



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANTIGÉNICAS DE UN
AISLADO MEXICANO DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO CONTRA DOS
CLADOS GENÉTICAMENTE DISTANTES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

ERIKA NAYELI SALAZAR JIMÉNEZ

Asesores

Biol. Amanda Gayosso Vázquez

Dr. Rogelio Alonso Morales



Ciudad Universitaria CD, MX, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mis familiares y amigos por estar conmigo en todo momento, llenando mí vida de aprendizaje, amor y mucha risa, pero en especial a quién ha sido mi guía, mi madre, que siempre ha escuchado lo que tengo que decir, por ser mi más grande confidente, por todo su apoyo, por ser una mujer ejemplar e impecable en cada aspecto de la vida, por enseñarme a ser feliz y amar lo que hago.

AGRADECIMENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segundo hogar y darme la oportunidad de cambiar mi vida.

A la Facultad de Medicina de Veterinaria y Zootecnia por ser fuente de excelentes profesionistas, que orientaron mi camino durante mis años de formación.

A la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez por la capacitación brindada, por su invaluable apoyo, asesoría y por ser mi modelo a seguir en la vida profesional.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por la paciencia y el apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por compartir conmigo su conocimiento y experiencia, gracias Adriana Martínez, Jorge Vázquez, Pablo Pintor, Carolina Durán, Jessica Molina, Vianey Ramírez, Mario Fragosso, Marco Juárez, Liz Toiber y Alejandro Valdez.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN.....	11
HIPOTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Proteínas estructurales de CDV con el peso correspondiente.....	5
Cuadro 2. Cepas de CDV utilizadas en este estudio y su procedencia.....	13
Cuadro 3. Inventario de sueros de perros obtenidos de casos clínicos que resultaron positivos a la prueba de diagnóstico de CDV que resultaron positivos a la prueba de PCR-RT.....	14
Cuadro 4. Condiciones de temperatura para la cuantificación de las cepas de CDV por qPCR	19
Cuadro 5. Volumen y la cantidad de antígeno obtenidos concentrando con PEG y cuantificando por Bradford	22
Cuadro 6. Número de copias/ml de cada cepa, obtenido en el ensayo de PCR en tiempo real.....	27
Cuadro 7. Peso molecular (kd) de los antígenos detectados por Western blot, utilizando sueros hiperinmunes elaborados en conejo	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol filogenético basado en el gen H de CDV	9
Figura 2. Micrografía 10X de cultivos celulares infectados	21
Figura 3. ELISA indirecto utilizando sueros homólogos para cada cepa de virus de Distemper canino.....	24
Figura 4. ELISA Indirecto utilizando los sueros de perro contra la cepa Onderstepoort.....	25
Figura 5. ELISA indirecto cruzado de cuatro cepas de CDV contra los diferentes antisueros de conejos.....	27
Figura 6. Western blot de las diferentes cepas virales contra los antisueros elaborados en conejos	28
Figura 7. Western blot de las diferentes cepas virales contra dos sueros de perros.....	31

RESUMEN

ERIKA NAYELI SALAZAR JIMÉNEZ, Estudio comparativo de las características antigénicas de un aislado mexicano del virus de Distemper canino contra dos clados genéticamente distantes, (bajo la asesoría de la Biól. Amanda Gayosso Vázquez y el Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales).

La enfermedad de Distemper canino afecta diversas especies de carnívoros. Su genoma codifica para 6 proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de gran tamaño (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F).

Se sabe que variaciones genéticas de las cepas circulantes, pueden estar acompañadas de variaciones antigénicas, generando diferencias con las cepas vacunales.

En la última década se han identificado nuevas cepas circulantes del virus de Distemper canino (CDV por sus siglas en inglés) en diferentes partes del mundo, en México esto fue confirmado durante 2015 por González, quien realizó estudios con el gen de la Hemaglutinina.

En este estudio se evaluaron las características antigénicas del aislado mexicano UNAM de CDV (González, 2015), en comparación a cepas vacunales de los clados América 1 y una cepa del clado América 2, utilizando

antisueros producidos en conejo contra esas cepas. Se encontró que el mismo suero puede reconocer diferentes proteínas de acuerdo a la cepa a la cual es expuesto, pero también comparten proteínas en común al reconocimiento del suero.

Caracterizar cepas circulantes en el país (cepa UNAM), permitirá generar un método diagnóstico que pueda detectar el virus en animales que presenten signología, aún con antecedentes de vacunación, para llegar a controlar la enfermedad de una forma específica.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Distemper canino, también conocida como Enfermedad de Carré o Moquillo canino, se caracteriza por tener una presentación aguda o subaguda, afecta a las especies de las familias *Canidae* (perro, coyote, dingo, chacal, lobo), *Procyonidae* (panda, mapache) y *Mustelidae* (comadreja, hurón, visón). (Dung Van, 2017, Fenner, 1987); este padecimiento es producido por el virus de Distemper canino (CDV por sus siglas en inglés), que pertenece al orden de los Mononegavirales, familia *Paramyxoviridae*, género *Morbilivirus*. Es una enfermedad sistémica severa, caracterizada por una variedad de cuadros clínicos que incluyen signos como: fiebre, enteritis, descarga nasal, dificultad respiratoria y desórdenes neurológicos. La ruta más importante de transmisión es a través de aerosoles al tracto respiratorio superior (Vandeveld, 1995), por lo que resulta ser una enfermedad vírica importante (Mohanty 1984, Fenner 1987, Appel 1987, Beinke 2009, Litster 2012) ya que, ocasiona una morbilidad y una mortalidad de aproximadamente el 50% (Beinke, 2008) en las poblaciones no vacunadas de todo el mundo (Fenner, 1987).

En el proceso de infección hacia su hospedero, no es necesario que la partícula viral se forme por completo para poder infectar otras células, ya que con la expresión de las glicoproteínas de envoltura se induce la fusión de la membrana de la célula hospedera con células vecinas y de esta manera se transfieren las nucleocápsides de una célula a otra sin exponerse al exterior de la célula, por lo

que la formación de sincitios es una característica citopatológica, al igual que las inclusiones acidófilas en el citoplasma, a pesar de que la replicación viral se lleva en el citoplasma, los morbilivirus producen también inclusiones acidófilas intranucleares (Appel 1987, Fenner 1987, Mohanty 1984, Murphy 1999, Olsen 2000). La eliminación del virus comienza aproximadamente a los siete días postinfección, por lo que la formación de anticuerpos neutralizantes por el organismo del hospedero es imprescindible para enfrentar la enfermedad, estos aparecen a partir del día 6 después de la exposición y alcanzan su valor máximo 3-5 semanas más tarde; los animales infectados que logran vivir, eliminan el virus mediante secreciones corporales independientemente de la presencia de signos clínicos (Tizzano, 2013).

CDV es sensible al calor, se inactiva por el tratamiento a temperaturas entre 50 y 60°C por 30 minutos (Tizzano 2013, Appel 1987), y a la luz ultravioleta, su actividad en tejidos extraídos de perros infectados, es de por lo menos una hora a 37° C y tres horas a temperatura ambiente (20-24° C). Conserva una infectividad de al menos 5 semanas entre 0°C - 4°C, puede mantenerse infectivo por años a temperaturas de -70 y -192° C. Es estable a pH entre 4.5 y 9. Es sensible al éter, cloroformo, soluciones de formalina diluida (0,5%), fenol (0,75%) y desinfectantes de cuaternario de amonio (0,3%).

El CDV está formado por una nucleocápside de naturaleza proteica, con un genoma viral de ARN de cadena simple y polaridad negativa con una longitud de entre 15,200 a 15,900 nucleótidos, el cual codifica para 6 proteínas estructurales: proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteína de gran

tamaño (L), proteína de matriz (M), hemaglutinina (H) y proteína de fusión (F). Además, codifica para dos proteínas no estructurales alternativas del gen P denominadas C y V, se ha sugerido que estas proteínas accesorias se involucran en la evasión de la respuesta inmune mediada por el interferón β (Noriyuki, 2013).

Cuadro 1. Proteínas estructurales de CDV con el peso correspondiente a cada una de ellas.

Proteína	Peso (kd)
Nucleoproteína (N)	60-62
Fosfoproteína (P)	73-80
Hemaglutinina (H)	65-80
Matriz (M)	35-41
Fusión (F)	F ₀ 60, F ₁ 41, F ₂ 18
Larga (L)	200-247

Proteína de la nucleocápside (N)

Es la principal proteína viral, pliega y protege al genoma, (Diallo, 1990), juega un papel importante en el ensamblaje, replicación, transcripción y persistencia de la infección (Stettler, 1995).

Fosfoproteína (P)

Su gen mide 1.5 kb, codifica para una proteína estructural (P) y dos no estructurales (C y V). Es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación. Es esencial para la replicación viral y se involucra en todos los aspectos del ciclo viral.

Proteína larga (L)

El gen de la proteína larga es el último transcrito por el virus, asociado con las proteínas N, P y el ARN genómico forma la nucleocápside. Debido a su gran tamaño, tiene un peso molecular de aproximadamente 247 kd (Blumberg et al., 1988).

Proteína de matriz (M)

La proteína de la matriz se encuentra debajo de la bicapa lipídica y sirve como un enlace entre la nucleocápside y las dos glicoproteínas superficiales (H y F).

Se cree que desempeña una función importante durante la maduración del virus, ya que, algunos defectos en el gen M durante la transcripción y la traducción de ARNm, así como la estabilidad de la proteína M se han descrito como causas que impiden al virus completar su ciclo infeccioso.

Proteína de fusión (F)

La proteína de fusión es una glicoproteína de superficie, es fundamental entre la fusión el virus y la célula infectada o entre la célula infectada y una célula no infectada adyacente, lo que le da un papel esencial en la propagación del virus dentro del huésped. Se sintetiza como un precursor, Fo, que posteriormente es escindido por una proteasa a dos proteínas, FI y F2, unidas entre sí por un enlace disulfuro. La transformación de Fo en FI y F2 es necesaria para la actividad biológica de la proteína, y cualquier evento que pudiera impedir la división conduce a una disminución de la virulencia.

Hemaglutinina (H)

Es uno de los antígenos más importantes para inducir inmunidad protectora contra el CDV (Von Messling, 2001), estudios comparativos han revelado que el gen H presenta una mayor variabilidad genética que los otros genes, característica que la hace adecuada para el análisis genético. Basándose en la alineación de nucleótidos de este gen, se han clasificado diferentes genotipos de CDV, en el 2010 se conocían siete de ellos: América-1 (cepas de vacuna), América-2, Europa, Ártico, Asia-1, Asia-2 y fauna silvestre europea. Siete años después este número se incrementa a 14, incluyendo Asia-1, Asia-2, Asia-3, Asia-4, Europa, Fauna silvestre europeo, Ártico, Rockborn-like, America-1, America-2, África, Sur America-1, Sur America-2 y Sur America-3. (Dung Van, 2017).

Se han encontrado diferencias en el patrón de glicosilación de la proteína H, estas variaciones llegan a modificar epítomos relacionados con la neutralización viral (Iwatsuki et. al. 2000). Se sabe que variaciones genéticas de las cepas circulantes, pueden estar acompañadas de variaciones antigénicas, generando diferencias con las cepas vacunales (Swati, 2015, Noriyuki, 2013, Iwatsuki, 2000); se ha demostrado que los sueros producidos contra cepas de CDV de campo, tienen títulos neutralizantes 10 veces mayores contra virus homólogos, que contra las cepas vacunales (Martella et al, 2006).

En la última década se han identificado nuevas cepas circulantes de Distemper canino en diferentes partes del mundo, como Sudáfrica, Japón, Chile, Argentina, Tailandia. En el 2011 en México, Gámiz et. al, realizaron un análisis filogenético de los genes H y N de cepas de CDV circulantes en el país, obtenidas durante los años 2007 y 2010, logrando distinguir 10 variantes genéticas que constituyen un grupo único, claramente distinto de las cepas vacunales y de cepas de campo circulantes en otras partes del mundo (figura 1).

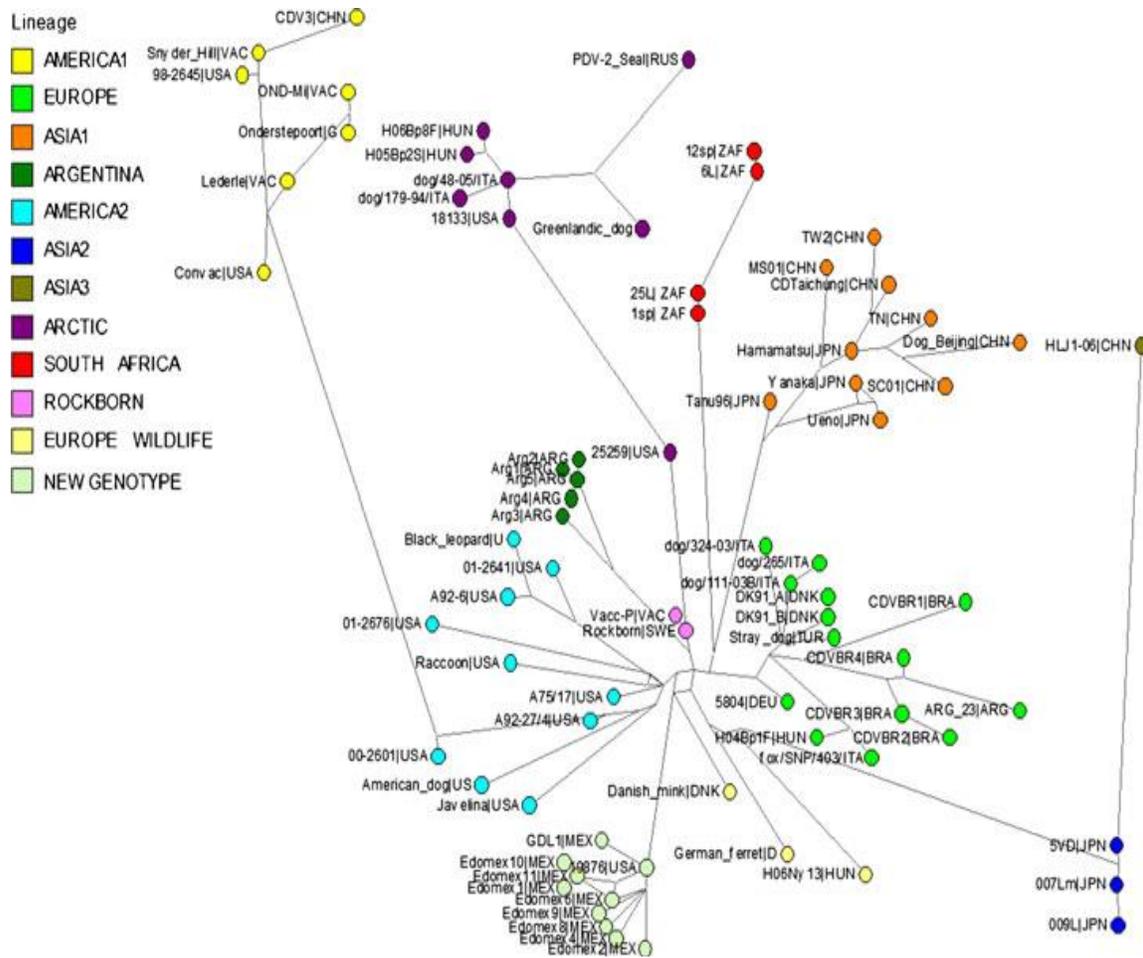


Figura 1. Árbol filogenético basado en el gen H de CDV, se observan las variantes mexicanas (color verde agua), alejadas de las cepas vacunales (color amarillo) y del resto de las cepas identificadas globalmente (Gámiz 2011).

Este grupo genético único de CDV presente en México, fue confirmado mediante un estudio de variabilidad genética realizado en el Laboratorio de Genética Molecular, FMVZ (González, 2015), donde se evaluaron 53 muestras clínicas sospechosas a CDV, 27 resultaron positivas, de las cuales en 21 muestras se amplificó y secuenció el gen de la Hemaglutinina (H).

También se obtuvo un aislamiento de CDV circulante, denominado UNAM, el cual se caracterizó mediante la secuenciación del gen H de CDV, resultando pertenecer al mismo clado mexicano representativo reportado por Gámiz et. al. 2011.

Justificación

Aunque se han descrito diferencias genéticas, entre las cepas circulantes de Distemper canino en México, las cepas de otras regiones geográficas y las cepas vacunales, no se ha comprobado si éstas presentan cambios antigénicos. Esto es de particular relevancia, ya que, si existen diferencias antigénicas notables, estas podrían llevar a que las vacunas presenten un nivel reducido de protección, además de un deficiente reconocimiento por parte de sistemas de diagnóstico serológico comerciales. Se tiene información que sugiere que este puede ser el caso, en el estudio realizado por González durante el año 2015, varias muestras clínicas sospechosas a CDV, resultaron positivas mediante la prueba de PCR-TR, y la historia clínica indica que provenían de individuos vacunados.

Estudios antigénicos podrían proporcionar información para evidenciar cambios de esta naturaleza, así como inferir los componentes virales que participan en ellos. Estos estudios pueden fundamentar la necesidad de generar inmunógenos y sistemas de diagnóstico específicos para las cepas circulantes, ayudando a controlar de una manera eficaz esta enfermedad de alto impacto en la salud canina.

Hipótesis

Las variedades de Distemper canino del clado mexicano presentan características antigénicas diferentes a las cepas vacunales y de otros clados.

Objetivo

Estudiar las características antigénicas del aislado mexicano UNAM de Distemper canino en comparación a dos cepas vacunales de los clados América 1 y una cepa del clado América 2.

Objetivos particulares

Evaluar la reactividad cruzada entre sueros hiperinmunes de conejo específicos para cuatro diferentes cepas virales de CDV (A75/17, Lederle, Onderstepoort y UNAM) y estas cepas.

Identificar los antígenos presentes en cuatro cepas de CDV, empleando antisueros de conejos y antisueros de casos clínicos de perro.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Material biológico.

Las cepas virales utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

Cuadro 2. Cepas de CDV utilizadas en este estudio y su procedencia.

Cepa	Procedencia
A75/17 (clado América 2)	Proporcionadas por el Dr. José Simón Martínez Castañeda, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA UAMEX).
Lederle (clado América 1)	
Onderstepoort (clado América 1)	
UNAM	Aislamiento de un caso clínico (González 2015).

Antisueros

Se utilizaron antisueros de conejo para cada cepa viral, previamente producidos en el Laboratorio de Genética Molecular (2 conejos/cepa). Además, se empleó una batería de sueros de perros vacunados y no vacunados contra CDV, obtenidos de muestras clínicas de hospitales de la ciudad de México, Chihuahua y Quintana Roo durante el 2015. Estos sueros fueron positivos al CDV por la técnica de RT-PCR en tiempo real (González 2015).

Cuadro 3. Inventario de sueros de perros obtenidos de casos clínicos que resultaron positivos a la prueba de diagnóstico de CDV en PCR-RT.

ID-Lab	ID original	Positivos a la prueba de CDV	Procedencia	Vacunación
1	K 31EID	Si	Chihuahua	No
2	K 5/RO/D	Si	Chihuahua	No
3	K EI/D	Si	Chihuahua	No
4	K4/RO/D	Si	Chihuahua	No
5	K/17/C/D	Si	Chihuahua	No
6	K 6/RO/D	Si	Chihuahua	No
7	K 13/SP/D	Si	Chihuahua	No
8	2	Si	Playa de Carmen	No
9	3	Si	Playa de Carmen	No
10	4	Si	Playa de Carmen	No
11	5	Si	Playa de Carmen	No
12	6	Si	Playa de Carmen	No
13	7	Si	Playa de Carmen	No
14	S. Tyson	Si	Sueros casos clínicos	Si
15	S. 686	Si	Sueros casos clínicos	Si
16	S.1714	Si	Sueros casos clínicos	Si
17	S.Perrita Negra MS	Si	Mercado de Sonora	Si
18	S.Perrita Blanca MS	Si	Mercado de Sonora	Si
19	S.Bartola 1 y 2	Si	Sueros casos clínicos	Si
20	S.Boss	Si	Sueros casos clínicos	Si
21	S. Flor burbuja	Si	Sueros casos clínicos	Si

*ID: Identificación

Los crecimientos virales se realizaron en la línea celular Vero (Células epiteliales de Riñón de mono verde) en medio Dulbecco's Minimal Esencial Medium (DMEM), adicionando 10% de suero fetal de bovino (SFB) y antibiótico (Penicilina 10,000 u/ml, Estreptomina 10,000 u/ml, Amfotericina B a 25 µg/ml).

La propagación de las cuatro cepas virales, fue realizada en botellas T75 (una botella por cepa), colocando 4×10^6 células en un volumen de 10 ml/botella de medio (DMEM/SFB/ antibiótico/ TPB, SFB al 2%), a las 24 horas, con un monoestrato celular al 80% de confluencia, se llevó a cabo la infección agregando 1 ml de cada cepa de CDV, incubando a 37°C y observando efecto viral a las 48 y 96 h.

Los virus fueron cosechados a los 5 días postinfección, lisando las células mediante tres ciclos de congelamiento (-70°C) y descongelamiento. El lisado viral se centrifugó a 1,280g/10 min, para eliminar restos celulares. El sobrenadante fue recuperado y el virus fue concentrado mediante precipitación con PEG (Polietilenglicol 8000, Sigma P 2139), añadiéndolo a una concentración final del 10%, incubando en agitación a 4°C por 12 horas, posteriormente se centrifugó a 2,650 g por 30 min, las pastillas se resuspendieron en 3 ml de PBS estéril. Se realizó una segunda precipitación agregando 750 µl de una mezcla de PEG 20%/NaCl 2.5M, incubando 12 horas en agitación a 4°C; concentrando por centrifugación a 2650g/15 min, la pastilla obtenida fue resuspendida en 3 ml PBS estéril. Finalmente, la cuantificación de los diferentes antígenos (cepas virales), se llevó a cabo por la prueba de Bradford.

Para determinar la reactividad de cada antígeno purificado, se realizó la prueba de ELISA indirecta, sensibilizando una placa de microtitulación de 96 pozos con 1 µg de antígeno en 100 µl de buffer de carbonatos 1X (carbonato de sodio 0.1 M, bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6), realizando diluciones quíntuples seriadas en volumen final de 100 µl/pozo, incubando a 4°C durante 12 h. En seguida, el contenido se eliminó por inversión vigorosa, realizando tres lavados, de 5 minutos cada uno, en agitación, con 150µl /pozo de solución de lavado (cloruro de sodio 125 mM, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween-20 0.1%) decantando por inversión vigorosa en cada lavado; posteriormente se adicionaron 100µl /pozo de buffer de bloqueo (leche descremada 5%, en Buffer de lavado 1X) incubando a 4°C/1h, eliminando el buffer por inversión vigorosa, efectuando tres lavados de 5 minutos cada uno, en agitación, con 150µl/pozo de solución de lavado. Se colocaron 100µl/pozo del primer anticuerpo diluido 1:100 (suero hiperinmune diluido en buffer de bloqueo), incubando a 37°C/1h, el contenido de la placa se eliminó por inversión vigorosa, se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno en agitación, con 150µl/pozo de solución de lavado 1X; se adicionaron 100µl/pozo del conjugado anti IgG (Inmunoglobulina de conejo acoplado a peroxidasa) diluido 1:500 (en buffer de bloqueo) y previamente determinado por la prueba de máxima densidad óptica, se incubó a 37°C/1h, el contenido de la placa se eliminó por inversión vigorosa, se realizaron cinco lavados, de 5 minutos cada uno en agitación con 150µl/pozo de solución de lavado 1X. La reacción fue revelada con 100µl/pozo de una solución de ácido cítrico 100 mM pH 4.5, citrato de sodio 100 mM pH 4.5, orto-fenilen-diamina (OPD) y peróxido de hidrogeno al 30%, incubando a temperatura ambiente por

5 minutos (cubierta de la luz), la reacción se detuvo con 50 μ l de ácido sulfúrico 2N, realizando la lectura por espectrofotometría a 450 nm.

En la prueba de ELISA previamente descrita, se utilizó como control negativo un suero hiperinmune elaborado en conejo para Laringotraqueitis Infecciosa Aviar.

Una vez estandarizada la prueba de ELISA (sueros de conejo contra su cepa homóloga), se prosiguió a enfrentar 0.5 μ g/pozo de la cepa Onderstepoort contra diluciones 1:10 y 1:100 de los sueros de perros previamente reportados como positivos por tiempo real a CDV (González, 2015); También se realizó un ensayo de ELISA en el que se evaluó la reactividad antigénica de las cepas virales de CDV (A75/17, Lederle, Onderstepoort, UNAM), enfrentando cada suero hiperinmune elaborado contra las mismas cepas, en este caso se colocó 1 μ g de antígeno por pozo y diluciones dobles seriadas de cada suero, a partir de 1:50. Para determinar la reactividad antigénica de los sueros de conejos contra las diferentes proteínas de las cepas virales, 50 μ g de éstas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, posteriormente el gel fue transferido a una membrana de PVDF (Immobilon®-P Transfer Membrane, Millipore No.Cat. IPVH00010), para llevar a cabo la prueba de Western blot. La transferencia fue realizada en una cámara colocando: Filtro grueso, filtro delgado, membrana PVDF (previamente activada en metanol), gel de poliacrilamida, filtro delgado, filtro grueso, humedecido con buffer de transferencia (Regulador de corrida, SDS 10%, agua destilada y metanol), se dejó transferir durante 2 h a 80 Volts.

La membrana fue incubada a 4°C/1h con buffer de bloqueo (leche descremada 5%, en Buffer de lavado) posteriormente se realizaron 3 lavados con 5ml de buffer de lavado (cloruro de sodio 125 mM, 25 mM tris-HCl pH 7.9, Tween-20 0.1%) por 5 minutos en agitación. Enseguida, se adicionó el primer anticuerpo en dilución 1:200 (suero hiperinmune de cada una de las cepas diluido en buffer de bloqueo), incubando a 37°C/1h, después se realizaron tres lavados con buffer de lavado, siguiendo las condiciones anteriormente descritas. Las membranas fueron incubadas a 37°C/1h con una dilución de 1:2000 del segundo anticuerpo (anti IgG de conejo acoplado a peroxidasa), posteriormente se realizaron cinco lavados (buffer de lavado) bajo las condiciones ya mencionadas. Finalmente, la membrana fue incubada a temperatura ambiente con agitación en solución reveladora (1 pastilla de diaminobencidina, 1 pastilla de urea -3,3'- Diamino-bencidina. SIGMA. No. Cat. D4293-50SET-, 5 ml de agua destilada), hasta la aparición de bandas, la reacción fue frenada lavando con agua destilada.

Nota. La dilución del segundo anticuerpo fue determinada mediante la prueba de máxima densidad óptica descrita anteriormente.

Las muestras de casos clínicos de perros, también fueron analizadas mediante Western blot, se tomaron en consideración los perros que presentaron una mayor reactividad en el ensayo de ELISA, de acuerdo a la identificación dada por el laboratorio, estos perros fueron el número 7 y el 20, el primero sin antecedentes de vacunación y el segundo sí, aunque ambos resultaron positivos a la prueba de PCR-RT. Se utilizaron los sueros en dilución de 1:150 y

de 1:1500 para el conjugado anti IgG (Inmunoglobulina de perro acoplada a peroxidasa).

Técnica de PCR cuantitativa (qPCR)

Para conocer el número de copias virales por mililitro de cada una de las cepas utilizadas en el estudio, se realizó una extracción de ARN a partir del concentrado viral. El ARN fue empleado en un ensayo de tiempo real con el kit Find it CDV de Biotecmol® bajo las siguientes condiciones de temperatura y tiempo.

Cuadro 4. Condiciones de temperatura para la cuantificación de las cepas de CDV por qPCR

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 minutos	1
95°C	15 segundos	40
60°C	45 segundos	40

RESULTADOS

Cultivo celular y propagación viral

La figura 3 muestra una microfotografía de los cultivos celulares infectados, donde se observa la actividad viral, a las 48 horas y a las 96 horas, donde el efecto es más evidente. En el testigo negativo, el monoestrato celular se mantuvo intacto. El efecto viral puede apreciarse por desprendimiento, redondeamiento y pérdida de la continuidad celular.

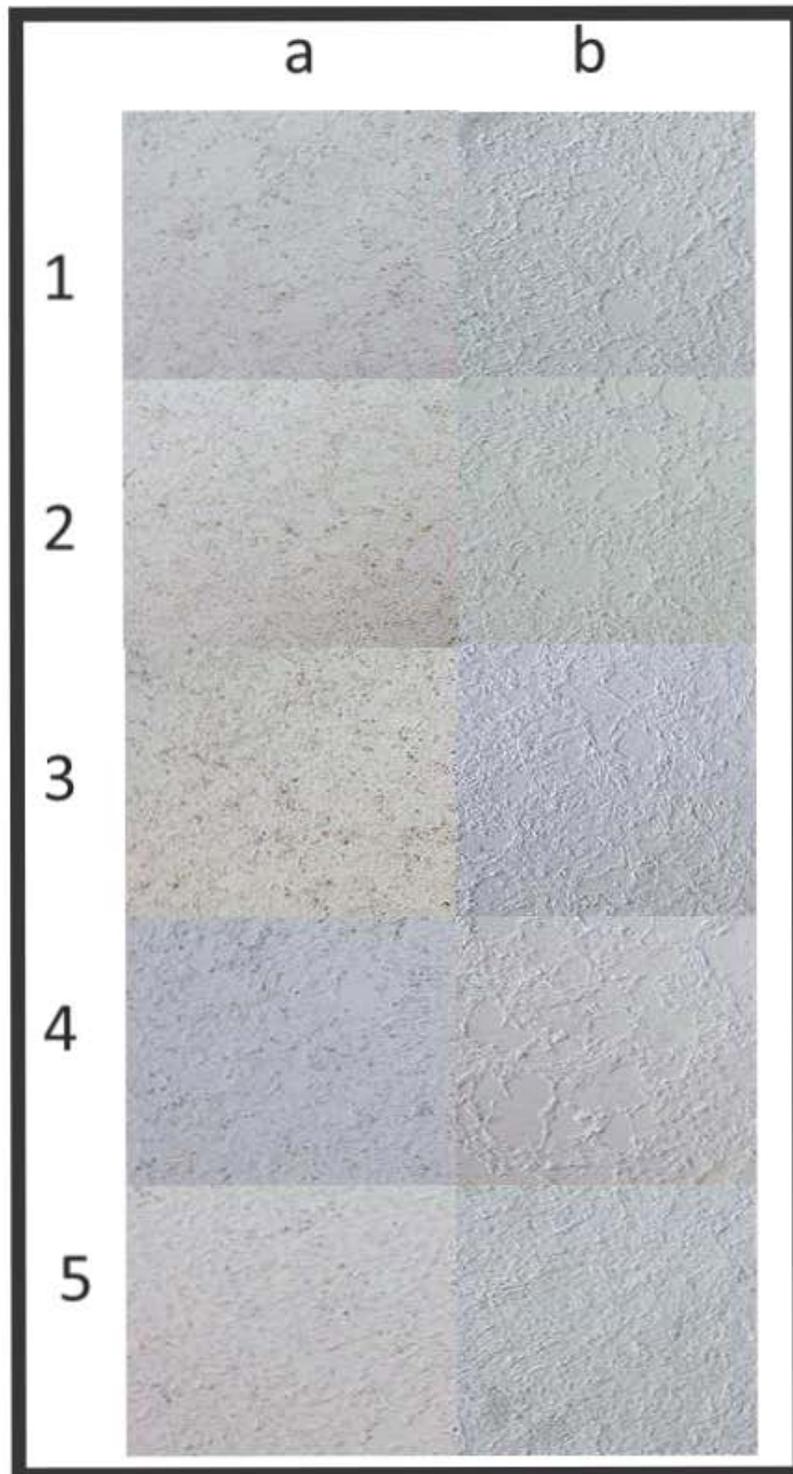


Figura 2. Micrografía 10X de cultivos celulares infectados por 48h (a), y 96h (b), se observa el efecto del virus sobre el monoestrato celular, a) Cultivo a las 48h, b) Cultivo a las 96h. 1.- Cepas A75/17, 2.- Cepa Lederle, 3.- Cepa Onderstepoort, 4.- Cepa UNAM, 5.- Testigo negativo (células sin infectar).

Se cosecharon 75 ml de cada cepa, los cuales se concentraron y cuantificaron, obteniendo el siguiente rendimiento:

Cuadro 5. Se muestra el volumen y la cantidad de antígeno obtenidos concentrando con PEG y cuantificando por Bradford

Cepa viral	Volumen (ml)	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Cantidad total (μg)
A75/17	1.7	4.2	7140
Lederle	1.6	4.7	7520
Onderstepoort	1.9	4	7600
UNAM	1.4	5.1	7140

Pruebas serológicas

Ensayo ELISA

Con el propósito de determinar el nivel de anticuerpos o grado de reactividad de presente en los sueros hiperinmunes de conejos contra las diferentes cepas de CDV, se efectuaron ensayos de ELISA. En la figura 3 se muestra la reactividad del suero inmune de conejo para cada virus (diluido 1/100) a diluciones quíntuples seriadas de antígeno a partir de 1 µg (establecido en base a ensayos previos). Se aprecia la disminución de reacción del suero conforme la cantidad de antígeno se ve reducida en cada dilución, así como también se observa que el suero contra Laringotraqueitis Infecciosa aviar no presenta reacción contra el virus.

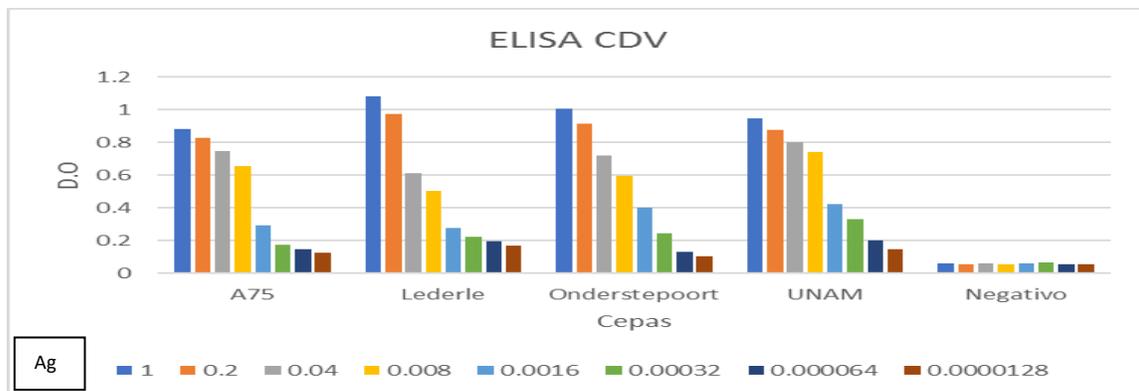


Figura 3. Ensayo de ELISA indirecto que muestra la reactividad de antisueros de conejo para cuatro cepas de CDV, a los virus de CDV homólogos, empleando diluciones quíntuples seriadas de los antígenos a partir de 1 µg, enfrentándolos al suero homólogo en dilución 1/100.

En la figura 4 se presenta el ensayo de ELISA realizado con sueros de perros, obtenidos de casos clínicos. 5 de los 12 perros no vacunados presentaron OD > 0.3, En los perros vacunados solo los 3 de 9 tuvieron OD > 0.3.

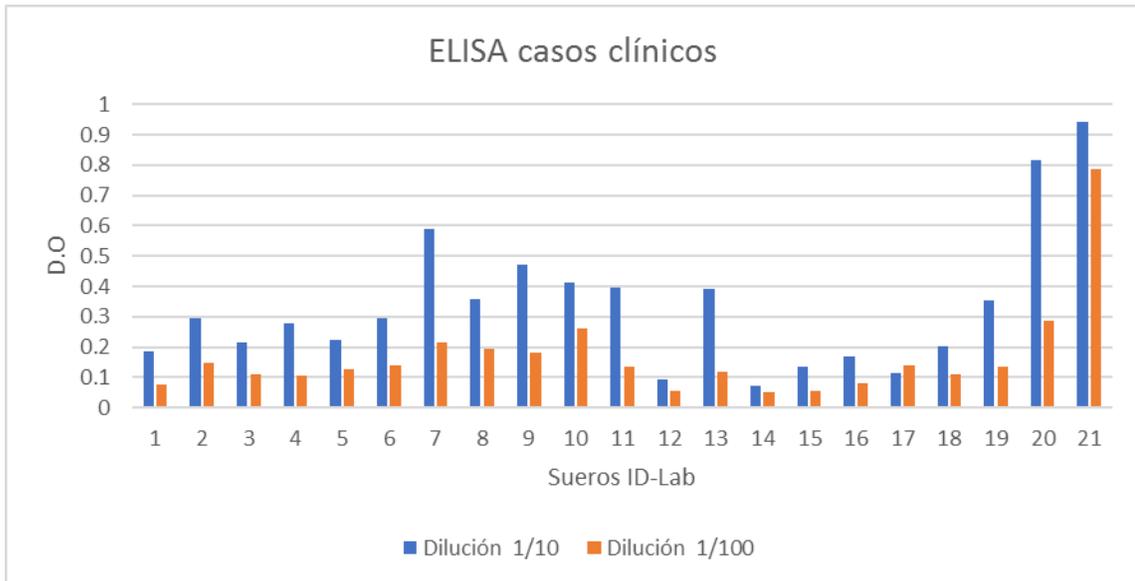
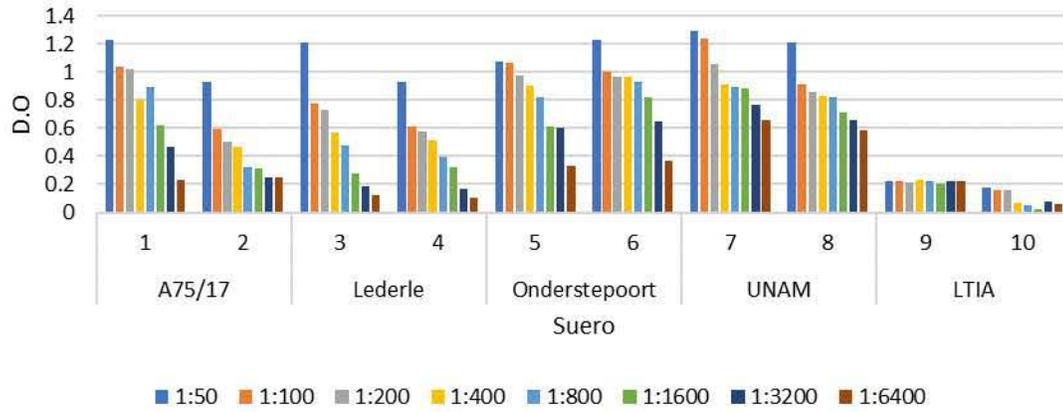


Figura 4. ELISA utilizando sueros de perro, se observa reactividad de los sueros de casos clínicos, antígeno constante (cepa Onderstepoort, 0.5ug/pozo), enfrentándolo a diluciones 1/10 y 1/100 del suero.

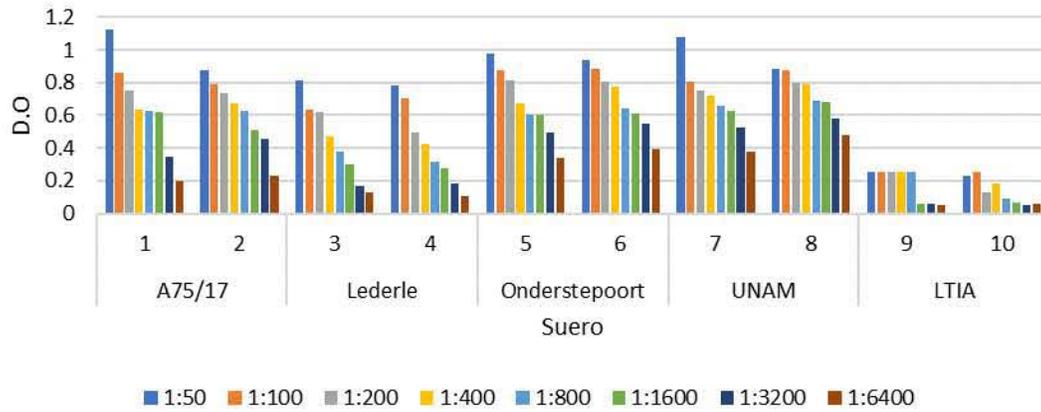
- En numeración del 1-12 corresponden a perros no vacunados, del 13-21 a perros vacunados.

En la figura 5 se observa la reacción que presentaron las diferentes cepas virales al ser enfrentadas con los sueros hiperinmunes para cada una de ellas, en las que se utilizó suero contra Laringotraqueitis infecciosa aviar como testigo negativo. Todas las cepas reaccionan contra el suero al cual sean expuestas, mostrando una disminución de reactividad de acuerdo a las diluciones.

Cepa A75/17



Cepa Lederle



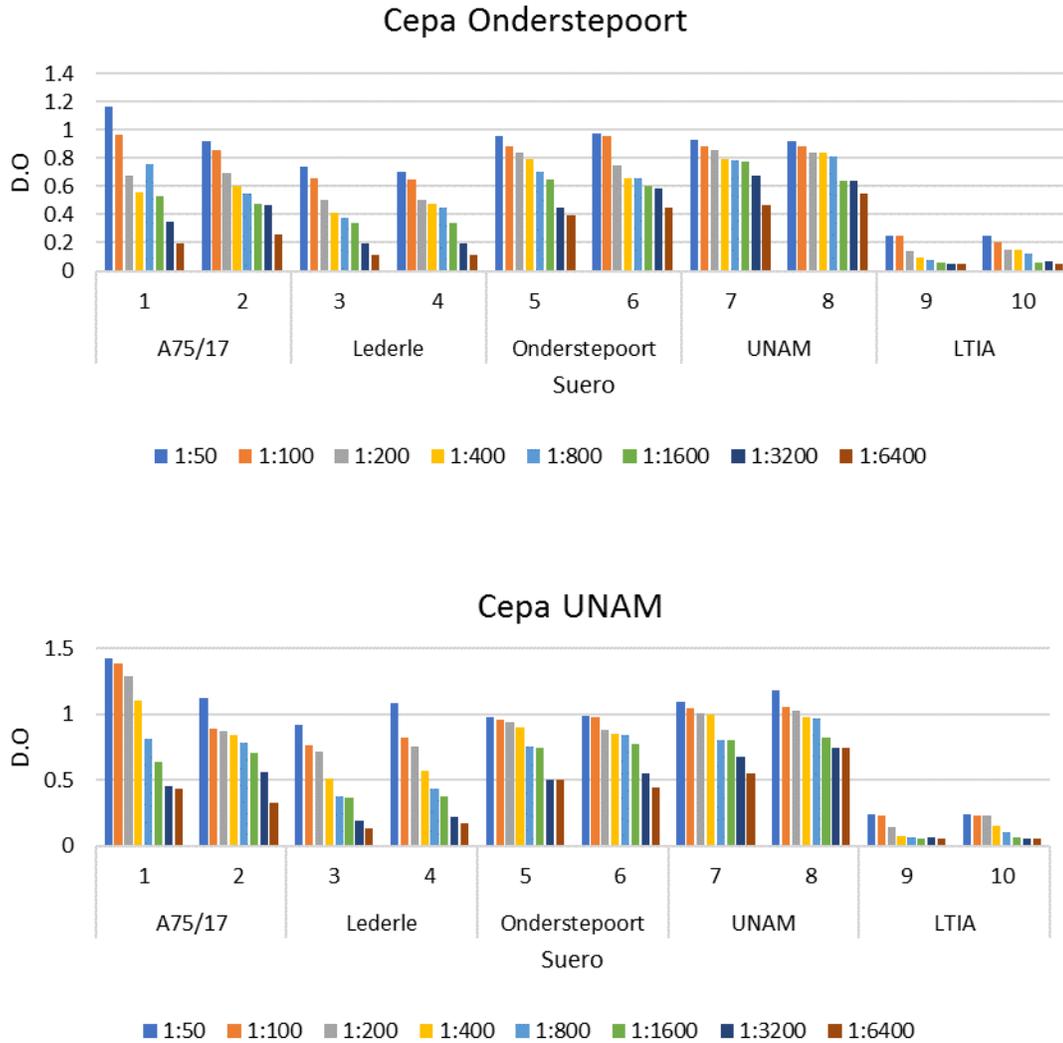


Figura 5. Ensayo de ELISA indirecta, se observa reactividad antigénica cruzada de cuatro cepas de CDV a los diferentes antisueros de conejo, se colocó 1 μ g de antígeno por pozo y reaccionaron con diluciones dobles seriadas de cada suero, a partir de 1:50.

Cuantificación del virus de Distemper canino por qPCR

Se realizó la cuantificación de cada cepa por medio de un ensayo en tiempo real con el kit RT-PCR-TR Find-IT Distemper de BIOTECMOL®.

Cuadro 6. Número de copias/ml de cada cepa, obtenido en el ensayo de qPCR.

Cepa viral	Número de copias/ml
A75/17	3.06E+06
Lederle	4.33E+05
Onderstepoort	5.52E+05
UNAM	5.38E+06

Western blot

Las proteínas virales (A75/17, Lederle, Onderstepoort y UNAM) precipitadas con PEG, fueron separadas por electroforesis PAGE-SDS 10% y puestos a reaccionar contra los diferentes antisueros obtenidos de conejos. En la figura 6, se muestran los patrones de bandas antigénicas, podemos apreciar que cada suero de conejo reveló diferente patrón de bandas. En el cuadro 7 se muestran los pesos moleculares de los antígenos detectados por cada antisuero en cada cepa viral.

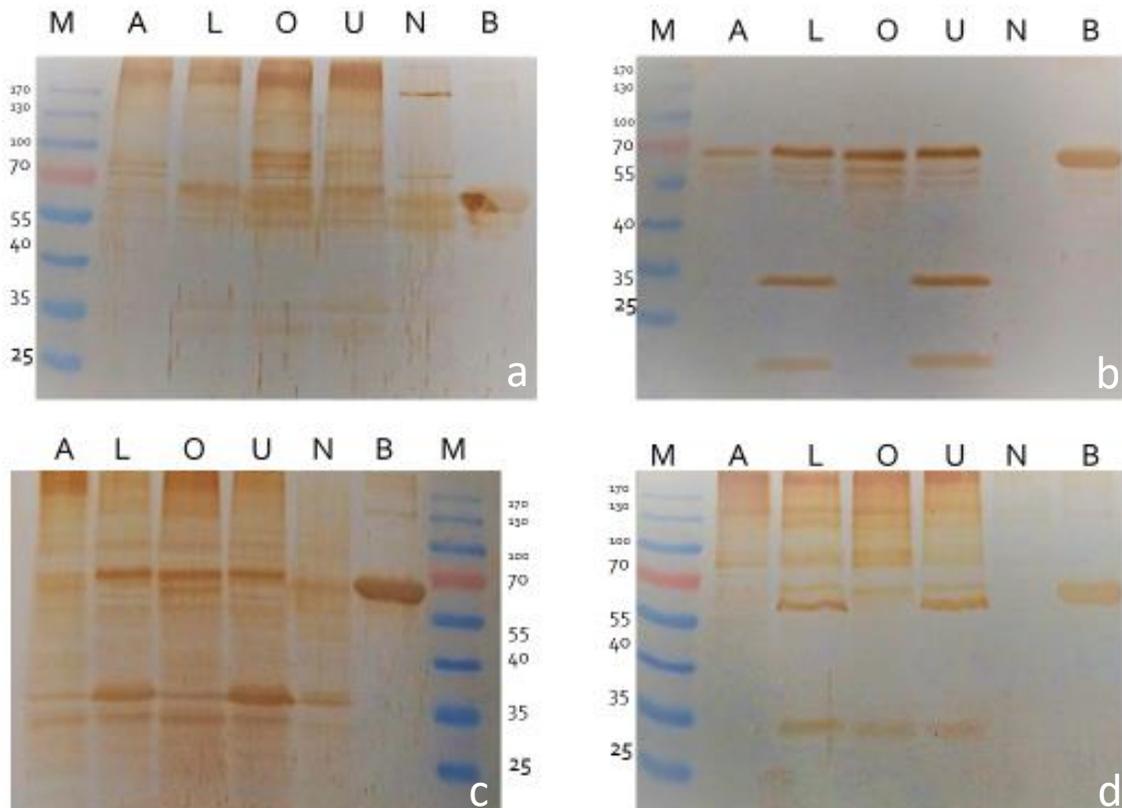


Figura 6. Western Blot utilizando 50µg de proteína de cada cepa. M: Marcador de peso, A: A75 /17, L: Lederle, O: Onderstepoort, U: UNAM, N: Testigo negativo, B: Testigo de BSA

a: Suero de cepa A75/17, b: Suero de la cepa Lederle, c: Suero de la cepa Onderstepoort, d: Suero de la cepa UNAM.

Todos los sueros se utilizaron en dilución 1:200

Cuadro7. Se indica el peso molecular (kd) de los antígenos detectados en cada cepa viral mediante Western blot enfrentándolos a sueros hiperinmunes para cada virus.

Peso Molecul ar kDa	Anti-A75/17					Anti-Lederle					Anti-Onderstepoort					Anti-UNAM					Suero 7 (K13/SP/D)					Suero 20 (Boss)										
	A	L	O	U	N	B	A	L	O	U	N	B	A	L	O	U	N	B	A	L	O	U	N	B	A	L	O	U	A	L	O	U	A	L	O	U
130					X													X	X	X	X															
120															X			X	X	X																
100																											X	X	X							
90			X	X																																
80	X		X	X														X	X	X																
75	X		X																																	
70		X	X	X			X	X	X	X			X	X	X			X	X	X									X							
67					X		X	X	X	X	X		X				X	X	X	X																
65						X																														
60																																				
55		X	X	X			X	X	X																X	X	X	X								
50																											x		X		X					
35		X	X	X			X		X		X	X	X	X	X			X	X	X																
30		X	X	X							X	X	X	X																						

En el cuadro 7, se muestran los patrones de reconocimiento antigénico en los diferentes virus por parte de sueros de dos perros que presentaron mayor reactividad a la prueba de ELISA: El suero 7 reveló la misma banda de aproximadamente 55 kd, en todos los virus, aunque en el virus Onderstepoort presento una banda adicional de aproximadamente 50 kd. En cambio, el suero 20 reveló un antígeno común en tres cepas virales de aproximadamente 100 kd; La cepa A75/17 y la Onderstepoort presentaron una banda de aproximadamente de 55 kd; La cepa Lederle, mostro un reconocimiento antigénico que se manifestó como una banda en un peso de aproximadamente de 70 kd.

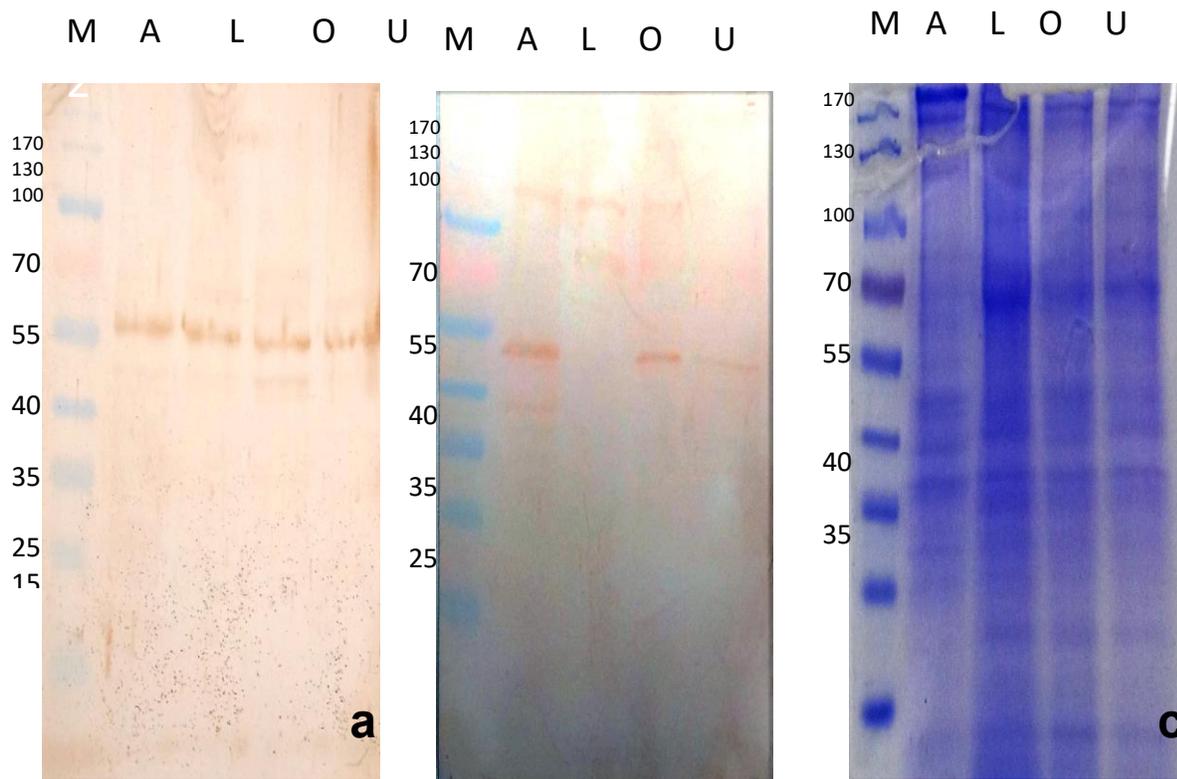


Figura 7. Western blot utilizando 50 ug de proteína de cada cepa, enfrentándolos contra sueros de perros.

M: Marcador de peso, A: A75/17, L: Lederle, O: Onderstepoort, U: UNAM a. suero 7, b. Suero 20, c. Gel teñido con azul de comassie.

Los sueros de perro se utilizaron en una dilución 1:150 (A75/17, Lederle, Onderstepoort y UNAM).

DISCUSIÓN

En los diferentes experimentos de propagación viral de las cepas de CDV (A75/17, Lederle, Onderstepoort y UNAM), no se observó un efecto citopático tales como sincitios y células gigantes, como lo reportan Appel 1987, Mohanty 1984, Fenner 1987. Sin embargo, hubo otros cambios como, alteración de la forma celular, pérdida de la continuidad del monoestrato y desprendimiento celular que indicaban actividad viral. Esto coincide con lo reportado por González en 2015. El crecimiento viral fue confirmado por medio de PCR-RT, al igual que en el estudio de González.

En los ensayos inmunoenzimáticos realizados para evaluar la reactividad específica, de cada antisuero a su antígeno correspondiente, se pudo observar que los sueros presentan tal sensibilidad, que incluso reaccionaron los que se diluyeron hasta a 8 ng, aunque a partir de allí la reactividad baja notablemente (<0.4).

Se evaluó la presencia de anticuerpos contra CDV en perros, los cuales resultaron positivos por PCR-RT a la presencia viral, a pesar de tener antecedentes de vacunación y también de no tenerlos. Algunos perros no vacunados (5/12), presentaron títulos de anticuerpos elevados. Los perros vacunados solo 3/9 presentaron títulos elevados.

Al evaluar mediante ELISA, la reactividad de cada anti-suero contra las diferentes cepas, se pudo observar que estos sueros presentan reactividad cruzada con todas las cepas de CDV, de acuerdo a Fenner 1987, Halliwell 1992, esto puede explicarse por la antigenicidad cruzada que presentan algunas familias virales.

El estudio realizado por inmunoblot, muestra igualmente, que los antígenos detectados en las diferentes cepas por los sueros inmunes, son compartidos por la mayoría de las cepas virales.

Esto indica que las diferentes cepas virales de Distemper, presentan antígenos comunes, pero no es claro si estos son neutralizantes. Para poder aclarar esto se requiere efectuar estudios de seroneutralización cruzada.

Aunque se observó que todas las cepas mostraron los mismos antígenos a cada suero inmune, los antígenos fueron diferentes en cada suero. Sin embargo, hubo algunos antígenos que reconocieron de forma repetida entre los anti-sueros.

En este estudio también se analizaron las características antigénicas de un aislado de Distemper canino realizado en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM durante 2015 (cepa UNAM), comparado con dos cepas vacunales pertenecientes al linaje América 1 (Onderstepoort y Lederle) y una cepa patógena proveniente del clado América 2 (A75/17), esto al enfrentar las cepas virales de Distemper canino A75/17, Lederle, Onderstepoort, UNAM, contra cada uno de los sueros hiperinmunes producidos para ellas por medio de

la prueba de Western blot, se encontraron múltiples bandas de diferentes pesos, de acuerdo al suero al cual se exponían los antígenos, pero en todas las cepas se observa una banda que pesa en promedio 67 kd, peso que sugiere tratarse de la Hemaglutinina (68 kd), ya que este peso coincide con lo reportado en estudios realizados por diferentes autores como Iwatsuki (Japón), Martenella (Italia), Woma (Italia), Otsuki (Japón), Gámiz (México), Von Messling (Estados Unidos). Esta, proteína estructural se considera la más inmunodominante de las seis que presenta el virus (Nucleoproteína (N), Asociada a polimerasa (P), Hemaglutinina (H), Matriz (M), Fusión (F), Larga (L), (Von Messling, Iwatsuki, Gámiz, Panzera, Martella, Diallo, Nguyen). La hemaglutinina es la proteína responsable de crear una inmunidad específica contra el virus; variaciones en la secuencia de la proteína H, están involucrados con el desplazamiento del tropismo celular y por lo tanto de la adaptabilidad en hospedero, tal como lo mencionan Panzera, Iwatsuki, Dung Van, Martella, Beinke.

CONCLUSIÓN

En este estudio se evaluó la respuesta antigénica de cada uno de los sueros de conejos elaborados para las diferentes cepas (A75/17, Lederle, Onderstepoort, UNAM) que se encuentran en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM, el mismo suero puede reconocer diferentes proteínas de acuerdo a la cepa a la cual es expuesto, pero también comparten proteínas en común al reconocimiento del suero.

El contar con conocimientos de una cepa circulante en el país (cepa UNAM), permitirá generar un método diagnóstico que pueda detectar la enfermedad en animales que presenten signología, aún con antecedentes de vacunación, tal como sucedió en las muestras tomadas para el estudio de González en 2015, esto permitirá que en el futuro se puedan elaborar inmunógenos que aumenten la respuesta antigénica contra esta cepa circulante en el país para llegar a controlar la enfermedad de una forma específica.

REFERENCIAS

1. Appel, Beineke et al.,2009, Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127 1–18.
2. Appel J.M, 1987, *Virus infections of carnivores*, Elsevier Science Publisher, 133-153.
3. Beinke A., et. al., Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127 (2009) 1–18.
4. González D.S, 2015, Análisis genético de la Hemaglutinina (H) del virus de Distemper canino en 21 cepas mexicanas y su expresión en baculovirus, Tesis para optar por el grado de maestra en ciencias, México, D.F, Universidad Nacional Autónoma de México.
5. Diallo A, 1990, Morbillivirus group: genome organization and proteins, *Veterinary Microbiology*, 23,155-163.
6. Dong et al., 2014, Detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus by a duplex reverse transcription polymerase chain reaction, *Iranian Journal of Veterinary Research*, Shiraz University, 172-175.
7. Fenner, F, 1987, *Virología veterinaria*, Segunda edición, Zaragoza, España, Editorial Acribia, pág. 523.
8. Gamíz et al., 2011, Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America, *Vet Res Commun*, 35:381–390.

9. Halliwell R,E, *Inmunología clínica veterinaria*, Aceibia, España, 1992 (sf757.2)
- 10.Iwatsuki, K, 2000, Antigenic difference in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet. Microbiol*, 71, 281-286.
- 11.Iwatsuki et al., 1997, Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs, *Journal of General Virology*, 78, 373–380.
- 12.Li W., 2014, Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China, *Virus Genes* 49:45–57.
- 13.Lyaku J, Nettleton P y Marsden H, 1991, A comparison of serological relationships among five ruminant alpha herpesviruses by ELISA, *Arch Virol* (1992) 124:333-341
- 14.Maretella V et al., 2001, Detection and genetic characterization of canine distemper virus (CDV) from free-ranging red foxes in Italy, *Molecular and Cellular Probes*,16, 77–83.
- 15.Martella V., Elia G., Buonavoglia C., 2008, Canine Distemper Virus, *Veterinary Clinic Small Animals* 38, 787–797.
- 16.Gámiz M., Ruíz J., 2016, Diversity of susceptible hosts in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis, *BMC Veterinary Research*12:78.
- 17.Mohanty B.S, 1984, *Virología veterinaria*, México, Editorial Interamericana, págs. 229-234.
- 18.Murphy A. et.al, 1999, *Veterinary virology*, Academic press, 423-425.

19. Nguyen V, et al., 2011, Isolation and phylogenetic analysis of canine distemper virus among domestic dogs in Vietnam, *Journal of Veterinary Medicine Science* 79(1): 123–127
20. Ni, et. al., 2016. *Curr. Protoc. Essential Lab. Tech.* 12:8.3.1-8.3.40. doi: 10.1002/9780470089941.et0803s12
21. Nikolin V., Wibbelt G., Michler F., Wolf P., East M., 2011, Susceptibility of carnivore hosts to strains of canine distemper virus from distinct genetic lineages, *Veterinary Microbiology* 156 45–53.
22. Noriyuki et. al, 2013, The V Protein of Canine Distemper Virus Is Required for Virus Replication in Human Epithelial Cells, December, 2013 Volume 8 Issue 12 e82343
23. Otsuki N, Nakatsu Y, Kubota T, Sekizuka T, Seki F, et al., 2013, The V Protein of Canine Distemper Virus Is Required for Virus Replication in Human Epithelial Cells. *PLoS ONE* 8(12): e82343. doi: 10.1371/journal.pone.0082343
24. Pérez S.D, Iturbe R.R, Saldivar Z.E, 1993, Caracterización del virus de Distemper (moquillo canino) en cultivos celulares, aislados de animales clínicamente enfermos, *Revista Veterinaria México*, 24 (1), pág. 15-19.
25. Swati et.al, 2015, Isolation and phylogenetic characterization of Canine distemper virus from India, *Virusdisease*, 2015 Sep;26(3):133-40, disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396979>, consulted 31/01/17.
26. Tan et al., 2011, Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain isolate from domestic dogs in China, *Virology*

Journal 2011, 8:520, disponible en:

<http://www.virologyj.com/content/8/1/520>.

27. Tizzano M.A., 2013, Distemper canino: Morfología, estructura y composición del virión, Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de Doctor en ciencias veterinarias, La Plata, Buenos Aires, Argentina Ciudad, Facultad de Ciencias Veterinarias, disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/38598>, consultado el día 17/01/2017.
28. Vandeveld M., Zurbriggen A., The neurobiology of canine distemper virus Infection, *Veterinary Microbiology* 44 271-280.
29. von Messling V., Zimmer G, Herrler G, HAAS L, Cattaneo R., 2001, The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity, *Journal of Virology*, Vol. 75 No.14.
30. Wang F., 2011, Differentiation of Canine Distemper Virus isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription-polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism according to phylogenetic relations in China, *Virology Journal* 2011, 8:85.
31. Woma T., 2010, Genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in vaccinated dogs in south Africa, *Nigerian Veterinary Journal* Vol 31(1): 14-25.