 y 2008.

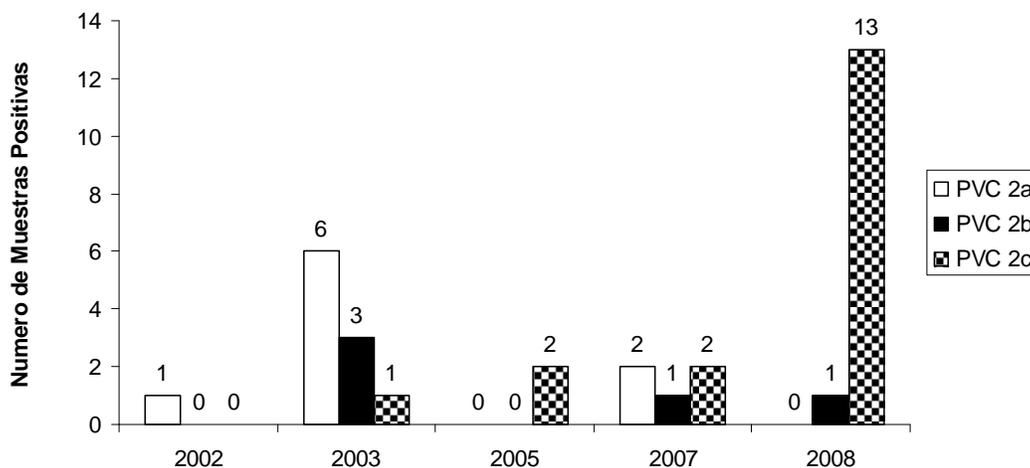


Figura 25 - Distribución de las diferentes cepas de PVC entre los años 2002 y 2008. Número de animales positivos, pertenecientes a diferentes genotipos en cada año.

Se observa que la cepa PVC-2c se convirtió en la cepa predominante en los perros de la República Argentina en el último año.

De las 2 muestras obtenidas de la FVET tomadas en el año 2004, una de ellas pertenecía al genotipo PVC-2b y la otra al genotipo PVC-2c, mientras que las 2 muestras tomadas en el año 2008, pertenecían al genotipo PVC-2b.

3.14. Parámetros epidemiológicos y sanitarios de los casos analizados

3.14.1. Localización geográfica de las muestras positivas para PVC

A fin de estudiar la distribución geográfica de los casos, se localizó en un mapa de la Ciudad de Buenos Aires y alrededores, el número de muestras que presentaron amplificación positiva para los fragmentos de 681 y/ó 427 pb del gen de la VP2 de PVC (Figura 26).

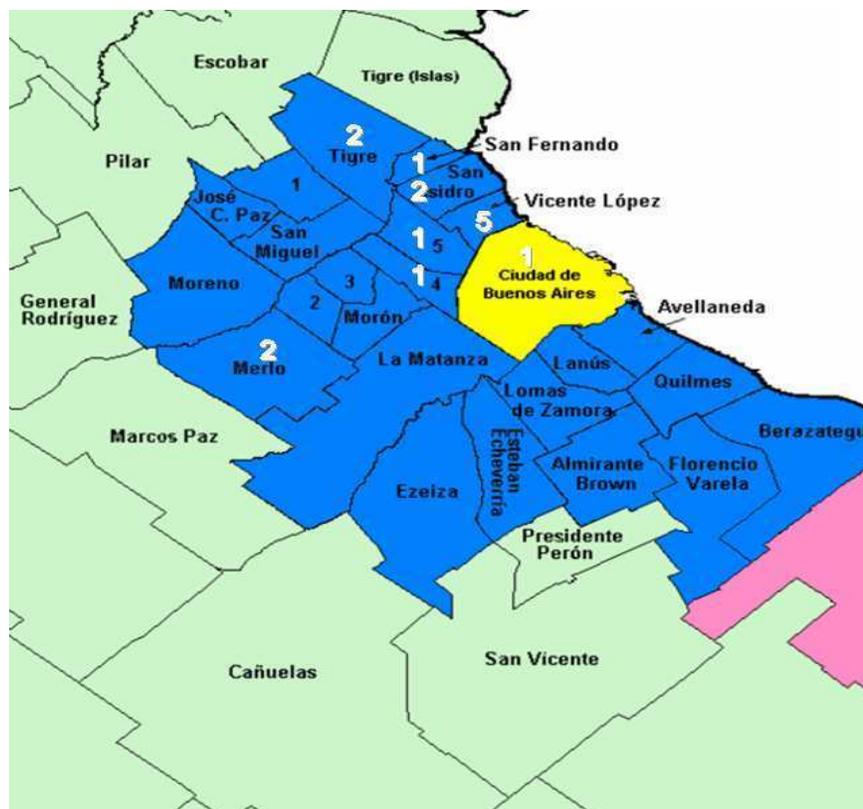


Figura 26 - Distribución geográfica de las muestras positivas por PCR. Se muestra en cada partido, el número de muestras positivas para PVC (números en blanco). Los números en negro indican los nombres de los diferentes partidos del conurbano bonaerense. 1: Malvinas Argentinas, 2: Ituzaingo, 3: Hurlingham, 4: Tres de Febrero, 5: General San Martín.

Se encontraron además, 7 muestras positivas en Bahía Blanca, una en Tandil, 2 en Río Negro, 3 en Mar del Plata y de 4 se desconocía la procedencia.

3.14.2. Distribución temporal de las muestras analizadas

Se utilizaron los datos epidemiológicos para estudiar la distribución temporal de las muestras analizadas.

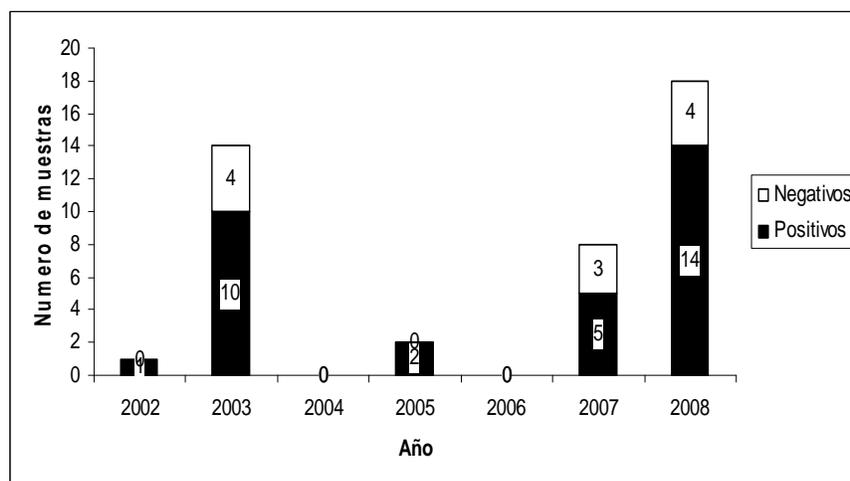


Figura 27 - Distribución temporal de las muestras analizadas. Se muestra el número de muestras analizadas en cada año.

Los datos presentados en la Figura 27 muestran que de un total de 43 muestras analizadas, una de ellas fue tomada en el año 2002, 14 en el año 2003, 2 muestras en el año 2005, 8 muestras en el año 2007 y 18 muestras durante el año 2008.

Esta distribución de los muestras en el tiempo, se debe al sesgo en la recepción de las muestras en el laboratorio y no a una disminución de la enfermedad en los años 2004 y 2006.

3.14.3. Relación entre el estado de vacunación y el diagnóstico de PVC por PCR

Del total de 43 muestras, 37 (86 %) provinieron de animales vacunados, 4 (9.4%) provinieron de animales sin vacunar y 2 provinieron de animales cuyo estado de vacunación se desconocía.

En cuanto a las 32 muestras positivas para PVC, 26 animales estaban vacunados, 4 animales nunca habían sido vacunados y de 2 animales, se desconoce el estado de vacunación (Figura 28).

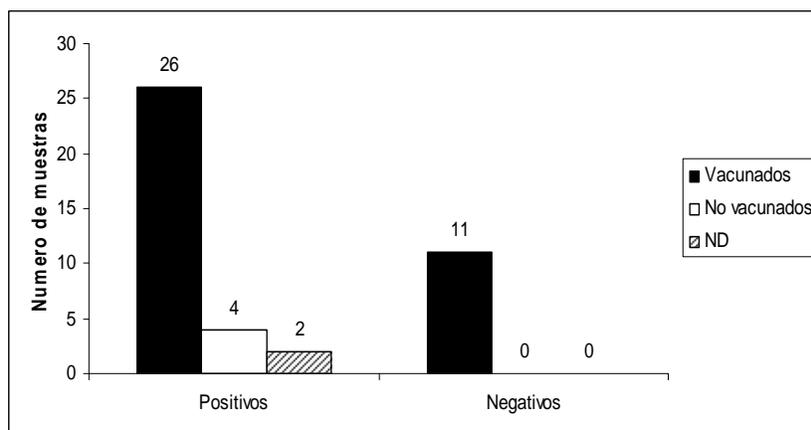


Figura 28 - Número de perros diagnosticados como positivos ó negativos, entre los animales vacunados y no vacunados. Resultado del diagnóstico por PCR y estado de vacunación.

El 100% de los no vacunados, fue positivo y el 70% de los vacunados, fue positivo.

En la Tabla 6, se presenta un resumen de los datos.

TOTAL n 43		43	PCR +	PCR -
		n	32	11
		%	74%	26%
		95% CI	61.4-87.5	12.5-38.6
Vacunados n 37 <th>37</th> <th>PCR +</th> <th>PCR -</th>		37	PCR +	PCR -
		n	26	11
		%	70%	30%
		95% CI	55.5-85	15-44.5
Sin vacunar n 4 <th>4</th> <th>PCR +</th> <th>PCR -</th>		4	PCR +	PCR -
		n	4	0
		%	100%	0%
Incierto <th>2</th> <td></td> <td></td>		2		

Tabla 6 - Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales vacunados y de los animales no vacunados que resultaron positivos para la detección de PVC.

3.14.4. Relación entre la presencia de sintomatología clínica y el diagnóstico de PVC por PCR en animales vacunados y no vacunados.

Se determinó en los animales **vacunados**, la relación entre la sintomatología clínica y la detección de PVC.

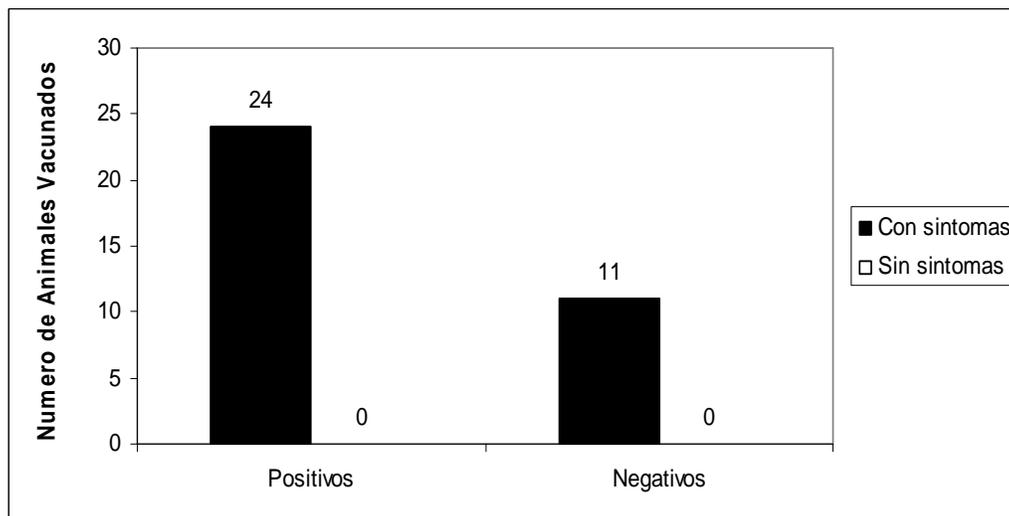


Figura 29 – Diagnóstico de animales vacunados con sintomatología clínica de PVC. Resultado del diagnóstico por PCR, estado de vacunación y la sintomatología.

Los datos de la Figura 29, muestran que los 24 animales **vacunados** diagnosticados positivos para PVC, habían presentado sintomatología compatible con la enfermedad.

Se carece de información respecto de la sintomatología de dos de los animales vacunados y positivos para PVC.

Se observa que hubo 11 animales vacunados con síntomas clínicos compatibles con PVC que resultaron negativos. Estos casos podrían asociarse a alguna otra patología.

Por otro lado, también se estudió en animales **no vacunados** la relación entre la sintomatología clínica y la detección de PVC. Para el caso de los 4 animales **no vacunados**, que resultaron positivos para PVC se observó que 3 de ellos habían presentado sintomatología compatible con PVC y del otro animal no se desconocía la sintomatología.

Con respecto al total de los animales (sin distinción del estado de vacunación), del total de 32 animales positivos por PCR, 27 animales (84.4%) habían mostrado sintomatología compatible con PVC, y de 5 animales (15.6%), no se tenía registro de la sintomatología (Tabla 7).

No se encontraron animales asintomáticos con diagnóstico positivo para PVC.

TOTAL n 43	43		PCR +	PCR -
		n	32	11
		%	74%	26%
		95% CI	61.4-87.5	12.5-38.6
Con Sintomatología n 38	38		PCR +	PCR -
		n	27	11
		%	71%	29%
		95% CI	56.6-85.5	14.5-43.4
Sin Sintomatología n 0	0		PCR +	PCR -
		n	0	0
		%	0%	0%
Sin datos	5		5	0
			100%	0%

Tabla 7 - Análisis de la base de datos en donde se observa el porcentaje del total, de los animales con sintomatología que resultaron positivos ó negativos para PVC.

Por lo tanto, en este estudio, se observó una asociación entre la sintomatología clínica y el diagnóstico de PVC por PCR.

3.14.5. Distribución de edades de los animales infectados con PVC

Se analizó la distribución de edades de los animales diagnosticados positivos para PVC (Figura 30).

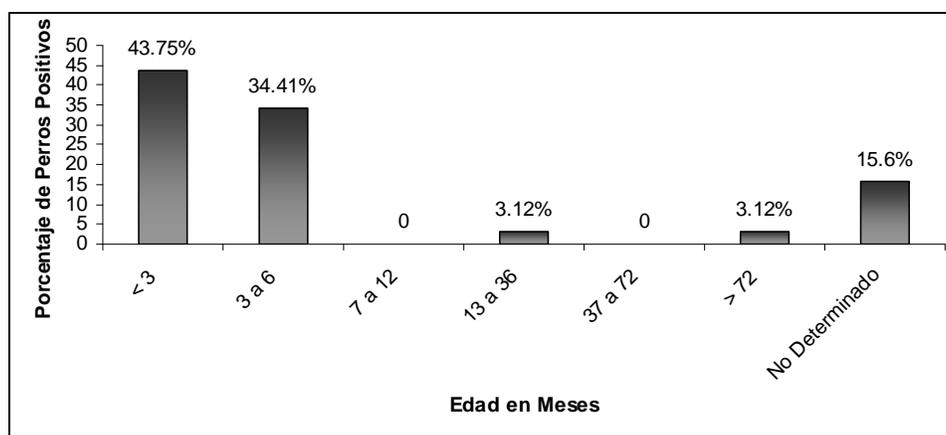


Figura 30 - Porcentaje de perros positivos para PVC por PCR, en los diferentes grupos de edades. Distribución de edades de los perros con PVC.

En la Figura 30, se observa el porcentaje de animales en cada grupo de edades. El 43,75%, 34,41%, 3,12% y el 15,6% corresponde a 14, 11, 1 y 5 perros respectivamente. Estos resultados, sugieren que el grupo de animales que presenta mayor riesgo de infección, tiene menos de 6 meses de edad.

3.14.6. Estado de vacunación en diferentes grupos de edades

Se analizó el estado de vacunación en los diferentes grupos de edades, de animales diagnosticados como positivos.

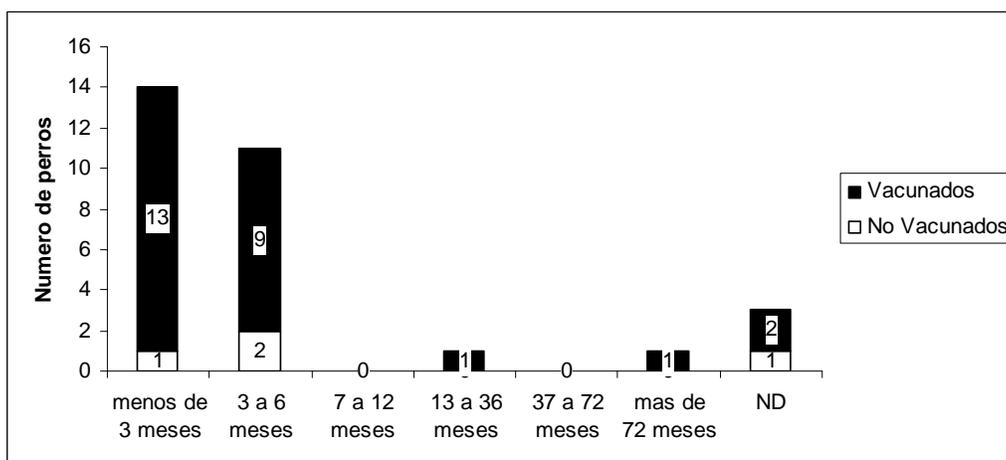


Figura 31 - Distribución de edades de animales PVC positivos. Número de animales positivos, con diferente estado de vacunación en los diferentes grupos de edades. ND: No determinado.

En la Figura 31, se observa que la mayoría de los animales de menos de 6 meses de edad, estaban vacunados.

Estos resultados, se deben a que se encontraron hacia fines del año 2007, una gran cantidad muestras que tenían el tipo PVC-2c y que esta cepa, tendría aparentemente una mayor prevalencia en animales menores de 3 meses.

Tal como se describió en el Capítulo I con respecto al VDC, en el año 2001 ocurrieron eventos económicos indeseables que tuvieron un gran impacto en la sanidad de las mascotas.

A partir del año 2003, se observó un elevado número de casos de gastroenteritis hemorrágica, afectando a cachorros vacunados y no vacunados.

El diagnóstico clínico fue en principio, el criterio fundamental para detectar estos casos, no disponiéndose de herramientas diagnósticas precisas. Como consecuencia de ello, en muchas oportunidades, no se logró definir el agente causal de la gastroenteritis.

El PVC provoca por lo general, infecciones secundarias en los animales afectados por lo cual, es importante que estos animales sean aislados cuanto antes. Resulta muy importante entonces, disponer de un método rápido, específico y sensible para su identificación (Uwatoko et al., 1995).

El primer paso hacia la identificación de las cepas de PVC circulantes en la Argentina, fue desarrollar un método de detección molecular por PCR.

Para ello, se analizaron inicialmente 3 vacunas disponibles en el mercado. Para poder realizar la detección y caracterización de las cepas vacunales, se amplificaron dos regiones del gen de la proteína VP2 con 3 sets de primers (P2, Pab y Pb). Estas regiones fueron elegidas de acuerdo al trabajo de (Pereira et al., 2000) e incluyen sitios antigénicos relevantes.

En las 3 vacunas analizadas, se detectaron fragmentos con un peso molecular de 681 pb con los primers P2 y Pab, y de 427 pb con los primers Pb (Figura 12).

De acuerdo a lo descrito por Decaro, (Decaro et al., 2006b) las cepas vacunales, tienden a producir un “mismatch” con los primers Pab y Pb. Efectivamente, en el presente trabajo, se obtuvo una amplificación inesperada para las cepas vacunales, con los primers Pab y Pb.

Para eliminar la amplificación inespecífica, se probaron aumentos de temperatura de annealing. Como resultado, se logró la eliminación de la amplificación con los primers Pab a 63.4°C, manteniéndose la amplificación con los primers P2 para las cepas vacunales (Figura 13). A la misma temperatura (63,4°C), se eliminó la amplificación de la cepa vacunal con los primers Pb, mientras que como era esperable, se mantuvo la amplificación con la cepa PVC-2b (Figura 14).

Los resultados indicarían que la cepa componente de las vacunas estudiadas sería la cepa PVC-2, que es una cepa atenuada y utilizada ampliamente en vacunas a nivel mundial (Spibey et al., 2008).

Para confirmar los resultados obtenidos por PCR, se clonaron, secuenciaron y alinearon las secuencias aminoacídicas obtenidas de los fragmentos amplificados con los primers P2 de 2 vacunas comerciales. Como se mostró en la Figura 16, esta región presenta una identidad del 100% con respecto a la cepa de referencia PVC-2 (M38245). Se observaron los aminoácidos esperados para la cepa PVC-2 en las posiciones 101, 300 y 305 del gen de la VP2, que son las que varían en las cepas PVC-2a y PVC-2b.

Asimismo, se clonó y secuenció el gen completo de la VP2 de una de las vacunas comerciales. Los datos obtenidos, confirman para el gen completo, lo que se encontró en el estudio del fragmento amplificado con los primers P2 (Figura 17).

A favor de la utilización de las vacunas como herramienta de control, se encuentra lo reportado por otros autores, que no detectaron reversión a virulencia de estas vacunas a virus vivo modificado, y que observaron que la mayor parte de los casos de gastroenteritis subsiguiente a la vacunación, están relacionados con la infección de los perros con cepas de campo, justo antes ó justo después de la administración de vacunas. (Decaro et al., 2007b)

Con estos resultados, se concluyó el análisis de las cepas vacunales, estableciendo las bases para realizar su eventual comparación con las cepas salvajes de PVC.

Luego de la puesta a punto de la técnica de PCR para detectar PVC, se comenzaron a analizar en el laboratorio, muestras de animales con sintomatología clínica compatible con PVC. Inicialmente, se realizaron algunas pruebas en donde se comparó la detección de PVC en sangre y/ó en hisopados rectales.

Debido a que durante la fase crítica de la enfermedad, el título del virus en heces llega hasta 10^9 DICT 50 por gramo de materia fecal, y que el PVC presenta gran resistencia a factores ambientales, se definió al hisopado rectal sin medio de transporte, como muestra de elección para su detección por PCR, la cual por otro lado, se adapta perfectamente a la idiosincrasia de la práctica clínica.

La sensibilidad del método permitió en nuestro caso, detectar un mínimo de 100 partículas virales con los primers P2 y de 150 partículas virales con los primers Pab y Pb (Figura 15) que sumado a los altos títulos en los cuales se excreta el virus, garantiza la factibilidad de un diagnóstico eficiente con esta metodología.

Es importante destacar que en animales recuperados de la infección, después de la convalecencia (aproximadamente 14 días post infección), no se ha detectado la excreción de virus en las heces. Este dato, resulta relevante para los criadores, porque no se observa un estado portador que mantendría al virus circulando en los criaderos.

Sin embargo, la resistencia del PVC a factores ambientales, sugeriría que la infección observada en animales vacunados, puede deberse a la persistencia del virus en dichos lugares por periodos prolongados, por lo que se recomiendan medidas de saneamiento y de higiene apropiadas (formalina ó soluciones de hipoclorito de sodio dilución 1:30 inactivan al virus).

Una vez discutidos estos puntos procederemos al análisis epidemiológico de las muestras provenientes de casos clínicos.

Hubo 2 períodos principales de recepción de muestras en nuestro laboratorio: uno en el año 2003 y otro entre los años 2007 y 2008. Estos últimos casos, se trataron de gastroenteritis virulentas muy severas, en muchas ocasiones, con sintomatología atípica, como diarrea no hemorrágica, por lo que el diagnóstico clínico y anatomopatológico era confuso. La aplicación de las técnicas desarrolladas en el presente trabajo de tesis, contribuyó a clarificar la etiología de la enfermedad presentada por estos animales.

La Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.B.A. también desarrolló la tecnología para el diagnóstico molecular de PVC. Las muestras analizadas allí, fueron 22 en el año 2003, 6 en el año 2004, una en el año 2006, 2 en el año 2007 y 2 en el año 2008 (comunicación personal con el Med Vet Danilo Bucafusco). Cuatro de estas muestras, fueron re-analizadas en nuestro laboratorio y forman parte de este trabajo.

De un total de 43 muestras obtenidas en nuestro laboratorio, el ADN de PVC se detectó en 32 muestras (74.4%), mientras que 11 de las muestras (25.6%) fueron negativas.

En ninguno de los 43 casos analizados, se observó amplificación con el set de primers P2, el cual reconoce a las cepas ancestrales tipo PVC-2. Este resultado, confirma y extiende resultados anteriores que indican que en la actualidad, la cepa PVC-2 no se encuentra circulando en la población canina, pero sí está presente en las vacunas (Decaro et al., 2006b), (Spibey et al., 2008).

Inicialmente, 9 muestras fueron tipificadas por PCR como PVC-2a y 23 como PVC-2b. El PVC es un virus de reciente aparición, que está evolucionando continuamente, provocando la aparición de nuevos tipos antigénicos y mutantes virales que se encuentran dispersas en la población canina. Las mutantes más exitosas, desde una perspectiva evolucionista, se seleccionan aparentemente por su capacidad mejorada de unirse al receptor canino de transferrina y por su rango de huésped ampliado (perro y gato) (Truyen, 2006).

Si bien este virus a ADN simple cadena utiliza la maquinaria de la célula para replicarse, su tasa de sustitución nucleotídica durante su replicación, esta más cercana a la de los virus a ARN (10^{-4} sustituciones/nucleótidos/año) que a la de virus a ADN doble cadena (Shackelton et al., 2005).

Esta alta tasa de mutación, junto con la eventual presión de selección que puede ser generada por niveles sub-óptimos de anticuerpos neutralizantes debido a una vacunación incompleta ó inadecuada de los animales, puede contribuir a la emergencia de nuevas cepas de PVC.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, se reportó a nivel internacional (inicialmente en Italia, y luego en Vietnam, USA y Uruguay) la presencia de una nueva variante de PVC, denominada PVC-2c. Esta, presenta con respecto a la cepa PVC-2b una mutación Asp→Glu en el sitio 426 de la proteína VP2 de la cápside viral.

Por este motivo, se decidió estudiar la presencia de esta nueva variante entre las cepas de PVC circulantes en Argentina. Para ello fue necesario clonar y secuenciar todos fragmentos obtenidos con los primers Pb, de las cepas tipificadas inicialmente por PCR como PVC-2b (Figura 19).

Luego del análisis de las secuencias, se mostró la presencia por primera vez en la Argentina de la nueva variante PVC-2c.

De las 20 muestras caracterizadas inicialmente por PCR como PVC-2b, 16 de ellas (80%) correspondían a la nueva variante PVC-2c mientras que sólo 4 (20%) correspondían auténticamente a la cepa PVC-2b.

Además del impacto sanitario, epidemiológico y sus consecuencias, este resultado confirma que la técnica de PCR, es una buena herramienta para identificar la presencia de PVC pero insuficiente para la caracterización de las cepas (Buonavoglia et al., 2001); (Decaro et al., 2005b)

El secuenciamiento de este fragmento, mostró un 100% de identidad entre los fragmentos de las cepas PVC-2c y un 99% de identidad con respecto a los fragmentos de las cepas PVC-2b.

Por otro lado, también se analizó el fragmento obtenido con los primers Pab (que abarca residuos importantes de la proteína de la cápside como las posiciones 101, 297, 300 y 305) en 2 cepas locales (una PVC-2a “Bartolo Arg” y otra PVC-2b “Simón Arg 3”). De acuerdo a lo mostrado en la Figura 23, para las cepas locales, se observan en la posición 297 cambios únicos Ser→Asn y los aminoácidos esperados para las variantes PVC-2a y PVC-2b en las posiciones 101, 300 y 305 (T, G, Y, respectivamente).

El cambio de la posición 297 en las cepas locales, fue inesperado debido a que el aminoácido común a las cepas PVC-2, PVC-2a y PVC-2b en esa posición, es una Serina (Ser). Sin embargo, la cepa 136/00 (variante PVC-2c) de Italia (Desario et al., 2005) así como también cepas de PVC de Japón (Ohshima et al., 2008), presentan una Ala en lugar de una Serina, sugiriendo que esta posición, está tendiendo a presentar variaciones y que el PVC está todavía en proceso de evolución (Martella et al., 2005b).

Al presente no existe una clara identificación del impacto biológico de la mutación de la posición 297.

El análisis retrospectivo de las muestras obtenidas durante el año 2003, mostró que sólo una de las 10 muestras analizadas (10%), pertenecía al genotipo PVC-2c mientras que de las muestras recibidas durante el 2007-2008 el 79 % fue caracterizado como PVC-2c (Figura 25).

En la búsqueda de algunas herramientas complementarias para el análisis de las secuencias genómicas de PVC, se decidió amplificar una región del genoma de 583 pb (Figura 20), que incluye el sitio informativo 426 y permite su secuenciamiento directo a partir del producto de PCR, evitando la necesidad del clonado. Esta ventaja no es menor, debido a que reduce significativamente los costos de la determinación y diferenciación de las cepas de PVC.

Por otro lado, la aparición del codón GAA (Glu) en lugar de AAT (Asn) ó GAT (Asp) en la posición 426 en las variantes CPV-2c, permitió realizar un análisis por RFLP de este fragmento, con la enzima de restricción *MboII* (Buonavoglia et al., 2001).

La adquisición del sitio de reconocimiento de la enzima, otorga la posibilidad de distinguir las cepas PVC-2c de las variantes PVC-2a y PVC-2b sin necesidad de secuenciarlas (Figura 22).

Efectivamente, el análisis de este fragmento, permite la aplicación de una herramienta rápida como la PCR y RFLP, para un estudio epidemiológico de la enfermedad.

También, se realizó el secuenciamiento de este fragmento de 583 pb en 2 cepas caracterizadas por PCR como PVC-2a (por la ausencia de amplificación con el par de primers Pb). Los resultados mostraron la presencia del aminoácido Asparragina (N) en la posición 426, esperable para las cepas PVC-2a (Figura 24).

Si bien, esta tecnología aún no ha sido utilizada extensivamente en nuestro laboratorio, será desarrollada en el futuro.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la cepa PVC-2c se convirtió en la cepa predominante en la República Argentina, como en el caso de Italia

y Uruguay (Martella et al., 2005b), (Perez et al., 2007). En Australia, este reemplazo no ocurrió y la cepa PVC-2a continúa siendo la cepa predominante (Meers, 2007).

Estudios realizados en Uruguay (Perez et al., 2007), muestran la presencia de la cepa PVC-2c a partir del 2006, resaltando el valor epidemiológico de las muestras obtenidas en Argentina, en los años 2003 y 2005, que mostraron la presencia de esta variante más tempranamente en Sudamérica.

El hecho de que la cepa PVC-2c se haya transformado en cepa predominante, confirma lo discutido anteriormente respecto a la eventual ventaja replicativa que tendría la misma, comparada con las otras cepas circulantes PVC-2a y PVC-2b.

En síntesis, se observó que de las 32 muestras positivas para PVC, 9 fueron caracterizadas como PVC-2a, 5 como PVC-2b y 18 como PVC-2c confirmando la presencia de la nueva cepa PVC-2c en la población canina. La aparición esta nueva cepa, data en la Argentina, por lo menos del año 2003, y este dato epidemiológico surge del presente trabajo, que contribuyó a la identificación de las 3 cepas de PVC circulantes en la población canina mundial.

Se analizaron también por PCR y secuenciamiento, 4 muestras cedidas por la FVET. Dos de ellas, (tomadas en el año 2004) se caracterizaron: una como PVC-2b y la otra como PVC-2c. Las 2 muestras restantes, tomadas en el año 2008, fueron caracterizadas como PVC-2b. La muestra del 2004, caracterizada como PVC-2c contribuye a la hipótesis de la presencia de esta variante en nuestro continente, al menos desde el año 2003.

Un hallazgo inesperado e interesante fue el de encontrar una N en la posición 426 del fragmento de una cepa que había resultado positiva para la amplificación del Pb (Ar32008) (Figura 21), es decir, había sido caracterizada como PVC-2b por la estrategia de PCR. Esto podría corresponder a la detección de la cepa vacunal (tipo PVC-2) en esta muestra, aunque esto es improbable dado que la amplificación con los primers P2 resultó negativa, y que habían pasado 24 días desde que el animal había recibido la última dosis de vacuna, y la toma de la muestra. Se estima que la detección por PCR de la cepa vacunal, se realiza sólo hasta 14 días después de la vacunación (www.antechdiagnostics.com). Como esta situación ocurrió solamente con un caso, se contabilizó como PVC-2b y se evaluarán en el futuro, posibles explicaciones.

Respecto del análisis de los parámetros epidemiológicos y sanitarios de los casos, no se encontró asociación con respecto a la raza ó al sexo del animal, pero sí se encontró que

el 70% de los animales positivos para PVC, habían sido vacunados al menos una vez. La presencia de gastroenteritis parvoviral en animales vacunados, fue previamente reportada por (Decaro et al., 2007b) y esta situación puede deberse a que las variantes antigénicas de PVC, son posiblemente poco neutralizadas por los anticuerpos inducidos por las cepas vacunales (PVC-2).

Teniendo en cuenta que la cantidad de casos analizados es escasa, no se puede establecer ninguna conclusión de relevancia con respecto a la distribución geográfica de los casos de PVC. Tanto en la Ciudad de Buenos Aires como en los alrededores y otras regiones del país (Bahía Blanca, Mar del Plata, Tandil) se detectaron casos de PVC (Figura 26).

Se pudo establecer que de los animales con sintomatología gastrointestinal, el 63 % de los animales fue positivo, aún estando vacunados.

También debe ser destacado, que como se observa en la Tabla 5, se detectó una alta incidencia de la cepa PVC-2c en cachorros menores de 2 meses y vacunados.

Como resultado de este trabajo, se logró desarrollar y adaptar una metodología diagnóstica para la identificación de CPV y a través de técnicas complementarias como RFLP y secuenciamiento, se logró la caracterización de las cepas actuales.

Esta tecnología, representa una herramienta de gran valor epidemiológico que permitirá hacer estudios de detección temprana de la circulación viral para la implementación de medidas preventivas tendientes a evitar, la contaminación de cachorros, contribuyendo de esta manera, al control de la enfermedad.

- Appel, M.J., Cooper, B.J., Greisen, H., Scott, F., Carmichael, L.E., 1979, Canine viral enteritis. I. Status report on corona- and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet* 69, 123-133.
- Binn, L.N., Lazar, E.C., Eddy, G.A., Kajima, M., 1970, Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines. *Infect Immun* 1, 503-508.
- Brooks, W.C. 2008 4 How Parvo Infection Happens, *Veterinary Information Network*, I., ed. (<http://www.VeterinaryPartner.com/Content.plx?P=A&A=581>)
- Buonavoglia, D., Cavalli, A., Pratelli, A., Martella, V., Greco, G., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2000, Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated in Italy. *New Microbiol* 23, 93-96.
- Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., Bozzo, G., Elia, G., Decaro, N., Carmichael, L., 2001, Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol* 82, 3021-3025.
- Burtonboy, G., Coignoul, F., Delferriere, N., Pastoret, P.P., 1979, Canine hemorrhagic enteritis: detection of viral particles by electron microscopy. *Arch Virol* 61, 1-11.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1980, Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am J Vet Res* 41, 784-791.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1981, A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response. *Cornell Vet* 71, 408-427.
- Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., 1983, A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response. *Cornell Vet* 73, 13-29.
- Carpenter, J.L., Roberts, R.M., Harpster, N.K., King, N.W., Jr., 1980, Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. *J Am Vet Med Assoc* 176, 1269-1273.
- Carmichael, L.E., 1994. Canine parvovirus type-2. An evolving pathogen of dogs. *Ann. Vet. Med.* 135, 459-464.
- Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D., 2001, Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol* 24, 239-242.
- Chapek, M.L., McClaughry, L.E., Wilkins, L.M., 1980, Efficiency and safety of an inactivated feline parvovirus vaccine against canine parvovirus infection. *Mod Vet Pract* 61, 261-263.
- Costa, A.P., Leite, J.P., Labarthe, N.V., Garcia, R.C., 2005, Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. *Vet Res Commun* 29, 735-743.
- Cotmore, S.F, and Tattersall, P. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* 33:91-174.
- de Ybanez, R.R., Vela, C., Cortes, E., Simarro, I., Casal, J.I., 1995, Identification of types of canine parvovirus circulating in Spain. *Vet Rec* 136, 174-175.
- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005, Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 17, 133-138.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Trani, L.D., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005, b 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., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Buonavoglia, C., 2005, c New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 316-319.
- Decaro, N., Martella, V., Desario, C., Bellacicco, A.L., Camero, M., Manna, L., d'Aloja, D., Buonavoglia, C., 2006a, First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 53, 468-472.
- Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Roperto, S., Martella, V., Campolo, M., Lorusso, A., Cavalli, A., Buonavoglia, C., 2006b, 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., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., Cirone, F., Lorusso, E., Lucente, M.S., Narcisi, D., Scalia, P., Buonavoglia, C., 2006c, Characterisation of the canine parvovirus type 2 variants using minor groove binder probe technology. *J Virol Methods* 133, 92-99.
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D.D., Martella, V., Vieira, M.J., Elia, G., Zicola, A., Davis, C., Thompson, G., Thiry, E., Truyen, U., Buonavoglia, C., 2007, The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis* 13, 1222-1224.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Campolo, M., Lorusso, A., Mari, V., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007, b Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine* 25, 1161-1166.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005, Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods* 126, 179-185.
- Flores Castro, R., 1987, Parvovirus Canina y Aspectos de Inmunizacion. *Laboratorios Litton de Mexico*, 29.
- Greenwood, N.M., Chalmers, W.S., Baxendale, W., Thompson, H., 1996, Comparison of isolates of canine parvovirus by monoclonal antibody and restriction enzyme analysis. *Vet Rec* 138, 495-496.
- Hayes, M.A., Russell, R.G., Babiuk, L.A., 1979, Sudden death in young dogs with myocarditis caused by parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* 174, 1197-1203.
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, J.T., 2007, Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19, 535-539.
- Hueffer, K., Parrish, C.R., 2003, Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6, 392-398.
- Jones, B.R., Robinson, A.J., Fray, L.M., Lee, E.A., 1982, A longitudinal serological survey of parvovirus infection in dogs. *N Z Vet J* 30, 19-20.
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston, L., 3rd, Campbell, G., Johnson, B., 2007, Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol* 45, 4044-4047.
- Lenghaus, C., Studdert, M.J., 1982, Generalized parvovirus disease in neonatal pups. *J Am Vet Med Assoc* 181, 41-45.
- Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simarro, I., Vela, C., and Casal, I. 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* 66:2748-2753.

- Martella, V., Cavalli, A., Pratelli, A., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Narcisi, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2004, A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. *J Clin Microbiol* 42, 1333-1336.
- Martella, V., Cavalli, A., Decaro, N., Elia, G., Desario, C., Campolo, M., Bozzo, G., Tarsitano, E., Buonavoglia, C., 2005a, Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1243-1245.
- Martella, V., Decaro, N., Elia, G., Buonavoglia, C., 2005b, Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52, 312-315.
- McAdaragh, J.P., Eustis, S.L., Nelson, D.T., Stotz, I., Kenefick, K., 1982, Experimental infection of conventional dogs with canine parvovirus. *Am J Vet Res* 43, 693-696.
- Meers, J., Kyaw-Tanner, M, Bensik Z., and Zwijnenberg, R. 2007. Genetic analysis of canine parvovirus from dogs in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 85.No 10.
- Merickel, B.S., Hahn, F.F., Hanika-Rebar, C., Muggenburg, B.A., Brownstein, D.G., Rebar, A.H., DeNicola, D., 1980, Acute parvoviral enteritis in a closed beagle dog colony. *Lab Anim Sci* 30, 874-878.
- Meunier, P.C., Glickman, L.T., Appel, M.J., Shin, S.J., 1981, Canine parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings. *Cornell Vet* 71, 96-110.
- Mochizuki, M., Harasawa, R., Nakatani, H., 1993, Antigenic and genomic variabilities among recently prevalent parvoviruses of canine and feline origin in Japan. *Vet Microbiol* 38, 1-10.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T., Nguyen, N.H., Huynh, L.M., Nguyen, L.T., Nguyen, P.N., Nguyen, P.V., Nguyen, N.P., Akashi, H., 2004, A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 149, 2261-2269.
- Nelson, D.T., Eustis, S.L., McAdaragh, J.P., Stotz, I., 1979, Lesions of spontaneous canine viral enteritis. *Vet Pathol* 16, 680-686.
- Nettles, V.F., Pearson, J.E., Gustafson, G.A., Blue, J.L., 1980, Parvovirus infection in translocated raccoons. *J Am Vet Med Assoc* 177, 787-789.
- Ohshima, T., Hisaka, M., Kawakami, K., Kishi, M., Tohya, Y., Mochizuki, M., 2008, Chronological analysis of canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci* 70, 769-775.
- O'Sullivan, G., Durham, P.J., Smith, J.R., Campbell, R.S., 1984, Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis. *Aust Vet J* 61, 1-4.
- Paloheimo, O., 2007. Fluorescent Quantum Dot Labeling of Canine Transferrin Receptor with Biotin Ligase. Master's Thesis. Finland.
- Parker, J.S., Murphy, W.J., Wang, D., O'Brien, S.J., Parrish, C.R., 2001, Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* 75, 3896-3902.
- Parker, J.S., Parrish, C.R., 2000, Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* 74, 1919-1930.
- Parrish, C.R., Gorham, J.R., Schwartz, T.M., Carmichael, L.E., 1984, Characterization of antigenic variation among mink enteritis virus isolates. *Am J Vet Res* 45, 2591-2599.
- Parrish, C.R., O'Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E., 1985, Natural variation of canine parvovirus. *Science* 230, 1046-1048.

- Parrish, C.R., Have, P., Foreyt, W.J., Evermann, J.F., Senda, M., Carmichael, L.E., 1988, The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol* 69 (Pt 5), 1111-1116.
- Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991, Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 65, 6544-6552.
- Pereira, C.A., Monezi, T.A., Mehnert, D.U., D'Angelo, M., Durigon, E.L., 2000, Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol* 75, 127-133.
- Perez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., Lopez, I., Hernandez, M., 2007, First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol* 124, 147-152.
- Pollock, R.V., 1982, Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet* 72, 103-119.
- Pollock, R.V., Carmichael, L., 1979, Canine viral enteritis. Recent developments. *Mod Vet Pract* 60, 375-380.
- Pollock, R.V., Carmichael, L.E., 1982, Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination. *J Am Vet Med Assoc* 180, 37-42.
- Pollock, R.V., Carmichael, L.E., 1983, Canine viral enteritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 13, 551-566.
- Pratelli, A., Cavalli, A., Martella, V., Tempesta, M., Decaro, N., Carmichael, L.E., Buonavoglia, C., 2001, Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 612-615.
- Reed, A.P., Jones, E.V., Miller, T.J., 1988, Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* 62, 266-276.
- Rhode, S.L., 3rd, 1973, Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J Virol* 11, 856-861.
- Rice, J.B., Winters, K.A., Krakowka, S., Olsen, R.G., 1982, Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infect Immun* 38, 1003-1009.
- Robinson, W.F., Huxtable, C.R., Pass, D.A., Howell, J.M., 1979a, Clinical and electrocardiographic findings in suspected viral myocarditis of pups. *Aust Vet J* 55, 351-355.
- Robinson, W.F., Wilcox, G.E., Flower, R.L., Smith, J.R., 1979b, Evidence for a parvovirus as the aetiologic agent in the myocarditis of puppies. *Aust Vet J* 55, 294-295.
- Robinson, W.F., Huxtable, C.R., Pass, D.A., 1980a, Canine parvoviral myocarditis: a morphologic description of the natural disease. *Vet Pathol* 17, 282-293.
- Robinson, W.F., Wilcox, G.E., Flower, R.L., 1980b, Canine parvoviral disease: experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet Pathol* 17, 589-599.
- Sagazio, P., Tempesta, M., Buonavoglia, D., Cirone, F., Buonavoglia, C., 1998, Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy. *J Virol Methods* 73, 197-200.
- Saliki, J.T., Mizak, B., Flore, H.P., Gettig, R.R., Burand, J.P., Carmichael, L.E., Wood, H.A., and Parrish, C.R. 1992. Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J Gen Virol.* 73:369-374.

- Scott, F.W., 1980, Virucidal disinfectants and feline viruses. *Am J Vet Res* 41, 410-414.
- Senda, M., Hirayama, N., Itoh, O., Yamamoto, H., 1988, Canine parvovirus: strain difference in haemagglutination activity and antigenicity. *J Gen Virol* 69 (Pt 2), 349-354.
- Senda, M., Parrish, C.R., Harasawa, R., Gamoh, K., Muramatsu, M., Hirayama, N., Itoh, O., 1995, Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol* 33, 110-113.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005, High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 379-384.
- Spibey, N., Greenwood, N.M., Sutton, D., Chalmers, W.S., Tarpey, I., 2008, Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol* 128, 48-55.
- Studdert, M.J., Oda, C., Riegl, C.A., Roston, R.P., 1983, Aspects of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus. *Aust Vet J* 60, 197-200.
- Truyen, U., Platzer, G., Parrish, C.R., 1996, Antigenic type distribution among canine parvoviruses in dogs and cats in Germany. *Vet Rec* 138, 365-366.
- Truyen, U., 1999, Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 69, 47-50.
- Truyen, U. 2000. Canine Parvovirus. Recent Advances in Canine Infectious Diseases In International Veterinary Information Service, Ithaca NY
- Truyen, U., 2006, Evolution of canine parvovirus--a need for new vaccines? *Vet Microbiol* 117, 9-13.
- Tsao, J., Chapman, M.S, Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G, Compans, R.W, and Parrish, C.R. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science*. 251:1456-1464.
- van Rensburg, I.B., Botha, W.S., Lange, A.L., Williams, M.C., 1979, Parvovirus as a cause of enteritis and myocarditis in puppies. *J S Afr Vet Assoc* 50, 249-253.
- Uwatoko, K., Sunairi, M., Nakajima, M., Yamaura, K., 1995, Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet Microbiol* 43, 315-323.
- www.antechdiagnostics.com/clients/antechNews/2001/pdf/11-01.pdf
- Zkul, A., Keleş, Ü, Karaoulu, T., Abalar, M., Burugu, Ü., 2002, Detection and RFLP Analysis of Canine Parvovirus (CPV) DNA by Polymerase Chain Reaction (PCR) in a Dog. *Turk J Vet Anim Sci*. 26, 1201-1203.
- <http://servet.uab.es/avillaverde/Caan/data/figs/3-9.htm>, 2000, Principles of Molecular Virology.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

El objetivo principal de este trabajo de tesis, fue el desarrollo y la aplicación de técnicas moleculares tales como la RT-PCR y PCR para la detección rápida y específica de VDC y PVC, contribuyendo al estudio epidemiológico de ambos patógenos.

Se logró detectar la presencia de estos 2 virus a partir de muestras provenientes de animales con sintomatología clínica compatible con estas enfermedades. Asimismo, los análisis realizados a nivel molecular, por RFLP y secuenciamiento, representan los primeros estudios de caracterización de cepas de VDC y PVC circulantes en nuestro país, y constituye un importante aporte al diseño de estrategias de control de estas enfermedades.

Como trabajo a futuro, planteamos:

- 1) Ampliar los estudios epidemiológicos moleculares realizados hasta el presente, con el monitoreo de las cepas actuantes y la detección de eventuales cepas emergentes en la Argentina.
- 2) Desarrollar y adaptar metodologías para la detección de otros patógenos virales caninos cuya la sintomatología clínica puede confundirse con la de los 2 virus estudiados hasta el momento. Entre ellos se encuentran coronavirus, rotavirus, herpes y el adenovirus caninos. Esta estrategia, permitirá disponer de un set de herramientas completas, que definan claramente la etiología de las infecciones caninas más comunes.
- 3) Actualizar y perfeccionar los métodos diagnósticos desarrollados hasta el momento con la incorporación de las técnicas de PCR en tiempo real y otras.
- 4) Extender los estudios realizados para su aplicación a relevamientos epidemiológicos de cánidos silvestres, locatarios de las reservas ecológicas de nuestro país.
- 5) Desarrollar y caracterizar, para su aplicación al diagnóstico inmunológico rápido, anticuerpos monoclonales específicos para la identificación de estos patógenos caninos.
- 6) Desarrollar vacunas de nueva generación con secuencias actualizadas mediante la utilización de técnicas de ingeniería genética. En el caso de VDC, mediante el clonado de los genes de la hemaglutinina y la proteína de Fusión (F) de cepas salvajes, en vectores virales no replicativos. Para el caso de PVC, por clonado y expresión de la proteína VP2, haciendo uso de su capacidad de autoensablarse formando partículas virales con potencial inmunogénico.
- 7) Replicar cepas salvajes en cultivos celulares, para estudios biológicos de las mismas.

Cabe destacar que el desarrollo de los puntos mencionados, permitirá también, la generación de nuevos planes de trabajo y la formación de recursos humanos en nuestro

instituto, apuntalando a la formación de una nueva área de trabajo relacionada con la salud de pequeños animales.

Nombre del perro	BETA
Nombre del dueño	VANESA WOFFOT
Dirección	
Raza	FILA BRASILEIRO
Color	
Sexo	Hembra
Señas particulares	
Nacimiento	25/09/02
Plan de vacunas	COMPLETO
Marca de las vacunas	Pfizer - Merial
Fecha última vacuna	25/02/03
Serie de vacuna	A129979A - A129471CA - 45086 - 45094
Marca última vacuna	Merial
Dosis totales	3
Desparasitación	PARMADA - BASKEN
Fecha	22/02/03 - 22/06/03
Producto utilizado	PARMADA - BASKEN
Duración del tratamiento	2 DIAS c/u
Terapia antiviral	
Fecha del tratamiento	13/05/03
Dosis antiviral	} DIPENSOL y complejo B
Producto	
Antibióticos	
Tipo de muestras remitidas	SANGRE ENTERO
Sangre coagulada	SI
Sangre anticoagulada	SI
Materia Fecal	NO
Fecha toma muestras	08/07/03

Tos	
Conjuntivitis	
Fiebre	
Mocos	
Anorexia	
Piodermia abdominal	
Hiperqueratosis	
Gastroenteritis	
Tics	
Convulsiones	
Diarea	
Características de la diarrea	
Depresión Decaimiento	
Otros síntomas	
Tiempo de evolución	
Presuntivo	
Otras Infecciones	
Otros Tratamientos	
Sobrevivió	
Secuelas	
Necroplia	
Resultado anatomopatológico	
Animales relacionados	
Comentarios	Gravemente afectado por...
Motivo de la consulta	
Estudios complementarios	
Profesional a cargo	Dr. Ricardo Acosta
Domicilio	San José, Costa Rica