



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Revista

NUEVA POCA VETERINARIA



Año I Número I
Junio 2008

Costo de Recuperación \$10.00



IDENTIFICACIÓN DE UNA VARIANTE GENÉTICA DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO EN CASOS CLÍNICOS DE PERROS VACUNADOS EN MÉXICO.

²M Barrera- Mejía, ¹J Simón-Martínez, R Ulloa-Arvizu, VE Soriano, R Fajardo.

²M Barrera- Mejía, ¹J Simón-Martínez, R Ulloa-Arvizu, VE Soriano, R Fajardo.

¹J Simón-Martínez. Es profesor investigador de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UAEM; adscrito al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Comentarios o interesados sobre las líneas de investigación, contactarlo con el correo: simonmc@uaemex.mx

²M Barrera-Mejía. Médico Veterinario Zootecnista, actualmente cursa la maestría en ciencias agropecuarias y recursos naturales PCARN dentro de la línea de investigación de biotecnología analizando la diversidad genética del virus de la necrosis pancreática infecciosa. magda_barrera@hotmail.com

El distemper canino (DC) es una enfermedad viral altamente contagiosa y algunas veces puede ser mortal en perros y otros carnívoros. La patogénesis y características clínicas del DC han sido ampliamente reportados (Apple et al., 1996); la enfermedad tiene una distribución mundial. El virus del DC (VDC) pertenece al género *Morbillivirus* dentro de la familia *Paramixoviridae*, es un virus envuelto de RNA de hebra sencilla de sentido negativo no segmentado de aproximadamente 15,616 nucleótidos. Dentro de su genoma existen seis genes que codifican: uno para una proteína asociada a membrana, este gen mide 1442 nucleótidos (M), dos genes para glicoproteínas (el H que mide 1947 nucleótidos que codifica para la proteína de unión hemoaglutinina y el gen F de 2205 nucleótidos que codifican para la proteína de fusión), el gen P de 1655 nucleótidos que codifica para la fosfoproteína y el gen L de 6573 nucleótidos que codifica para una proteína grande con actividad de transcriptasa; el gen N que codifica para la nucleocápside que encapsula el RNA viral mide 1683 nucleótidos (Sidhu et al., 1993). Una proteína no estructural (C) es producida por un marco de lectura abierto (ORF) alternativo en el gen P (Lamb et al., 2001).

La principal forma de control del DC se realiza mediante el uso de vacunas (Chappuis, 1995). Sin embargo, se han documentado muchos brotes de la enfermedad en perros vacunados (Józwik y Frymus, 2002). Una de las principales causas por lo que no se obtiene una adecuada respuesta inmune después de la vacunación es debido a la diversidad genética que presentan los virus de RNA, lo que puede producir cambios en las proteínas antigénicas del virus, logrando con esto que los anticuerpos vacunales no reconozcan a virus con variantes genéticas. Ejemplo de esta diversidad genética es el caso de Japón (Asia) en donde se han clasificado dos variantes del VDC basándose en el análisis de su secuencia genómica (Hashimoto et al., 2001) y de América en donde se han encontrado tres variantes del VDC analizando la secuencia completa del gen P y las secuencias parciales de los genes H y F (Pardo et al., 2005).



Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue identificar la diversidad genética del VDC obtenidos de perros previamente vacunados y que posteriormente presentaron un cuadro clínico característico de la enfermedad.

MATERIAL Y METODOS

Para identificar la diversidad genética del gen N, un fragmento de 640 pb se obtuvo a partir de muestras de suero colectadas de dos perros mexicanos que provenían de diferentes lugares. Ambos perros tenían un año de edad aproximadamente y mostraban signos clínicos de DC (diarrea, tos, descarga nasal, mioclonos e hiperqueratosis en cojinetes plantares). De 2-3 meses antes de presentar la enfermedad, los perros habían sido vacunados y revacunados por lo menos una vez, usando una vacuna comercial del VDC que contenía la cepa Onderstepoort (Intervet).

Para la extracción de RNA se utilizaron 250 μ l de suero sanguíneo utilizando Trizol (Invitrogen), la técnica se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La pastilla de RNA fue resuspendida en 15 μ l de agua tratada con 1% de dietil pirocarbonato. Para la amplificación de un segmento del gen N del VDC, un par de iniciadores fue diseñado en base a la secuencia de la cepa Onderstepoort (Número de acceso al banco de genes: AF305419): sentido (MNPF) 5' TCT GAG GCA GAT GAG TTC TT 3' y antisentido (MNPR) 5' CCA TAG CAT AAC TCC AGA GC 3'. La amplificación se hizo utilizando RT-PCR de un solo paso (Invitrogen). Los productos de PCR fueron clonados dentro de un vector TOPO II utilizando el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Sólo 2 mg de plásmidos purificados se obtuvieron y después la secuencia de nucleótidos se obtuvo de la cadena de DNA, usando un kit comercial, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se realizó en un Analizador Genético 3100 (Applied Biosystem).

RESULTADOS

Las secuencias obtenidas mostraron 100% de identidad entre ellas y fueron nombradas CIESAJSMC (Número de acceso al banco de genes: AF164967). Estas secuencias se compararon con la secuencia de cepa vacunal Onderstepoort (Número de acceso al banco de genes AF305419) y con A75/17 (Número de acceso al banco de genes AF164967), considerada como prototipo virulento de campo de cepas del VDC (Fig. 1).



Onderstepoort	TCTGAGGCAGATGAGTTCTTCAAATTTGTAGACGGAAGGGTCTCAAGGGCAATTA	60
A75/17A.....	540
CIESAJSMCG.....G.....G.....A.....	540
Onderstepoort	GGCTGGTTAGAGAATAAGGATATAGTAGACATAGAAGTTGATAATGCTGAGCAATTCAAT	120
A75/17G.....T.....G.....	600
CIESAJSMCG.....T.....G.....	600
Onderstepoort	ATATTGCTAGCTTCCATCTTGGCTCAAATTTGGATCCTGCTAGCTAAAGCGGTGACTGCT	180
A75/17C.....C.....A.....	660
CIESAJSMCA.....G.....C.....A.....C.....	660
Onderstepoort	CCTGATACTGCAGCCGACTCGGAGATGAGAAGGTGGATTAAGTATACCCAGCAAAGACGT	240
A75/17A.....G.....	720
CIESAJSMCT.....A.....G.....	720
Onderstepoort	GTGGTCCGAGAATTTAGAATGAACAAATCTGGCTTGATATTGTTAGAAACAGGATTGCT	300
A75/17G.....C.....A.....A.....	780
CIESAJSMC	780
Onderstepoort	GAGGACCTATCTTTGAGGCGATTTCATGGTGGGCTCATCTTGGACATCAAACGATCCCCA	360
A75/17T.....G.....A.....T.....	840
CIESAJSMCT.....A.....G.....A.....T.....	840
Onderstepoort	GGGAACAAGCCTAGAATTGCTGAAATGATTTGTGATATAGATAACTACATTGTGGAAGCT	420
A75/17	900
CIESAJSMCG.....	900
Onderstepoort	GGGTAGCTAGTTTCATCCTAACTCAAGTTTGGCATTGAAACTATGTATCCGGCTCTT	480
A75/17	..A.....T.....A.....	960
CIESAJSMC	..A.....T.....A.....	960
Onderstepoort	GGGTTCATGAGTTTCCGGAGAATTAACAATTTGAATCCCTCATGATGCTATATCAA	540
A75/17G.....T.....	1020
CIESAJSMCG.....G.....C.....T.....G.....	1020
Onderstepoort	CAGATGGGTGAAACAGCACCGTACATGGTTATCTTGGAAAACCTGTTCAAACAATTT	600
A75/17TC.....T.....G.....	1080
CIESAJSMCG.....TC.....T.....C.....G.....	1080
Onderstepoort	AGTGCAGGGTCTACCCATGCTCTGGAGTTATGCTATGGA	640
A75/17A.....G	1120
CIESAJSMCA.....	1120

Figura 1. Secuencia de nucleótidos de 640 pb del gen N fragmentos de las secuencias aisladas CIESAJSMC (Número de Acceso al banco de genes DQ887333) comparadas con las secuencias de las cepas de referencia Onderstepoort (Número de acceso al banco de genes AF305419) y A75/17 (Número de acceso al banco de genes AF164967). Las secuencias comienzan en el nucleótido 480. Los puntos (.) indican identidad.

Utilizando la secuencia obtenida, una comparación realizada en la base de datos BLAST en el banco de genes encontró 32 secuencias diferentes de cepas y aislados de referencia del VDC. Y también se encontró una similitud del 93-97% entre estas cepas y aislados con la secuencia CIESAJSMC. Sin embargo, basándose en la alta variabilidad de la longitud de las secuencias reportadas, estas fueron editadas para formar una secuencia de 260 pb. Doce cepas reportadas en el banco de genes mostraron 100% de similitud entre ellas por lo que fueron excluidas del estudio, el resto de las cepas se incluyeron en el análisis de relación filogenético y estas son: Onderstepoort a (AF305419), Onderstepoort b (AY684629), Cepa vacunal de Brasil (AY738625), Ping Tung (DQ435615), TN (AY390348), MVC2002 (DQ003302), 98-2654 (AY466011), Rockborn (AF166273), 1127Gi95 (AF166268), 2495Gi95 (AF166271), 2544Han95 (AJ009656), 5804P (AY386316), 2852/Gi95 (AF166272), IP3045 (DQ005128), IP4712 (DQ005130), IP2705



(DQ005132), IP2392 (DQ005127), IP3288 (DQ005129) y IP1407M (AY738624). Una secuencia del Virus del sarampión (AB032167) fue utilizada como raíz del árbol filogenético.

El alineamiento múltiple de secuencias, análisis molecular y filogenético se realizó utilizando el paquete de software MEGA 3.1 como lo reporta (Kumar et al., 2004). Los datos de las secuencias fueron analizados usando distancias corregidas para múltiples hits por el método de dos parámetros de Kimura. Con esta distancia, un árbol filogenético fue construido con el método neighbour-joining. El error estándar fue computarizado por el método bootstrap usando 1000 replicas.

Las transiciones fueron sólo observadas entre los haplotipos del VDC. La distancia genética promedio fue de 0.031 ± 0.006 , considerando los haplotipos del VDC ($n=20$). La distancia genética menor tuvo un valor (0.022) y fue observada entre la cepa mexicana (CIESAJSMC), la cepa de la vacuna Rockborn y las cepas de Estados Unidos de América (01-2689, 00-2601, A75/17, 98-2645 y 98-2646), mientras que la distancia mayor fue con la cepa de referencia Onderstepoort (0.07). La secuencia CIESAJSMC fue también analizada con las cepas alemanas (1127/Gi95 y 2495/Gi95), y obtuvo distancias de 0.032 y 0.031, respectivamente (Fig. 2).

CONCLUSIONES

Las mutaciones más reportadas son la de los genes que codifican para la proteína hemoaglutinina H, la proteína de fusión F y la proteína de la nucleocápside N (Mochizuki et al., 1999). En este estudio se analizó una región del gen N, el más conservado de estos genes. Basándose en estas características, nosotros asumimos que el análisis filogenético del gen N puede ser el más adecuado de los tres genes mencionados para identificar nuevos linajes genéticos. Los resultados obtenidos indican la existencia de una variante genética del VDC en México.

La calidad de la vacuna, las revacunaciones, una respuesta inmune baja y la diversidad genética del VDC son las principales causas de fallas en la protección conferida por las vacunas contra DC (Lan et al., 2006). La diversidad genética puede ser un factor importante en el control de la enfermedad y nuevas variantes genéticas del VDC pueden estar asociadas con los cambios en la patogénesis, o en algunas instancias, con la evasión inmune en perros vacunados (Martella et al., 2006). Las proteínas H y F son las más antigénicas para la respuesta inmune, en donde se ha encontrado la mayor variación genética y antigénica. Los resultados del presente estudio proveen poca información acerca de las razones aparentes de distemper canino en perros vacunados. Sin embargo, cambios en la secuencia de nucleótidos en el gen N son consistentes con cambios en el gen H (Yoshida et al., 1997).

Trabajos futuros podrían enfocarse en el estudio de un gran número de muestras clínicas de perros vacunados y no vacunados donde se podrían analizar los tres genes (H, F y N).

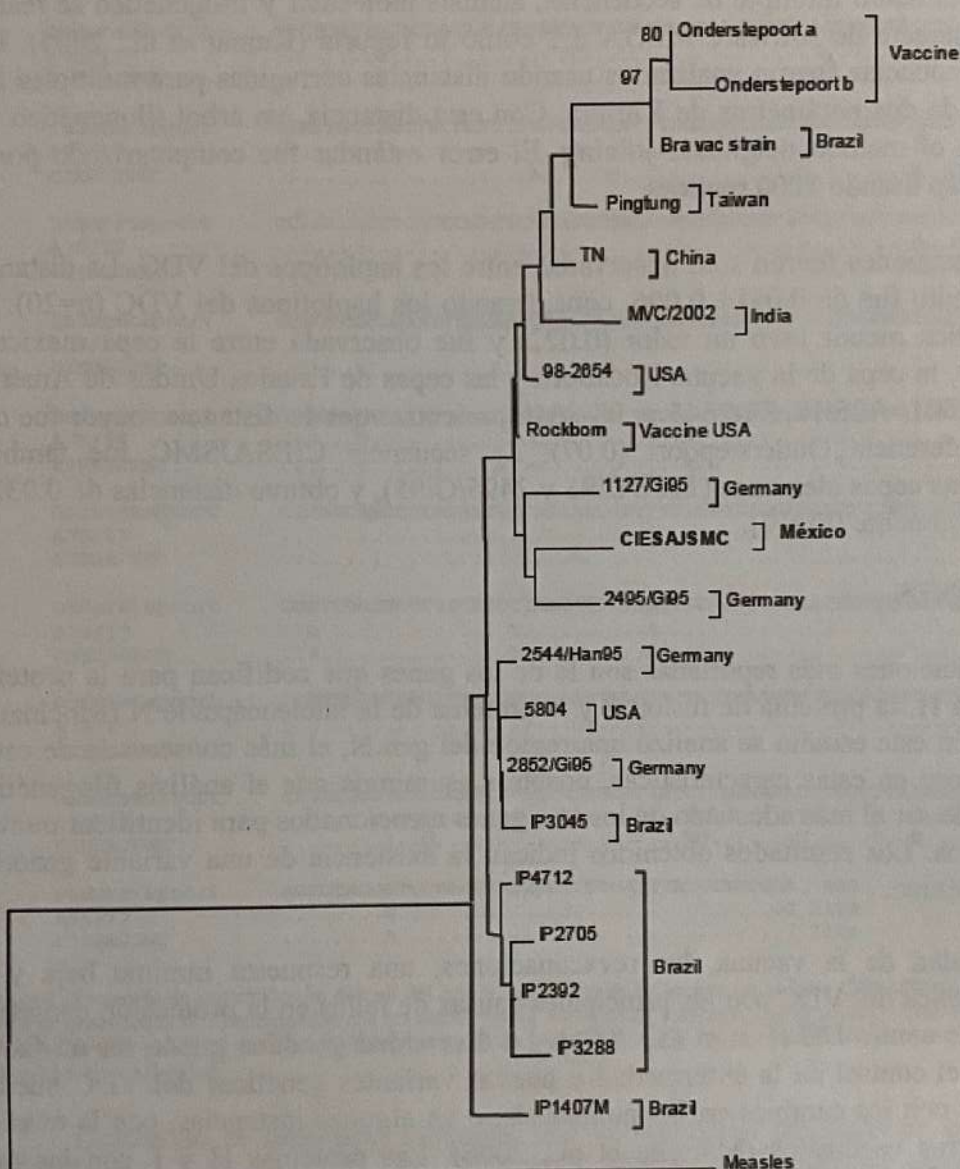


Figura 2. Árbol Neighbour-Joining enraizado con el virus del sarampión, construido usando el parámetro 2 de Kimura para la distancia entre haplotipos. Los números de los nodos son series de valores obtenidos de 1000 repeticiones (Los valores <50% no se muestran).

REFERENCIAS

- Appel, M.J., 1969: Pathogenesis of canine distemper. American Journal of Veterinary Research 30,1167-1183.
- Chappuis, G., 1995: Control of canine distemper. Veterinary Microbiology 44, 351-358.
- Hashimoto M., Une Y., Mochizuki M., 2001: Hemagglutinin genotype profiles of canine distemper virus from domestic dogs in Japan. Archives of Virology, 146:149-155.



- Józwik, A., Frymus T., 2002: Natural distemper in vaccinated and unvaccinated dogs in Warsaw. *Journal of Veterinary Medicine, series B* 49, 413-414.
- Kumar, S., Tamura K., Nei M., 2004: MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5,150-63.
- Lamb, R. A., and Kolakofsky, D., 2001: Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D.M. and Howley P.M. (eds), *Fundamental virology*. 4th ed. pp. 689-724. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Lan, N.T., Yamaguchi R., Inomata A., Furuya Y., Uchida K., Sugano S., Tateyama S., 2006: Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology* 115, 32-42.
- Martella, V., Cirone F., Elia G., Lorusso E., Decaro N., Campolo M., Desario C., Lucente M. S., Bellacicco A. L., Blixenkrone-Møller M., Carmichael L.E., Buonavoglia C., 2006: Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology* 116, 301-309.
- Mochizuky, 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. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2936-2942.
- Pardo I., Johnson G., Kleiboeker S., 2005: Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (10): 5009-5017.
- Sidhu, M. S., Husar W., Cook S. D., Dowling P. C., Udem S. A., 1993: Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV sequence. *Virology* 193, 66-72.
- Yoshida, E., Iwatsuki K., Miyashita N., Gemma T., Kai Ch., Mikami T., 1998: Molecular 149 analysis of the nucleocapsid protein of recent isolate of canine distemper virus in Japan. *Veterinary Microbiology* 59, 237-244.

Nota: El artículo original en su versión del inglés fue aceptado para su publicación en el *Veterinary Journal* y puede ser encontrado en el PUBMED bajo la siguiente referencia:

Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet. J.* 2008; 175 (3):423-426.