



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL
GENÉTICA MOLECULAR

Análisis genético de la Hemaglutinina (H) del virus de
distemper canino en 21 cepas mexicanas y su expresión en
baculovirus.

TESIS
QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA
González Delgado Luz Selene

Comité Tutorial:

Rogelio Alejandro Alonso Morales
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Rosa Elena Sarmiento Silva
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

José Simón Martínez Castañeda

Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

MÉXICO D.F. JUNIO 2015



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.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS.....	VII
DEDICATORIAS.....	VIII
AGRADECIMIENTOS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	I
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 MARCO TEÓRICO.....	1
1.1.1.1. <i>Virus de Distemper canino.</i>	1
1.1.1.2. <i>Aislamiento.</i>	2
1.1.1.3. <i>Organización genómica de CDV.</i>	3
1.1.3.1 Nucleocápside (N) de CDV.....	5
1.1.3.2 Fosfoproteína (P) de CDV.....	6
1.1.3.3 Hemaglutinina (H) de CDV.....	6
1.1.1.4. <i>Antecedentes en México.</i>	11
1.1.1.5. <i>Pruebas Diagnósticas</i>	15
1.1.5.1 Ensayos Serológicos.....	15
1.1.5.1.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	15
1.1.5.1.2 ELISA.....	15
1.1.5.1.3 Seroconversión.....	16
1.1.5.2 Técnicas Moleculares.....	17
1.1.5.2.1 RT-PCR.....	17
1.1.5.2.2 RT-PCR Tiempo Real.....	18
1.1.1.6. <i>1.1.6 Sistema de Expresión de Proteínas en Baculovirus.</i>	19
2.JUSTIFICACIÓN.....	21
3.HIPÓTESIS.....	22
4.OBJETIVO GENERAL.....	22

5.OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
6.MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
6.1 MUESTRAS.....	23
6.2 PURIFICACIÓN DE ARN.	23
6.3 AMPLIFICACIÓN DE DOS FRAGMENTOS DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA (P) MEDIANTE PCR ANIDADA.....	23
6.4 TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	25
6.4.1Amplificación y Clonación del Control Estándar de Cuantificación PCR TR(N).....	26
6.4.2Purificación de los amplicones.....	28
6.4.3Clonación en el vector pTZ57R/T.....	28
6.4.3.1 Transformación de células competentes.....	28
6.4.3.2 Identificación de clonas recombinantes por PCR en punto final.....	29
6.4.3.3 Purificación de ADN plasmídico recombinante a pequeña escala (Miniprep).....	29
6.4.4 Secuenciación de las clonas obtenidas.....	30
6.4.4.1 Ensamblaje de secuencias y análisis genético.....	31
6.5 AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DEL GEN H DEL CDV CIRCULANTE EN MÉXICO.	32
6.5.1.1 Clonación del gen H en el vector pFHBTa.....	35
6.5.1.1.1Transposición en células competentes DH10BAC.	36
6.6 Aislamiento viral.....	37
6.6.1 Cultivo celular.....	37
6.6.2. Titulación viral en cultivo celular.....	38
6.6.2.1. Reed-Muench.....	39
6.3 Suero Hiperinmune.....	39
7.RESULTADOS.....	40
7.1 AMPLIFICACIÓN DE DOS FRAGMENTOS DEL GEN DE LA FOSFOPROTEÍNA (P).....	40
7.2 TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA (qPCR).....	41
7.2.1.1 Purificación del producto amplificado.....	41
7.2.1.2 Selección de clonas con el inserto.....	42
7.2.1.3 Mini Preparación de ADN de plásmidos.....	42
7.2.1.4 Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR).....	43
7.2.1.4.1 Control Estándar de Cuantificación PCR Tiempo Real (N).....	43
7.2.2 Muestras Positivas a Distemper canino.....	43
7.2.3 Filogénia.....	44
7.2.3.1 Amplificación de un fragmento de 612 pb del gen de la hemaglutinina (H).....	44

7.2.3.2	<i>Secuenciación</i>	44
7.2.3.3	Alineamiento de 32 Secuencias Mexicanas a nivel de Nucleótidos del gen H de CDV... ..	46
7.2.6.2	Dendrograma de Nucleótidos de del gen H de CDV de las secuencias mexicanas.....	47
7.2.6.3	Alineamiento de 32 secuencias mexicanas a nivel de Aminoácidos del gen H de CDV.....	48
7.2.6.4	Dendrograma a nivel de Aminoácidos del gen H de CDV	50
7.2.6.6	Alineamiento de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV a nivel mundial.	51
7.2.6.7	Dendrograma a nivel de Aminoácidos del gen H de CDV, secuencias mundiales	54
7.3	ESTRATEGIA DE AMPLIFICACIÓN DEL GEN COMPLETO H DE CDV A PARTIR DE 3 FRAGMENTOS.	55
7.4	AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE LA HEMAGLUTININA DEL CDV DE 1824 PB (FIGURA 29).....	56
7.4.1.1	Dendrograma a nivel de Nucleótidos del gen completo H de CDV (figura 31).	57
7.4.1.2	Clonación del gen completo H.	58
7.4.1.2.1	Clonación en el Vector pTZ57R/T.....	58
7.4.1.2.2	Selección de clonas con el inserto.	58
7.4.1.2.3	Mini Preparación de ADN de plásmidos.....	59
7.4.1.2.4	Digestión con enzima BamH1	60
7.4.1.3	Clonación en Vector pFHBTa	60
7.4.1.4	Posteriormente a la liberación de los insertos, estos fueron purificados del gel y clonados en el vector de movilización pFHBTa, el cual contiene parte del genoma de Baculovirus.	60
7.4.1.5	Clonación en Vector pFHBTa	60
7.4.1.5.1 Mini Preparación de ADN de plásmidos	61
7.4.1.5.2 Transposición en células competentes DH10BAC62	
7.4.1.5.3 Selección de Clonas Correctamente Transpuestas	62
7.5	ESTRATEGIA DE AISLAMIENTO A PARTIR DE TEJIDO	62
7.5.2	Titulación de virus de CDV por qPCR por qPCR.	64
7.6	SUERO HIPERINMUNE.....	65
7.6.1	EVALUACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE POR ELISA.....	65
1.1.1.7.	<i>Evaluación del suero hiperinmune por Western Blot (figura 44).</i>	66
1.1.1.8.	<i>Evaluación del suero hiperinmune por Inmunodifusión</i>	66
8.	DISCUSIÓN	67
9.	CONCLUSIONES	70
10.	BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y organización del virión.....	5
Figura 2. Representación del mecanismo de fusión virus-célula mediado por la hemaglutinina y la proteína de fusión.....	7
Figura 3. Receptores celulares de la proteína CDV.....	8
Figura 4. Clasificación de los linajes de CDV.....	10
Figura 5. Análisis Filogenético del N de CDV, Median Joining network.....	13
Figura 6. Análisis filogenético del gen H de CDV, Median Joining network.	14
Figura 7 .Alineamiento de nucleótidos con iniciadores	24
Figura 8. Alineamiento para la amplificación de un fragmento del gen N.....	26
Figura 9. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV.....	33
Figura 10. Amplificaciones de un fragmento del gen de la Fosfoproteína (P).....	40
Figura 11. Amplificaciones de un fragmento anidado del gen de la Fosfoproteína (AP).....	40
Figura 12. Amplificaciones de un fragmento de 83 pb del gen de la Nucleocápside (N) del virus de Distemper canino.....	41
Figura 13. Recuperación de los fragmentos purificados. Geles de Agarosa al 3% teñidos con bromuro de Etidio.....	41
Figura 14. Selección de clonas recombinantes en el vector T.....	42
Figura 15. Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector T.....	42
Figura 16. Curva Estándar de amplificación 1 a . 10 ⁻⁶ ng totales.	43
Cuadro 12. Relación entre vacunación y casos positivos.....	43
Figura 17. Amplificaciones de un fragmento del gen de la Hemaglutinina del virus de Distemper canino (H).	44
Figura 18. Resultado del alineamiento de secuencias mexicanas a nivel de nucleótidos.....	46
Figura 19. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN aligment.	47
Figura 20. Resultado del alineamiento de secuencias mexicanas a nivel de aminoácidos.....	48
Figura 21. Alineamiento de aminoácidos de secuencias mexicanas.....	49
Figura 22. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein aligment.....	50
Figura 23. Resultado de alineamiento de secuencias mundiales a nivel de ADN.....	51
Figura 24. Resultado de alineamiento de secuencias mundiales a nivel de aminoácidos.....	52

Figura 25. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN alignment	53
Figura 26. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein alignment.....	54
Figura 27. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV. F1: Iniciador del fragmento 1 (1033 pb), F2 Iniciador fragmento 2 de (612 pb), F3: Iniciador del fragmento 3 (714 pb).....	55
Figura 28. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV. F1-2: Unión del fragmento 1 y 2 (1559 pb). F2-F3 Unión fragmento 2 y 3 (974 pb).....	55
Figura 29 (H) Gen de la Hemaglutinina del Distemper canino 1824pb.	56
Figura 30. Resultado de alineamiento del gH a nivel de ADN.....	56
Figura 31. Dendrograma del gen H construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN alignment.....	57
Figura 32. Resultado de alineamiento del gH a nivel de ADN.....	57
Figura 33. Dendrograma del gen H de CDV construido por el método de Distancia utilizando el algoritmo Neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein Alignment.	58
Figura 34. Selección de clonas recombinantes en el vector T.....	59
Figura 35. a) Plásmidos purificado de la clona seleccionada en vector T (P), (M) Marcador de peso Lambda/BsEtII. Gel de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio.....	59
Figura 36. Digestión de los plásmidos purificados con la enzima BamHI... ..	60
Figura 37. Selección de clonas con el inserto en el vector pFast-Bac.....	61
Figura 38. Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector pFHBTa Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtII).	61
Figura 39. Selección del bácido recombinante correctamente transpuesto. Gel de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtII).	62
Figura 42 Células infectadas con cepa UNAM de CDV a las 72 horas.	63
Figura 43. Titulación del suero hiperinmune contra CDV cepa Lederle. Antígeno: Virus de Lederle en dilucion 1/10, primer anticuerpo: suero hiperinmune de conejo, segundo anticuerpo: anti-conejo en dilucion 1:1500, revelado con OPD.....	65
Figura 44. (1) Gel de acrilamida al 12% con 30 ug de antígeno (CDV cepa Lederle), (2) Gel de acrilamida al 12% con 30 ug de BSA. Westernblot con 30 ul de antígeno más control de BSA	

contra suero hiperinmune CDV. (3 y 4) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/100, (5 y 6) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/200, (7 y 8) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/400. (9) carril control con BSA. 66

Figura 45. SH1: Suero Hiperinmune de conejo 1 contra cepa Lederle CDV, SH2: Suero Hiperinmune de conejo 2 contra cepa Lederle CDV, a: Cepa vacunal Onderstepoort, b: Cepa vacunal Lederle, c: Cepa UNAM. 66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Iniciadores empleados para la amplificación de un fragmento del gen P de CDV	24
Cuadro 2. Iniciadores empleados para la amplificación de un fragmento anidado del gen P, CDV.	24
Cuadro 3. Iniciadores empleados para la qPCR amplificando un fragmento del gen N de CDV.	26
Cuadro 4. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción.	27
Cuadro 5. Temperaturas y número de ciclos para la qPCR.....	27
Cuadro 6. Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento del gen H de CDV.....	30
Cuadro 7. Iniciadores utilizados para el ensamblado del gen H completo.....	33
Cuadro 8. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción F1-F3.	34
Cuadro 9. Iniciadores para la amplificación del gen completo H.	35
Cuadro 10. Protocolo de Digestión del plásmido recombinante con la enzima BamH1.	35
Cuadro 11. Protocolo del ligación en el vector pFasBac.....	35
Cuadro 12. Relación entre vacunación y casos positivos.....	43
Cuadro 13. Secuencias mexicanas idénticas a nivel de nucleótidos y aminoácidos.....	45
Cuadro 14. Secuencias mexicanas cambios no sinónimos a nivel de nucleótidos y aminoácidos..	45
Cuadro 15. Cepas virales replicadas en el laboratorio de Genética Molecular de CDV.....	64

DEDICATORIAS

A mi mamá Adriana Delgado Bustamante y a mi papá Rubén González Bizarro por su comprensión, amor y su apoyo incondicional, sin ellos nunca hubiera alcanzado este logro.

A mi hermana Adriana González Delgado por aguantarme y estar conmigo en las buenas y sobre todo en las malas cuando más los necesitaba.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Eduardo Aguilar Huerta, Mario Palma, Pablo Pintor, Jorge Vázquez, Vianey Ramírez, Alex Valdez, Zoalli Uribe, Lizbeth Toiber, Jessica Molina, Carolina Durán, Benedict López, Adriana Martínez y Mario Espinosa.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron durante mi estancia en el posgrado y durante la elaboración de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y al por permitirme cursar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

Al Dr. Rogelio A. Alonso Morales por permitirme ser parte de este proyecto tan interesante y brindarme su conocimiento y confianza.

A la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez por la paciencia, conocimiento y apoyo constante durante la elaboración de este trabajo.

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por todo su conocimiento y orientación tanto académica como personal.

Al Dr. Humberto Ramírez Mendoza, por toda la ayuda brindada en la obtención del aislamiento viral.

Al Dr. Simón Martínez Castañeda por sus asesoría, sus aportaciones y por la donación de las cepas vacunales utilizadas en este proyecto.

A mi jurado, el Dr. Humberto Ramírez Mendoza, a Dra. Susana Mendoza Elvira, la Dra. Laura Cobos Marín y al Dr. José Álvaro Aguilar Setién; por sus comentarios que enriquecieron la tesis.

ABREVIATURAS

cADN	Ácido Desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico.
CDV	Virus de distemper canino
dNTP's	Deoxinucleótidos
ECP	Efecto Citopático
EP	Embrión de pollo
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
H	Hemaglutinina
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kb	Kilobase
Mabs	Anticuerpos monoclonales.
MDCK	Células de riñón de perro Madin- Darby
MiniPrep	Mini preparación de ADN de plásmido
MOI	Multiplicidad de la infección
N	Nucleocápside.
P	Fosfoproteína
pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
RT-PCR	Transcripción reversa - Reacción en cadena de la polimerasa.
RPM	revoluciones por minuto
SLAM	Signaling Lymphocytic Activation Molecule (CD150). Molécula activadora de la señalización de linfocitos
VERO	Células epiteliales de riñón de mono verde

RESUMEN

El virus de Distemper canino (CDV) pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus, su genoma es RNA monocatenario con polaridad negativa, su tamaño es de 15 kb y codifica para 8 proteínas. Se ha demostrado que la glicoproteína Hemaglutinina (H) es el antígeno responsable de la formación de anticuerpos neutralizantes y muestra la mayor variación genética y antigénica. La mayoría de las cepas vacunales utilizadas a nivel mundial fueron aisladas entre los años de 1930-1950. Diversos estudios filogenéticos de las cepas de CDV han demostrado la existencia de 7 estirpes. En México se conoce poco sobre la situación epidemiológica de la enfermedad; pero se ha reportado que las cepas circulantes del CDV forman un grupo distinto de otros descritos. Estos estudios, están basados en pequeñas muestras poblacionales, siendo necesarios análisis más extensos que lo confirmen. Evidencias de aislamientos virales de cepas locales, a partir de individuos vacunados y diferencias tanto en la reactividad con anticuerpos monoclonales como en títulos de neutralización cruzada, sugieren la existencia de variación antigénica en cepas locales. Es de gran importancia disponer de antígenos homólogos a las cepas circulantes que se puedan emplear en sistemas de diagnóstico para la detección de individuos expuestos al virus, y evitar falsos negativos, en estudios epidemiológicos, para evaluar el nivel de inmunización en animales vacunados y en su uso como posibles inmunógenos. En este trabajo se estandarizaron 2 pruebas moleculares diagnósticas para la identificación cualitativa y cuantitativa del CDV, esto a través de una prueba de PCR anidada para la amplificación parcial del gen de la fosfoproteína (P) de CDV, así como la clonación de un fragmento del gen de la nucleocápside (N) para su uso como control de cuantificación en una prueba de PCR en tiempo real (qPCR). Se realizó un análisis genético de la Hemaglutinina (H) del CDV en 21 casos clínicos del Distrito Federal, Estado de México y Guadalajara que confirman la existencia de un clado distinto del resto de las cepas mundiales y vacunales, el cual se encuentra circulando de forma preponderante. Se hizo el aislamiento viral de una cepa circulante, así como la clonación y expresión del gen completo H en sistema de baculovirus.

Palabras clave: Distemper canino, Glicoproteína H, variación genética/ antigénica, cepas locales.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Marco teórico.

1.1.1 Virus de Distemper canino.

El virus de Distemper canino (CDV), también conocido como moquillo canino, presenta una distribución mundial, origina una enfermedad aguda, febril y altamente contagiosa. En 1809 Edward Jenner describió por primera vez el curso de la enfermedad y en 1906 Henri Carré demostró su etiología viral. (Pinotti & Gollan, 2009).

La enfermedad del moquillo presenta una morbilidad entre el 25 al 50% y una mortalidad del 50 al 90% (Nelson & Couto, 2010). Afecta principalmente al sistema respiratorio, gastrointestinal y nervioso. Sus manifestaciones patológicas más severas son la inmunosupresión y la leucoencefalitis desmielinizante (LD) (Krakowka & Higgins, 1985).

El CDV infecta animales de todas las edades, siendo particularmente vulnerables los cachorros y animales viejos. Existe un cuadro conocido como "encefalitis del perro viejo" el cual es un desorden progresivo que afecta usualmente a perros mayores de 6 años los cuales fueron infectados por CDV durante su etapa de cachorros. Se presenta con ataxia, movimientos en círculo, presión de la cabeza contra objetos y cambios en la personalidad (no hay respuesta a estímulos externos o no reconoce a los dueños). La persistencia del virus en el SNC produce una reacción inflamatoria, instalándose una encefalitis crónica. Estos perros no presentan una fase infecciosa. (Beineke, A; Puff, C; et al , 2009).

La enfermedad causada por CDV es una de las infecciones virales más importantes en perros. Fue la enfermedad con mayor porcentaje de mortalidad en caninos de todo el mundo durante la primera mitad del siglo XX. (Appel & Summers, 2009).

El CDV tiene un amplio rango de hospederos tales como la familia Canidae (perro, perro salvaje australiano, zorro, coyote, lobo, chacal), la familia Mustelidae (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armadillo, marta y nutria), y la familia Procionidae (coatí, mapache, panda rojo), fócidos y recientemente se ha identificado en grandes felinos (leones, leopardos y tigres). (Origgi, et al., 2012; Roelke-Parker, 1996; Appel & Summers, 2009).

La ruta más importante de transmisión del CDV es a través de aerosoles. La eliminación de virus comienza aproximadamente al séptimo día post infección (PI). Los animales infectados eliminan el virus mediante secreciones corporales independientemente de la presencia de signos clínicos. (Beineke, A; Puff, C; et al , 2009)

1.1.2 Aislamiento.

El aislamiento de CDV a partir de animales infectados resulta complejo y con frecuencia sin éxito, sí el animal no se encuentra en la etapa aguda de la infección (Barrett, 1999). Cuando los animales son sospechosos de infección por CDV, la presencia viral se puede demostrar mediante la inoculación en animales susceptibles libres de patógenos específicos (SPF), típicamente hurones o perros a partir de muestras tomadas de animales infectados, seguido por la observación del desarrollo de signos de la enfermedad en combinación con serología y otras pruebas de verificación como la PCR (Lednicky, 2004).

El aislamiento de CDV también se lleva a cabo mediante la inoculación de macrófagos peritoneales obtenidos de hurones SPF (Whetstone, Bunn, & Gourlay, 1981; Poste, 1971) macrófagos alveolares caninos (Appel & Jones, 1967; Appel, 1978) o linfocitos caninos estimulados con mitógenos (Appel & Pearce-Kelling, 1992) obtenidos a partir de perros SPF con células mononucleares de sangre periférica o suspensiones de tejidos infectados por CDV durante la fase temprana de la infección.

Una forma menos común es el aislamiento del virus en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo (EP) en donde se requiere de múltiples pases semanales en EP antes de que el efecto citopático (ECP) se haga evidente (Schönbauer, Kölbl, & Schönbauer-Längle, 1984).

Estos enfoques son caros y poco utilizados, la alternativa más empleada es el aislamiento en cultivos celulares, siendo las líneas celulares Vero (Células epiteliales de riñón de mono verde) y MDCK (Células de riñón de perro Madin-Darby) las más utilizadas (Appel & Gillespie, 1972) (Visser, 1990). Sin embargo, aún utilizando métodos de cultivo celular, el aislamiento tiende a ser prolongado (>1 mes) y requiere múltiples pases ciegos antes de que la replicación viral se haga evidente por la formación del ECP (agregación celular, redondeamiento celular, formación de sincitios, cuerpos de inclusión citosólicos, lisis), además no todas las células desarrollan ECP al estar infectadas con CDV (Appel, 1987).

1.1.3 Organización genómica de CDV.

El CDV pertenece a la familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus (King &

Lefkowitz, 2011). Es un virus envuelto, ARN monocatenario, lineal, de sentido negativo. El genoma del CDV tiene un tamaño de 15 kb, codifica para una proteína de matriz asociada a la membrana (M), dos glicoproteínas de envoltura: la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F), una fosfoproteína asociada a la ARN polimerasa viral (P), una proteína larga de la polimerasa viral (L), y una proteína de nucleocapside (N) que rodea el genoma viral (Figura 1 a).

El gen que codifica para la proteína P gene tiene dos marcos abiertos de lectura que codifican para dos proteínas no estructurales, la proteína V y C (Patterson, Thomas, & Lewicki, 2000) (Figura 1 b). Se ha estudiado que estas proteínas, implicadas en la supresión de la respuesta inmune del huésped, son prescindibles para la replicación del virus *in vitro*, sin embargo son necesarias durante las infecciones *in vivo*. (Fenner, Bachmann, & Gibbs, 2014).

La cadena negativa de ARN se transcribe para producir un templado de cadena positiva para la replicación y la producción de más genoma ARN negativo. El genoma de ARN se cubre con la nucleoproteína viral N, P y L para formar el complejo de replicación de ribonucleoproteína RNP.

La ARN dependiente de ARN (RdRp) puede desprenderse de complejo RNP dentro de las regiones intergénicas que separan los genes virales, creando un gradiente de transcripción mediante el cual los genes que están río abajo de la secuencia líder 3' tienen cada vez menos ARNm transcrito (Von Messling, Zimmer, Herrler, Haas, & Cattaneo, 2011) (Figura 1 b y Figura 1c).

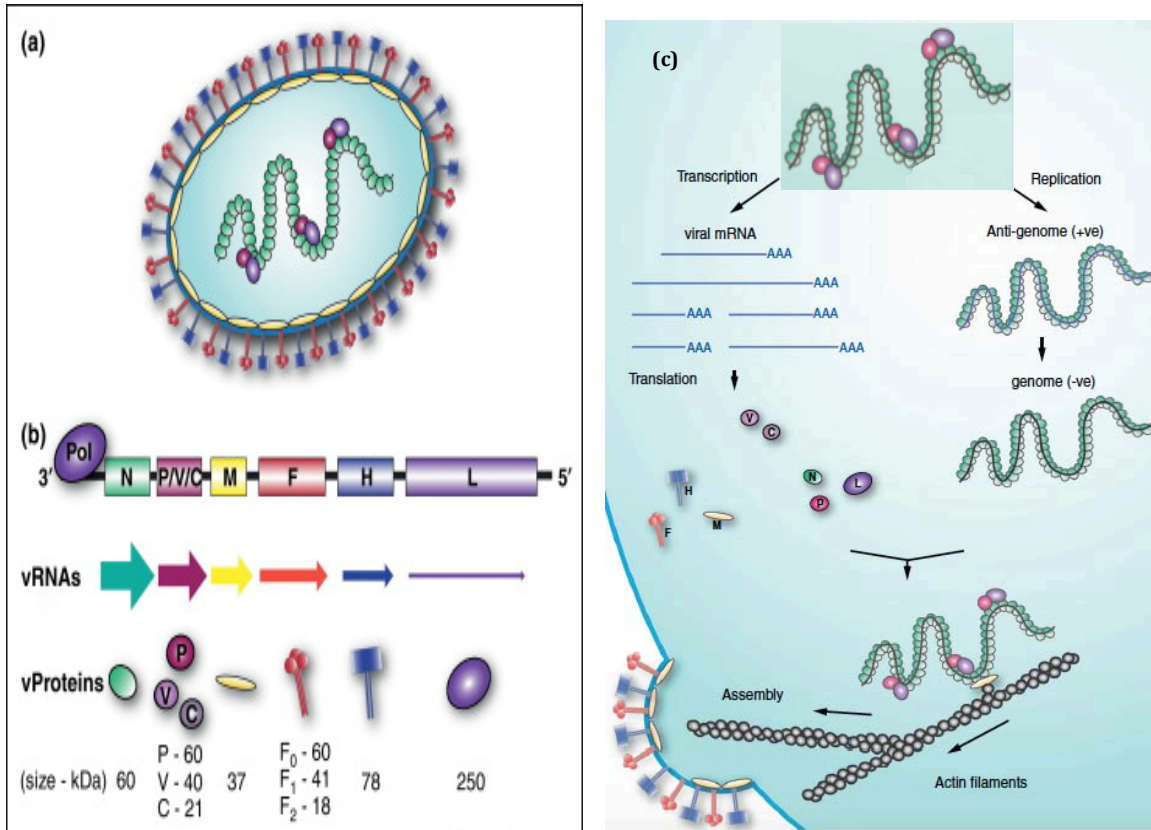


Figura 1. Estructura y organización del virión.. Esquema de la estructura y proteínas víricas de los morbilivirus (a) Estructura y organización de un virión del género Morbillivirus. (b) Organización del genoma y las proteínas para las que codifica. (c) transcripción y replicación de los morbilivirus (Delpeut, Noyce, Siu, & Richardson, 2012)

1.1.3.1 Nucleocápside (N) de CDV

La nucleocápside (N) es un gen de 1683 nucleótidos, es altamente conservado aunque se ha reportado que nuevos aislados de CDV presentan un cierto grado de diversidad genética entre en las regiones que codifican para los dominios N'- y C' terminal (Keawcharoen, 2005). La proteína de la nucleocápside (N) es codificada por el gen N y presenta 525 aminoácidos (aa) (figura 1). La proteína N juega un papel importante en el ensamblaje del virus, la replicación, la transcripción, y también en la persistencia de la infección (Stettler M, 1995). El gen N es un candidato para el diagnóstico molecular del CDV (Martínez et al 2008).

1.1.3.2 Fosfoproteína (P) de CDV

EL gen de la fosfoproteína (P) mide 1.5 kb, codifica una proteína estructural (P) y dos no estructurales (C y V). La fosfoproteína P está constituida por 507 aa y es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación y forma parte activa del complejo RNP (figura 1) (Lamb, 2007). Es esencial para la replicación viral y está involucrada en todos los aspectos del ciclo viral.

Las proteínas C y V son consideradas no esenciales para la replicación in vitro. La proteína C es traducida a partir del mismo mRNA que P, pero presenta un codón de inicio alternativo situado 22 nucleótidos corriente abajo del codón iniciador de la proteína P. Esto produce un corrimiento en el marco abierto de lectura (ORF) generando un codón de paro prematuro, lo cual determina que la proteína C tenga una extensión de 174 aa (Bellini, 1985). La proteína V consta de 299 aa y es traducida a partir del mismo codón de inicio que la proteína P, sin embargo, mediante un proceso de edición del mRNA se añade una guanina que determina un corrimiento en el marco abierto de lectura y la formación de un codón de paro prematuro. Ambas proteínas presentan la misma secuencia de aa en los primeros 231 aa, pero los 68 aa del extremo carboxi-terminal de la proteína V difieren de los presentes en la proteína P (Cattaneo, 1989).

Se ha sugerido que las proteínas accesorias C y V involucradas en la evasión de la respuesta inmune mediada por el interferón- β (Lamb, 2007).

1.1.3.3 Hemaglutinina (H) de CDV.

El gen que codifica para la Hemaglutinina (H) tiene un tamaño de 1824 pb. La proteína H está conformada por 607 aminoácidos con un peso entre 72 y 80 kDa,

dependiendo del número de N-oligosacaridos en las cadenas laterales de las distintas cepas virales (Rima, Baczko, & Imagawa, 1987) (Iwatsuki, Miyashita, & Yoshida, 1997) (Harder, 1997). Es una proteína transmembranal tipo II, que media la unión de los viriones a los receptores celulares y posee la capacidad de promover la fusión virus-célula junto con la proteína de fusión (Lamb, 2007) (figura 2).

La proteína H presenta un dominio citoplasmático corto en su extremo N-terminal, un dominio hidrófobo transmembrana con funciones de localización y anclaje a la membrana, y un ectodominio C-terminal (Zipperle, 2010). Dicha proteína forma un tetrámero a nivel de la envoltura que interactúa físicamente con la proteína F (von Messling, 2004).

La glicoproteína H media la unión del virus a la membrana celular y la proteína F realiza la fusión de las dos membranas permitiendo la entrada de la RNP viral en el citoplasma (Stern, 1995) (Zipperle, 2010) (von Messling, 2004).

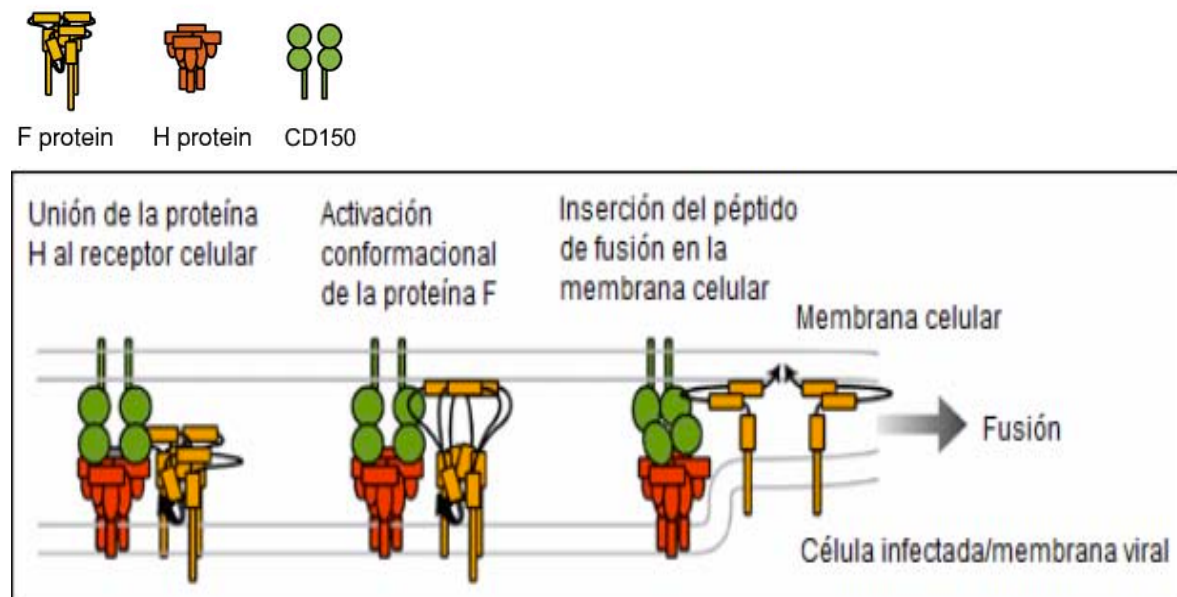


Figura 2. Representación del mecanismo de fusión virus-célula mediado por la hemaglutinina y la proteína de fusión (Von Messling, Zimmer, Herrler, Haas, & Cattaneo, 2011).

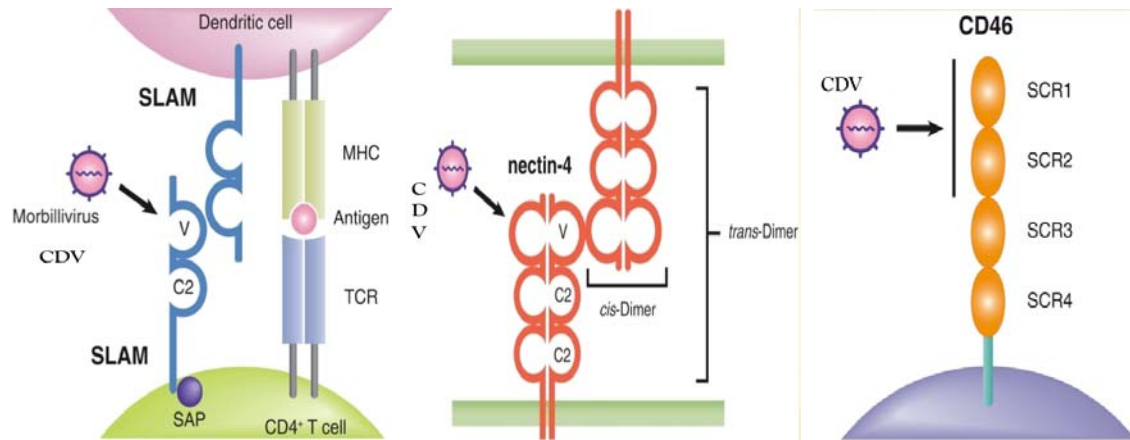


Figura 3. Receptores celulares de la proteína CDV (Sato, 2012).

La gH se une a los receptores celulares: SLAM-CD150 presente en linfocitos, células dendríticas y macrófagos, Nectina-4 en células epiteliales y de la glía y CD46 en células nucleadas como adaptación a la infección in vitro (Sato, 2012) (figura 3).

Estudios in vitro demostraron que la Hemaglutinina es el principal determinante del tropismo celular (Stern, 1995) además de ser el mayor determinante antigénico para la formación de anticuerpos neutralizantes (von Messling V. , 2001).

La secuencia de aminoácidos de la proteína H muestra una variabilidad de alrededor del 10% entre las diferentes cepas de CDV, en comparación con el resto de las estructuras proteicas que presentan un rango menor al 4 % de variabilidad. Estudios comparativos entre cepas del CDV han revelado que el gen H además de someterse a una mayor variación genética, presenta la mayor variación antigénica comparada con el resto de las proteínas que lo constituyen (Haas, Liermann, & Harder, 1999).

Se han encontrado diferencias en el patrón de glicosilación de la proteína H que contribuyen a cambios en la antigenicidad del virus (Iwatsuki, Miyashita, &

Yoshida, 1997). Estas variaciones pueden modificar epítomos relacionados con la neutralización viral (Haas, 1997; Haas, Liermann, & Harder, 1999; Harder, 1993; Iwatsuki, 2000; Blixenkroner-Møller, 1993).

En los últimos años se ha reportado una pronunciada diversidad genética del gen H en virus de campo recientemente aislados, esta situación puede generar cambios antigénicos que podrían traer diversas consecuencias como la falta de protección al emplear las cepas vacunales convencionales. (Gemma & Iwatsuki, 1996; Haas, 1997; Haas, Liermann, & Harder, 1999; Iwatsuki, 2000; Hiramama, 2004; Harder, 1997).

En los últimos años se ha presentado un aumento en la incidencia de casos positivos a CDV en la población canina y fauna silvestre presentándose varios episodios de la enfermedad en animales vacunados (Blixenkroner-Møller, 1993; Decaro, 2004; Gemma & Iwatsuki, 1996; Kai, 1993; Patronek, 1995; Scagliarini, 2003)

Diversos análisis de nuevas cepas de CDV identificadas en varias zonas geográficas y de diferentes especies animales ha puesto de manifiesto que la deriva genética/ antigénica que actúa sobre el gen / glicoproteína H de CDV es impulsada principalmente por un patrón geográfico. En consecuencia, un número importante de nuevos linajes han sido identificados de acuerdo con las cepas de campo circulantes (Carpenter, 1998; Perrone, Bender, & al, 2010; Haas, Liermann, & Harder, 1999; Harder, 1997; Iwatsuki, 2000; Martella, 2006; Mochizuki, 1999).

De acuerdo con la variabilidad genética de la proteína H se han establecido patrones de distribución geográfica entre las distintas cepas del virus. Hasta el

año de 2010 se reconocían siete linajes de CDV en todo el mundo: Asia-1, Asia-2, American-1, América-2, Ártico, Europa y Fauna Europea (figura 4).



Figura 4. Clasificación de los linajes de CDV. La clave de registro en el genbank se encuentra de lado izquierdo y el nombre del linaje al que pertenece de lado derecho (Zhao, 2010).

Las cepas vacunales tradicionales: Onderstepoort, Snyder Hill, Lederle y Convac pertenecen al linaje América-1 exceptuando a la cepa Rockborn. La mayoría de éstas fueron aisladas entre los años 1930-1950 (Dempsey & Mayer, 1934; Haig, 1956). La cepa Onderstepoort, usada en todo el mundo como una vacuna activada y se remonta a un brote de zorros criados en granjas de América del Norte en 1930 (Haig, 1956).

En última década se han identificado nuevas cepas circulantes en diversas partes del mundo como Argentina, Sudáfrica, Italia, Alemania, Japón, China, Corea, Tailandia, Brasil, Uruguay y México (Iwatsuki, 2000; Martella, 2006; Woma & Van Vuuren, 2010; Panzera & Calderón, 2012 ; Budaszewski, 2013; Zhao, 2010 ; An & Yoon, 2008; Sarute & Pérez, 2014).

Las nuevas cepas cepas circulantes además de presentar cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos en la proteína H, exhiben diferencias en los distintos sitios de glicosilación, así como una heterogenicidad antigénica demostrada a través del uso de anticuerpos monoclonales (Mabs) y policlonales contra dicha proteína, con respecto de las cepas vacunales existentes.

Estos cambios de secuencia no sólo han sido observados en la proteína H, sino también en proteínas conservadas como es el caso de la proteína N. (Martínez, 2011; Iwatsuki, 2000; Martínez, 2011; Martella, 2006; Mochizuki, 2002; Haas, 1997).

1.1.4 Antecedentes en México.

Un estudio previo basado en el análisis filogenético de los genes H y N de cepas circulantes del CDV en México, obtenidas los años 2007 y 2010, logró distinguir

10 variantes genéticas que constituyen un grupo único, claramente distinto de las cepas vacunales y de campo circulantes en todo el mundo (Martínez, 2011) .

Las secuencias de accesos a Genbank que fueron incorporadas a partir del estudio se muestran a continuación:

EdoMex1(GenBank N gene: FJ490185, H gene: HM771709), EdoMex2 (GenBank N gene: FJ490186, H gene: HM771710), EdoMex4 (GenBank N gene: FJ490188, H gene: HM771711), EdoMex6 (GenBank N gene: FJ490190, H gene: HM771712), EdoMex7 (GenBank N gene: FJ490191, H gene: HM771713), EdoMex8 (GenBank N gene: HM771704, H gene: HM771714), EdoMex9 (GenBank N gene: HM771705, H gene: HM771715), EdoMex10 (GenBank N gene: HM771706, H gene: HM771716), EdoMex11 (GenBank N gene: HM771707, H gene: HM771717), and GDL1 (GenBank N gene: HM771708, H gene: HM771718).

Las genovariedades mexicanas muestran 98.4%-99.9% de identidad entre nucleótidos (nt), un 91.3% -92.3% de identidad de nt con la cepa Onderstepoort y 96%-96,6% de identidad nt a la cepa A75/17 (Martínez, 2011). Se encontraron tres sitios potenciales de N-glicosilación conservados en casi todas las cepas de campo de CDV en la posición (391-393, 422-424 y 456-458) sin embargo la cepa Onderstepoort carece de los sitios de N-glicosilación (391-393 y 456-458).

El árbol filogenético del gen N agrupa todas las variantes de México en el mismo grupo, alejadas de las cepas vacunales y del resto de las cepas reportadas (figura 5).

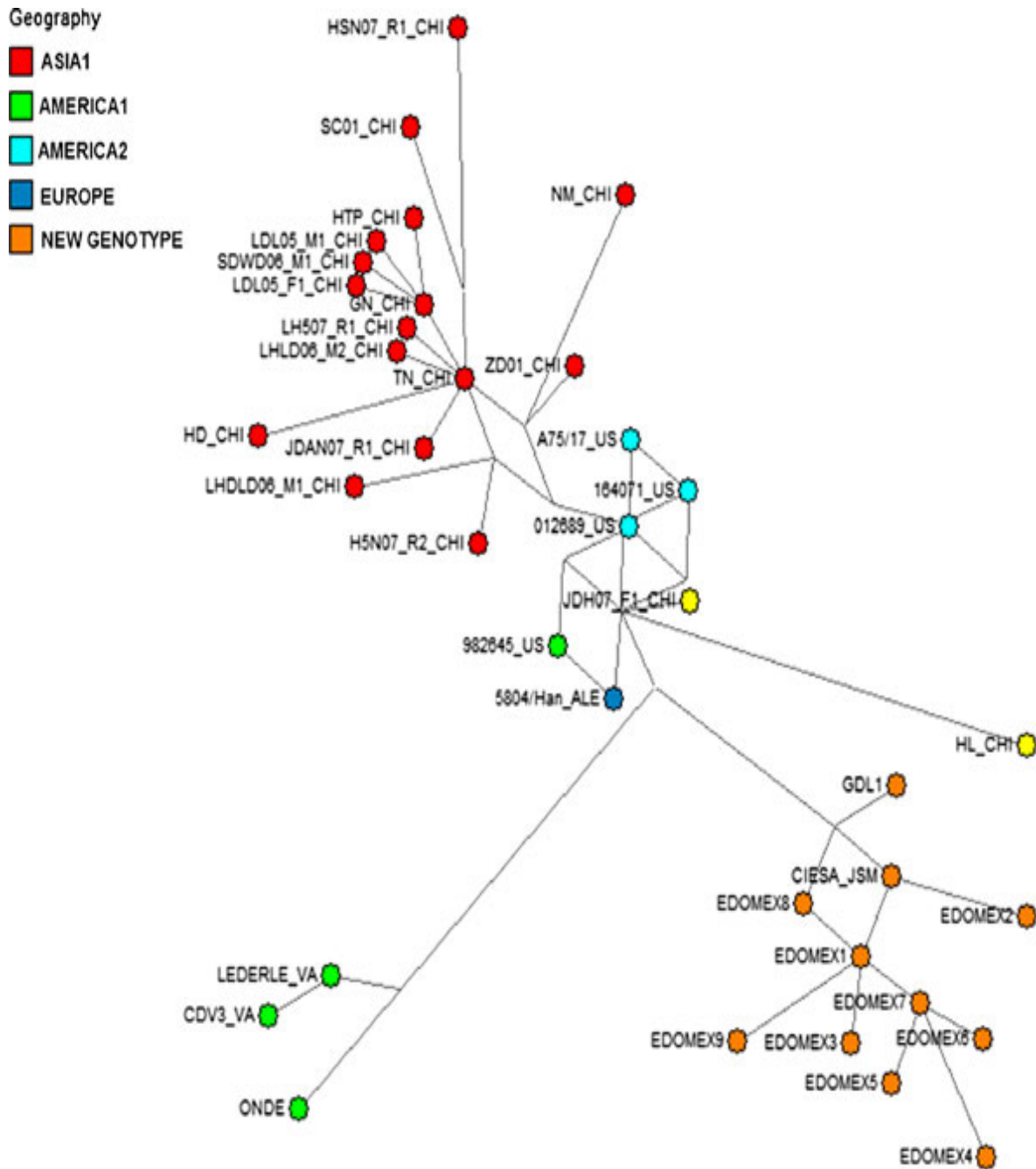


Figura 5. Análisis Filogenético del N de CDV, Median Joining network. Martinez S. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. Vet Res Commun. 2011.

El análisis filogenético derivado de las secuencias parciales 509 pb de longitud del gen H evidenció patrones geográficos (genotipos) se asemejan a los patrones

descritos anteriormente utilizando el gen de longitud completa H (Asia 1, Asia2, Europa, el Ártico, Latina1 y America2).

Todas las variantes de CDV en México forman un grupo diferente, que incluye a la cepa 19876 de América del Norte, detectada en Missouri, EE.UU., 2004 (Pardo & Johnson, 2005) (figura 6).

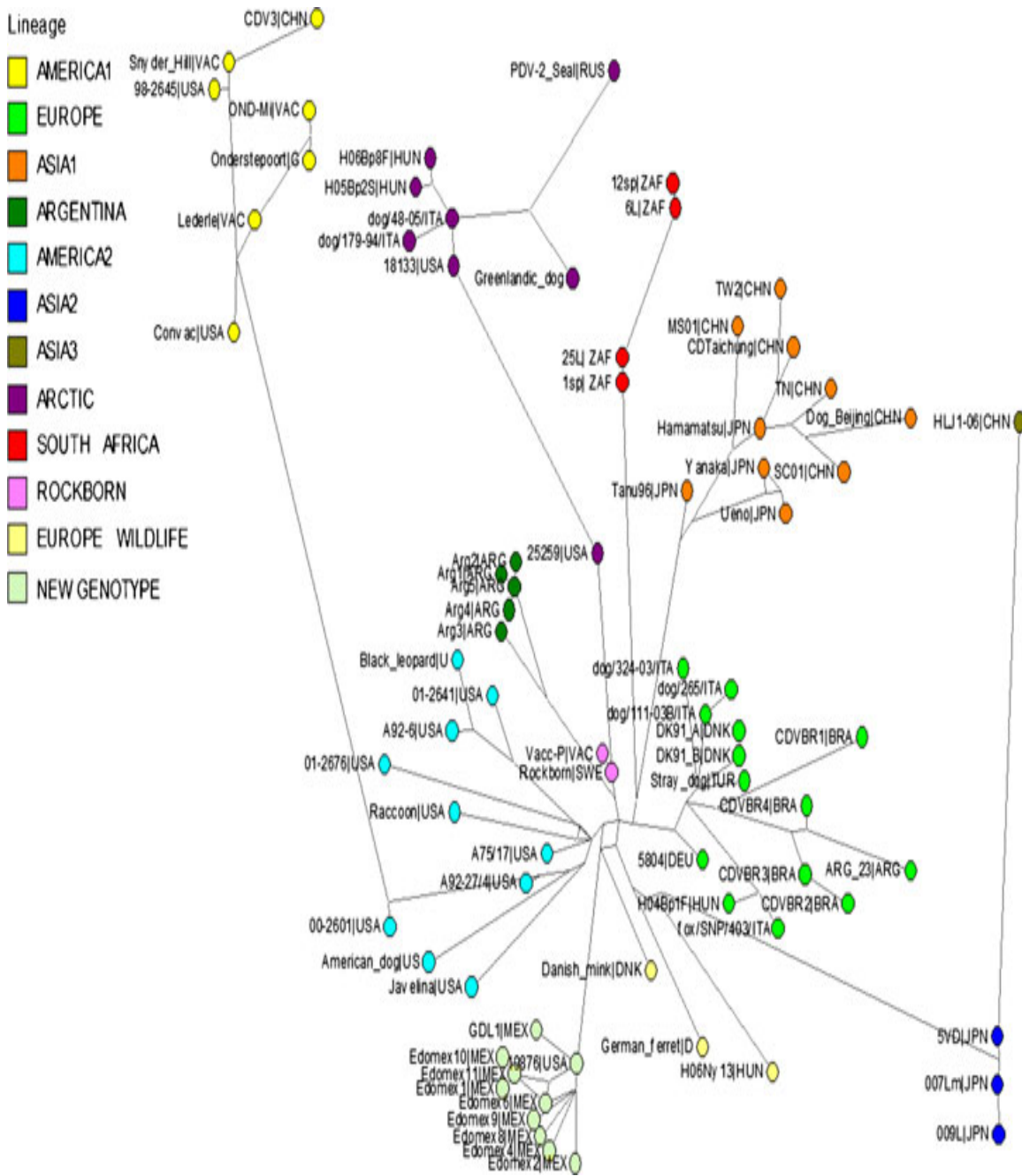


Figura 6. Análisis filogenético del gen H de CDV, Median Joining network. (Martínez, 2011)

1.1.5 Pruebas Diagnósticas

Múltiples pruebas se han desarrollado para detectar la presencia del virus o anticuerpos dirigidos contra el CDV. Existen algunas pruebas inmunológicas como las pruebas de inmunofluorescencia, ELISA, inmunocitoquímicas; así como pruebas moleculares como la prueba de la reacción de la cadena polimerasa (PCR) en sus diversas variaciones.

1.1.5.1 Ensayos Serológicos

1.1.5.1.1 Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Para la detección de anticuerpos dirigidos contra CDV (IgG e IgM) se utilizan pruebas como la Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se puede realizar en muestras de conjuntiva, tonsilas, epitelio respiratorio, sedimento urinario o LCR. En casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus. Existe la intervención de un operador para la interpretación de los resultados, lo que puede representar una desventaja al momento de generar los resultados. (Dong, 2007)

1.1.5.1.2 ELISA

La técnica de ELISA se emplea para la detección de anticuerpos IgG o IgM contra CDV y permite determinar el inicio o el desarrollo de la infección en animales con síntomas clínicos presuntivos de CDV. Sin embargo, animales con infección aguda pueden perecer sin presentar títulos mesurables de anticuerpos, o animales con infecciones subclínicas pueden presentar títulos de IgM semejantes a los de animales vacunados. Títulos de IgM altos son específicos para diagnosticar infecciones recientes del CDV, sin embargo la vacunación reciente con VMC puede dar resultados falsos positivos. (Appel & Summers, 2009).

1.1.5.1.3 Seroconversión

La medición de anticuerpos IgM séricos (contra las proteínas N y P) e IgG (contra los antígenos H y F), es utilizada en el diagnóstico de CDV, pero la prueba no diferencia los anticuerpos por infecciones subclínicas, de los anticuerpos maternos y los anticuerpos vacunales.

La detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos no es suficiente para el diagnóstico. Los perros no vacunados, infectados en forma aguda pueden morir sin la aparición de anticuerpos neutralizantes mientras que los infectados en forma subaguda o crónica, pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los perros vacunados.

La IgM puede ser detectada en perros infectados no vacunados, entre los 6 y 8 días post infección. La IgG aparece entre los 10 y 20 días. La prueba de ELISA para la detección de IgM específica contra el CDV puede ser de utilidad, ya que la IgM en perros infectados persiste por 5 semanas a 3 meses dependiendo de la cepa y la respuesta del huésped. En perros vacunados la IgM persiste aproximadamente 3 semanas. En perros que mueren en forma aguda pueden observarse falsos negativos, sin la presencia de respuesta inmune, esto también puede ocurrir en presentaciones subagudas o crónicas.

Para la detección de IgG se miden los títulos séricos en muestras con 2 semanas de diferencia (los títulos únicos no son recomendables), únicamente tiene valor en perros que no han sido vacunados dentro del mes anterior, un aumento de cuatro

veces o mas, entre el suero de la fase aguda y convaleciente, es señal de una enfermedad activa. (Waner, 2003).

1.1.5.2 Técnicas Moleculares

1.1.5.2.1 RT-PCR

Esta prueba permite detectar el RNA viral y puede resultar positiva aun cuando las pruebas de aislamiento viral e inmunofluorescencia no logran detectar al virus. En los estudios diagnósticos, los blancos de amplificación son genes o regiones genómicas que presentan un alto grado de conservación entre los aislamientos, como N y P (Si, 2010).

Las pruebas tradicionales de identificación y detección de anticuerpos, son casi obsoletas comparadas con ésta tecnología; un resultado positivo de PCR nos indica, casi sin margen de error, que el ARN del agente está presente en el animal y la infección está presente.

La sensibilidad de ésta prueba ha sido incrementada notablemente, por medio de la variante anidada, que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN mas extensa, que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como molde de una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica.

Una prueba de PCR puede detectar infecciones incluso al segundo día post-infección (no debemos esperar el tiempo necesario para que se produzca la seroconversión).

Es posible encontrar falsos positivos alrededor de 1 a 2 semanas luego de la vacunación. Un resultado positivo es un buen indicador de enfermedad, sin embargo un resultado negativo, no descarta la infección por CDV, sobretodo si la muestra se toma en forma tardía durante el curso de la enfermedad, o sea cuando la presencia y eliminación del virus han disminuido.

1.1.5.2.2 RT-PCR Tiempo Real

El desarrollo de la tecnología de la RT-PCR en tiempo real constituye uno de los aportes más relevantes aplicados en diagnóstico viral (Mackay, 2007; Scagliarini, 2003). Mediante esta técnica, se han implementado metodologías diagnósticas más rápidas y específicas, capaces de detectar al agente viral incluso en muestras con baja carga viral, la detección de un bajo número de copias de RNA viral es útil para la identificación de perros con manifestación subclínica. (Scagliarini, 2007).

La PCR en tiempo real permite la cuantificación de la técnica de PCR. En esta prueba se pueden emplear sondas tipo Taqman (marcadas con fluorocromos). Las sondas de hidrólisis son oligonucleótidos que presentan fluorocromos en ambos extremos y tienen una secuencia complementaria a parte del fragmento de ADN que se quiere amplificar. Uno de los fluorocromos actúa como donador de fluorescencia en el extremo 5' y el otro como aceptor de esta fluorescencia en el extremo 3'. La ADN polimerasa se desplaza sobre la cadena de ADN sintetizando la cadena complementaria a partir de un fragmento de ADN que sirve de molde

(cebador). Al llegar al punto en el que la sonda se ha hibridado, la hidroliza. El fluorocromo del extremo 5' de la sonda (el donador) es liberado. El fluorocromo aceptor no puede entonces absorber la fluorescencia del donador por estar alejado de él espacialmente. Un detector realiza la medida de esta emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN presente, y la representa gráficamente.

Además de proporcionar información cuantitativa, la PCR en tiempo real presenta otra serie de ventajas frente a la PCR tradicional. La fundamental es su mayor sensibilidad lo que disminuye el riesgo de falsos negativos. El hecho de que los datos sean tomados en la fase exponencial del proceso asegura que ningún componente pueda estar limitando el proceso de amplificación. También es más rápida y tiene menos probabilidad de contaminación con lo que disminuyen los falsos positivos. Son muchas las aplicaciones de esta técnica en el campo de la medicina veterinaria, como la cuantificación viral, la cuantificación de la expresión de genes, el control de la eficacia de fármacos, la detección de agentes infecciosos, el diagnóstico de tumores y la detección de polimorfismos (Scagliarini, 2007).

1.1.6 Sistema de Expresión de Proteínas en Baculovirus.

Los Baculovirus son virus ADN de doble cadena circular que infectan únicamente a insectos. En la década de 1940 se comenzó la utilización de los baculovirus como bioinsecticidas (Summers, 2006). Es a partir de 1980 cuando se inicia el desarrollo de este virus como un vector en la expresión de proteínas recombinantes, las cuales sufren procesos de modificación post-traduccionales semejantes a las que ocurren en células de mamífero, conservando así sus

propiedades biológicas, tales como, fosforilación, glicosilación y plegamiento (Harrison & Jarvis, 2006), utilizando como hospedero líneas celulares de insecto.

En el baculovirus es posible manipular la expresión de las proteínas recombinantes, logrando exhibir antígenos protectores en su superficie. Esto, aunado a la capacidad del virus de penetrar células de mamíferos, aves y peces, los convierte en potenciales y eficientes vectores de inmunización por vía sistémica, oral y nasal (Luckow & Lee, 1993) (Summers, 2006).

Este sistema produce altas concentraciones de proteína, principalmente porque utiliza el promotor del gen de la poliedrina (polh). La poliedrina puede constituir hasta el 50% de la proteína en una célula infectada por el virus silvestre. La función de esta proteína *in vivo* es proteger al virus del ambiente. Tal protección no es necesaria *in vitro*, por lo que es posible sustituir dicho gen por el gen recombinante de interés sin afectar la replicación viral (Palomares, 2010).

Existen diversos sistemas comerciales para la expresión de proteínas recombinantes en baculovirus, el sistema de expresión de baculovirus Bac to Bac® que se utiliza en el Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ, UNAM; aprovecha las propiedades de transposición específicas del sitio del transposón Tn7 para simplificar y mejorar el proceso de generación de ADN recombinante en bácmido (genoma de baculovirus que lleva orígenes independientes para la replicación en bacterias o células de insecto) (Luckow & Lee, 1993). Este sistema puede ser modificado para investigar cualquier gen de interés mediante la sustitución del gen de la poliedrina (Palomares, 2010). (Yang, 2009).

2 JUSTIFICACIÓN

En México se conoce poco sobre la situación epidemiológica del Distemper canino; se ha reportado que las cepas circulantes del CDV forman un grupo genético distinto con respecto a otros ya descritos mundialmente, incluyendo las cepas vacunales. Sin embargo, sólo se han estudiado un número limitado de muestras por lo que se desconoce la prevalencia de este nuevo genotipo. Además, no se tiene suficiente información acerca de si las cepas vacunales circulan o si existe la presencia de variantes revertantes.

Aún cuando se ha demostrado la que las cepas circulantes conforman un clado genético local único, se desconoce si existe variación antigénica que conlleve tanto a una inadecuada protección por parte de las vacunas así como a una deficiencia en el reconocimiento por los sistemas comerciales de diagnóstico serológico disponibles en el mercado.

Para extender el estudio filogenético de las cepas circulantes es indispensable la identificación de muestras clínicas positivas al CDV, por lo que es importante contar con recursos moleculares de diagnóstico estandarizados. Para ello es necesario obtener un aislamiento viral de la cepa local para en un futuro estudiar las características antigénicas y la existencia de posibles variantes en el virus de Distemper canino por experimentos de seroneutralización cruzada. Este aislado también podrá ser usado como cepa de desafío en experimentos de protección y de dinámica de la infección.

Un recurso diagnóstico es la determinación de anticuerpos contra CDV por lo que la construcción de un antígeno recombinante seleccionado a partir de cepas locales, podría emplearse en la elaboración de un sistema diagnóstico tipo ELISA,

así como en la elaboración de un inmunógeno. Un factor necesario para la evaluación de la expresión de la hemaglutinina recombinante es la elaboración de un suero hiperinmune.

3 HIPÓTESIS

El virus de distemper canino que circula en México corresponde a una estirpe local exclusiva del país y no se encuentran otras variantes genéticas. El asilamiento viral del VDC llevará a la secuencia completa del gen H, a su clonación y expresión en baculovirus.

4 OBJETIVO GENERAL

Estudiar las variantes genéticas presentes del virus de distemper canino a partir de casos clínicos; así como realizar el asilamiento viral y la clonación del gen completo de la hemaglutinina de una cepa de campo.

5 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtención de muestras clínicas positivas al virus de distemper canino.
2. Implementación de dos pruebas moleculares para el diagnóstico cualitativo y cuantitativo del CDV.
3. Análisis de la variación genética de la Hemaglutinina del CDV a partir de las muestras positivas.
4. Expresión de la Hemaglutinina (H) recombinante del virus de distemper canino a partir de una cepa local candidata, en baculovirus.
5. Aislamiento de una cepa circulante de distemper canino.
6. Obtención de suero hiperinmune contra CDV.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Genética y Bioestadística perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM).

6.1 Muestras.

Se obtuvieron 21 muestras clínicas positivas al virus CDV en Hospitales y Clínicas del D.F así como el Servicio de Dx del Laboratorio de Virología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

6.2 Purificación de ARN.

Se emplearon 500 μ l de suero, sangre u orina, se agregó 1000 μ l del Reactivo RNAGet (Biotecnologías Moleculares SA de CV). Posteriormente, se adicionaron 200 μ l de cloroformo y se centrifugó a 14,000 rpm/ 10 min. Se separó la fase acuosa superior donde se encuentra el ARN. Se precipitó el ARN, agregando 500 μ l de alcohol isopropílico, se incubó a -20°C durante 30 minutos. Se continuó centrifugando a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C , se desecha el sobrenadante. El precipitado de ARN se lavó con etanol al 75% en agua dietil pirocarbonatada (DEPC), las muestras fueron centrifugadas y se desechó el sobrenadante. El ARN se secó a 55°C por 15 min, y fue suspendido en 30 μ l de agua DEPC.

6.3 Amplificación de dos fragmentos del gen que codifica para la Fosfoproteína (P) de CDV mediante PCR anidada.

Para la identificación molecular del CDV se empleó un sistema de PCR anidado, el cual consiste en dos reacciones de PCR sucesivas, en donde la segunda PCR o

anidada amplifica un segmento interno del primer producto de amplificación (figura 7) lo cual garantiza una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico. Para ello se alinearon las secuencias del gen de la Fosfoproteína del CDV y se diseñó un primer juego de iniciadores (iniciadores externos) el cual amplifica una región de 430 pb (ver cuadros 1 y 2) y una segunda reacción de PCR (iniciadores anidados o internos) el cual amplifica una región de 420 pb.

Sentido	Secuencia	# Bases	Fragmento
MorPF	5'GTTACCATGTTTATGATCAC 3'	20	430 pb
MorPR	5'TTGACTTKDGCARRTYGGG'3	20	

Cuadro 1. Iniciadores empleados para la amplificación de un fragmento de 430 pb del gen P de CDV

Sentido	Secuencia	# Bases	Fragmento
MorAPF	5'AGCGGTGAARMGGTTRARGG 3'	20	420 pb
MorAPR	5'GGTTGCACCACCTGTCRATS 3'	21	

Cuadro 2. Iniciadores empleados para la amplificación de un fragmento anidado de 420 pb del gen P, CDV.

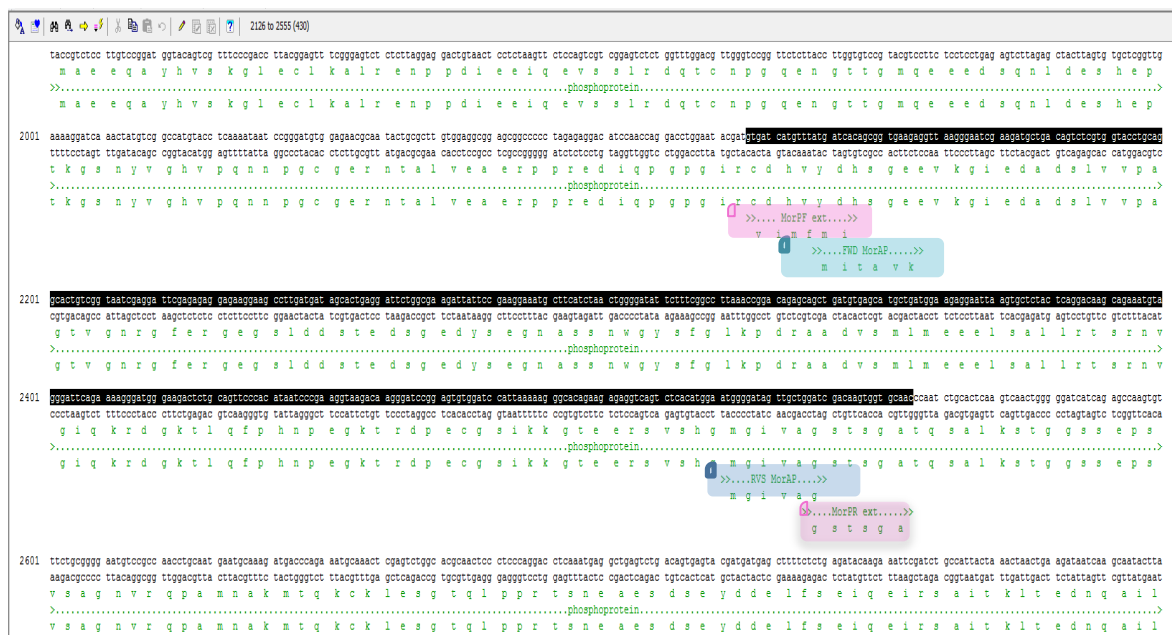


Figura 7. Alineamiento de nucleótidos con iniciadores. MorPF y MorPR externos (rosa), MorAPF y MorAPR internos (azul).

Para la síntesis de ADN complementario (cDNA) se utilizó el iniciador delantero MorPF [50 pmol], dNTP's [1 mM], enzima transcriptasa reversa [200u/μl], amortiguador de reacción 1x, inhibidor de RNAsa [20u/μl], Agua DEPC cbp 20 μl y 9.5 μl de ARN. Las condiciones de retrotranscripción en el termociclador fueron: 5' a 70°, 3' a 4°, 42° durante 1 hora y 70 ° por 10 minutos.

Se utilizó como control positivo el ARN de la vacuna NOBIVAC® PUPPY DP. La PCR anidada se estandarizó con los iniciadores internos (cuadro 2). La primer PCR fue realizada empleando cDNA del gen P.

Las condiciones de las reacción de PCR fueron las mismas para la 1er y 2da PCR: Iniciadores [0.8 μM], dNTP's [0.2mM], MgCl₂ [1.5 mM], amortiguador de reacción 1x, Taq polimerasa 2 μl]. La amplificación con los diferentes pares de iniciadores se realizó con el protocolo: desnaturalización durante 5' a 94 °C, seguido por 30 ciclos a 94 °C durante 30'', la alineación por gradiente de temperaturas de 56 a 60 °C durante 30'' y extensión a 72 °C durante 30'', con una extensión final de 15' a 72 °C. Los productos de amplificación se corrieron por electroforesis en agarosa al 3% en buffer TAE junto con el marcador de peso molecular pBR. Los geles de agarosa fueron, teñidos con bromuro de etidio 100 μg/ml y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.4 Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR).

Se estandarizó una prueba por PCR Tiempo Real cuantitativa segunda para la detección del virus de CDV. Se sintetizaron los iniciadores y una sonda tipo TaqMAN los cuales se muestran en el cuadro 3, éstos amplifican y detectan un fragmento de 83 pb del gen de la Nucleocápside (N) del CDV (figura 8). El fragmento fue clonado en un vector T, para la clonación de un control estándar de

cuantificación. Además este sistema amplifica simultáneamente un segmento del transcrito de beta actina celular, como control interno, que monitorea la purificación y estabilidad del RNA y permite descartar falsos negativos (Elia, 2006).

	Iniciadores	Secuencia	# Bases
Fragmento del Gen de la Nucleocápside	CDV-Fb	5' agctagtttcatcttaactatcaaatt3'	27pb
	CDV-Rb	5' ttaactctccagaaaactcatgc 3'	23pb
	CDV-Pbb	5' [HEX] - accaagagccggatacatagtttcaatgc- [TAMRA] 3'	30pb
83 pb			

Cuadro 3. Iniciadores empleados para la qPCR amplificando un fragmento de 83 pb del gen N de CDV.

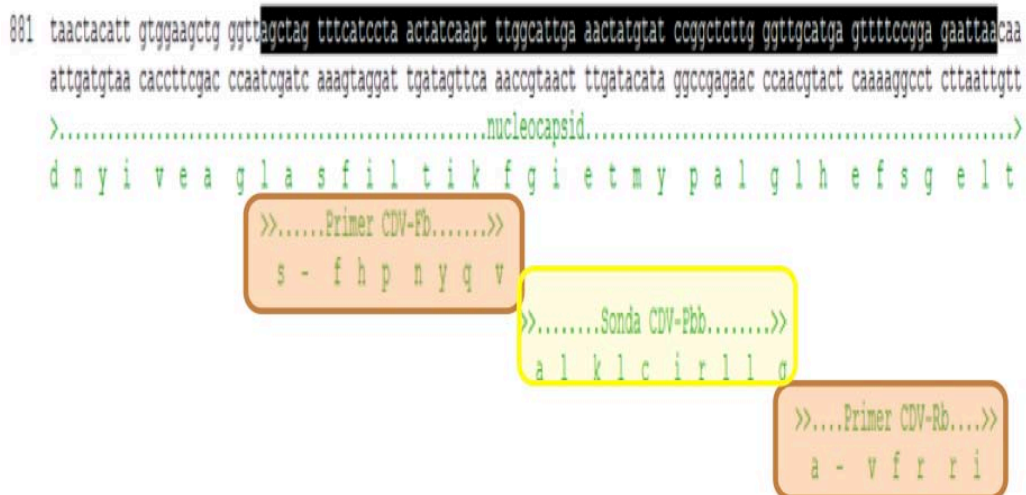


Figura 8. Alineamiento de nucleótidos con iniciadores para la amplificación de un fragmento de 83 pb del gen N (anaranjado) sonda TaqMAN (amarillo).

Las condiciones para la amplificación por PCR en Tiempo Real se muestran en la cuadro 4.

Reactivo	Concentración del Stock.	Concentración Fina	Reacción
Buffer	10x	1x	2µl
MgCl ₂ 30mM	30mM	3mM	2µl
dNTPs 2mM	2mM	0.2µM	2µl
Iniciadores N CDV	10 µM	0.5µM	1µl
Iniciadores B actina	10 µM	0.5µM	1µl
Sonda CDV	10 µM	0.1µM	0.2µl
Sonda B actina	10 µM	0.1µM	0.2µl
Taq Pol	5U/µl	2 U	0.4µl
H ₂ O	Cbp	cbp 10µl	2.4µl
ADN	-	-	10µl

Cuadro 4. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción.

Las condiciones de temperatura para la PCR-TR se muestran en el cuadro 5.

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

Cuadro 5. Temperaturas y número de ciclos para la qPCR.

6.4.1 Amplificación y Clonación del Control Estándar de Cuantificación PCR Tiempo Real (N).

Se amplificó un producto de 83 pb del gen N a partir del virus vacunal Onderstepoort de CDV, el cual fue purificado por la técnica de Nal con perlas de sílice.

6.4.2 Purificación de los amplicones.

Las amplificaciones obtenidas por PCR, fueron separados por electroforesis en genes de agarosa al 3 %. Las bandas de los amplicones fueron recortadas del gel de agarosa y purificadas por el método de yoduro de sodio (Boyle y Lew, 1995). Los fragmentos recortados de agarosa se pesaron y incubaron a 55°C con 3 volúmenes de NaI 6M. Se adicionaron 15 µl de perlas de sílice y se incubaron 30 minutos a 4°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 8000g/4 minutos/4°C y las pastillas se lavaron 2 veces con 500 µl de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris HCl pH7.5 10mM, EDTA 2.5mM, etanol 50% v/v). La pastilla se secó y resuspendió en H₂O. El ADN se eluyó de las perlas por incubación durante 10 minutos a 55°C. Posteriormente la suspensión es centrifugada para recuperar el ADN. Las muestras de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

6.4.3 Clonación en el vector pTZ57R/T.

El ADN de los fragmentos obtenidos de la purificación, se clonó en el vector comercial pTZ57R/T. Las reacciones de ligación se hicieron en una relación molar inserto: vector 3:1, se utilizó 100 ng del ADN del amplicon y 110 ng de ADN del vector, agregando 1 unidad de T4-ligasa en su amortiguador específico, posteriormente se incubó toda la noche a 4°C.

6.4.3.1 Transformación de células competentes.

Fueron transformados 50 ng de ADN de la ligación previa en 100 µl de las bacterias competentes *Escherichia coli* DH5α. Se incubaron por 30 minutos en hielo, posteriormente 1 minuto a 42°C, después se les adicionó 900 µl de medio LB y se incubaron 1 hora a 37°C en agitación. Al término de la incubación, se

espatuló 200 μ l del cultivo sobre placas de agar LB con 100 μ g/ml de ampicilina, Xgal (266 μ g/ml) e IPTG (266 μ g/ml). Estas placas se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.4.3.2 Identificación de clonas recombinantes por PCR en punto final.

Se eligieron colonias las blancas, las cuales se crecieron en placas de LB-ampicilina y a la par se colocaron en tubos de 200 μ l que contenían 50 μ l de agua destilada estéril. Las colonias que se encontraban en los tubos fueron lisadas a 94°C por 10 min. Esta suspensión fue utilizada para la PCR con los iniciadores de los plásmidos M13. Aquellas clonas positivas a PCR se crecieron en medio líquido de LB con ampicilina para obtener ADN plasmídico.

6.4.3.3 Purificación de ADN plasmídico recombinante a pequeña escala (Miniprep).

Las colonias bacterianas recombinantes se sembraron en 9 ml de LB con 100 μ g/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. El cultivo es centrifugado a 3,500 rpm por 6 min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla se resuspendió en 600 μ l de solución de lisis (8% Sacarosa, 5% Tritón X-100, 50 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8), y fue incubada temperatura ambiente por 10 minutos. Se adicionó lisozima (1.25 μ g/ μ l) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se hirvió en baño de agua por 1 min y se centrifugó 10 minutos a 12,000rpm.

Se recuperó el sobrenadante y se adicionó RNAsa (15 μ g/ml) y proteinasa K (50 μ g/ml). Se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto e incubaron a -20°C por 30 minutos, después se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm. Finalmente se lavó la pastilla con etanol al 70%, y se resuspendió en 100 μ l de agua estéril. Las

muestras de ADN se verificaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Análisis de la variabilidad genética del gen H.

Sentido	Secuencia	#Bases	Fragmento
DiSecF	5'GGATCCTGGTTCACAARATGGTATYC 3'	20	
DiSecR	5'GGATCC CAACACCACTAAATTGGACT 3'	20	612 pb

Cuadro 6. Iniciadores utilizados para la amplificación de un fragmento de 612 pb del gen H de CDV (Martinez S, 2011).

Las muestras que resultaron positivas mediante los métodos diagnósticos descritos anteriormente, se utilizaron para la amplificación y secuenciación de un fragmento de 612 pb del gen H del CDV.

Los iniciadores para la amplificación de este fragmento H se obtuvieron a partir del artículo del Dr. José Simón Martínez Castañeda 2011 (ver cuadro 6) (Martínez, 2011).

Los amplicones fueron clonados en el vector T comercial pTZ57R/T.

6.4.4 Secuenciación de las clonas obtenidas.

Se seleccionó 1 clona de cada muestra para realizar las reacciones de secuenciación. Para cada reacción se incluyeron 250-300 ng de ADN plasmídico, se realizaron 2 reacciones de secuencia por muestra, utilizando el iniciador del fragmento H delantero y reverso a 5 pM , 1 µl de Big dye y 2 µl de Buffer, estos últimos dos son reactivos del kit comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied biosystems™). Las condiciones del termociclador fueron: 1 ciclo de 94 °C por 4, seguido de 25 ciclos de 94°C por 10', 52°C por 15' y 50 °C durante 4 minutos.

Los productos de secuenciación fueron filtrados por cromatografía de exclusión molecular con sephadex g50. A cada columna se agregaron 600 µl de sephadex, se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugaron las columnas a 3000 g por 3 minutos. Posteriormente la columna se colocó en un tubo limpio de 1.5 ml y se adicionó el contenido de la reacción de secuencia. Se repitió el paso de centrifugación.

La muestra se secó al vacío y se mantuvo protegida de la luz. Las muestras fueron enviadas al instituto de Investigaciones Biomédicas –UNAM para su lectura en un secuenciador automatizado.

6.4.4.1 Ensamblaje de secuencias y análisis genético.

Para cada clona secuenciada se generó una secuencia consenso con ambos sentidos del ADN. En este análisis se empleó el software Chromas Pro.

Con la secuencia consenso de cada clona fueron analizados los polimorfismos que existían entre ellas y en comparación con la secuencia descritas a nivel mundial, incluyendo las cepas vacunales. Este análisis se realizó mediante el alineamiento de nucleótidos y de aminoácidos, empleando el software Clone Manager Professional Suite, Versión 9,0. Una vez secuenciado se llevó a cabo el análisis filogenético basado en el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining para la selección de la cepa candidata a la construcción del Ag recombinante H.

Las variantes que se obtuvieron en este estudio, fueron incluidas en análisis de relaciones genéticas con otras cepas reportadas en estudios previos en: América, África, Europa, Asia y el Ártico. Las secuencias de accesos a Genbank que fueron incorporadas para la relación genética del gen H se muestran a continuación:

AY964110, HM771709, HM771710, HM771711, HM771712, HM771713, HM771704, HM771714, HM771705, HM771715, HM771706, HM771716, HM771707, HM771717, HM771708, HM771718, AY445077.2, AF259552.1, DQ778941.1, Z35493.1, EF418782.1, AF305419.1, AB250736.1, AY26496.1, AY498692.1, AF164967.1, Z54156.1, FJ461696.1, FJ461712.1, FJ461721.1, FJ461703.1, Z477760.1, DQ889184.1, DQ889178.1, AY964108.1, AM422848.1, AM422847.1, AM22850.1, AM422849.1, AM422846.1, AB252718.1, AB212730.1, AY297454.1, AB016776.1, AY378091.1, D85754.1, FJ535063.1, EU098105.1, EU098104.1, EU098103.1, EU102.1, AF478546.1, Z47759.1, DQ889189.1, X84999.1, GU810819.1, JX912978, JX912976, JX912978, JX912975, JX912971, JX912961.

6.5 Amplificación y clonación del gen H del CDV circulante en México.

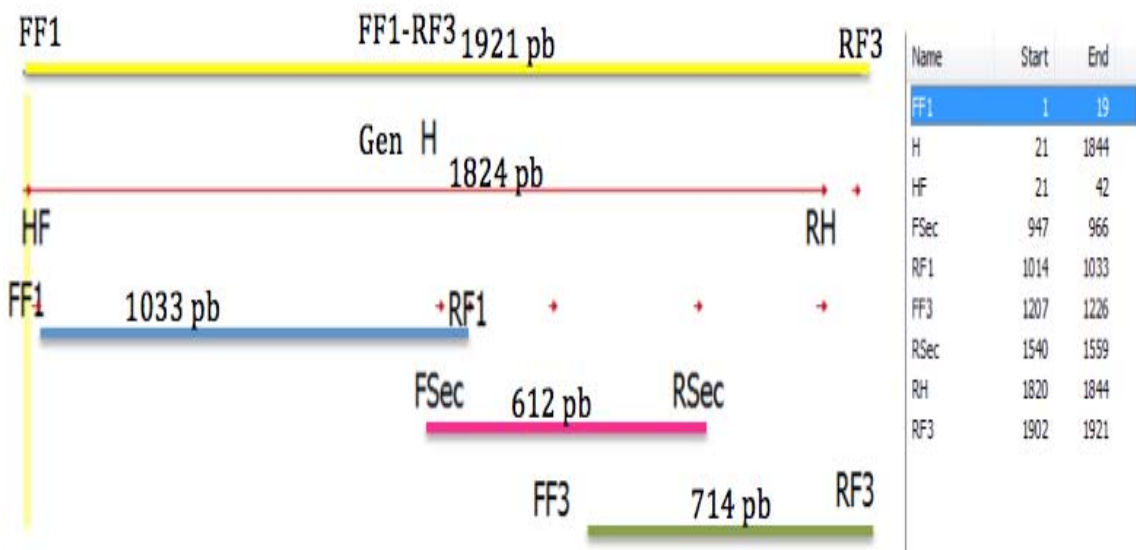
Para la amplificación del gen H, se seleccionó una muestra que se logró aislar en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ, UNAM, la cual pertenecía al grupo más representativo del clado mexicano. La amplificación completa del gen H se llevó a cabo mediante la estrategia de unión de 3 fragmentos. Se utilizaron 3 juegos de iniciadores que se muestran en la cuadro 7 y en la fig. 9 respectivamente. El ensamblado de estos iniciadores generó un fragmento de 1921 pb, con la finalidad de realizar una PCR anidada, teniendo como PCR externa la amplificación de los fragmentos F1 a F3, para posteriormente realizar la amplificación interna con los iniciadores específicos para el gen H (1824 pb).

Sentido	Secuencia	# Bases	Fragmento
---------	-----------	---------	-----------

FF1	5'AGGGCTCAGGTASTCCARC 3'	19	1033 pb
RF1	5'GCRACAGGTATCACYTCYTC 3'	20	
DiSecF	5' TGGTTCACAARATGGTATYC 3'	20	612 pb
DiSecR	5' CAACACCACTAAATTGGACT 3'	20	
FF3	5'AACCCTTYGGAGGAGKACAG 3'	20	714 pb
RF3	5' TAATACAATCRTCKGTAAGG 3'	20	

Cuadro 7. Iniciadores utilizados para el ensamblado del gen H completo. El diseño de los iniciadores RF1 y RF3 se realizó en el laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ, UNAM, el fragmento DiSec F-R se tomó del artículo del Dr. Martinez S. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. Vet Res Commun. 2011.

Figura 9. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV. FF1: Iniciador delantero del fragmento 1, RF1: Iniciador reverso del fragmento 1, FSec: Iniciador delantero del fragmento 2, RSec: Iniciador reverso del fragmento 2,



FF3: Iniciador delantero del fragmento 3, RF3: Iniciador trasero del fragmento 3, FF1-RF3: Amplificación de los 3 fragmentos, Gen H: Gen Hemaglutinina.

La estrategia de unión de los fragmentos se realizó a partir del siguiente protocolo: Cada uno de los fragmentos fue amplificado de manera individual y se clonaron en el vector pTZ57 R/T. A partir del ADN plasmídico se realizó una amplificación y purificación de cada uno de los fragmentos.

Se llevaron a cabo dos amplificaciones iniciales:

- Unión del fragmento F1-F2, utilizando el iniciador delantero de F1 con el iniciador reverso del F2 (DiSecR).
- Unión del fragmento F2-F3, utilizando el iniciador delantero de F2 con el iniciador reverso del F3.

Una vez amplificados ambos fragmentos se realizó la unión de F1 a F3 como se muestra en la cuadro 8.

Amplificación del fragmento externo F1 a F3.

Ciclos					
Sustratos	Concentración inicial	Concentración final		94°C/5'	1 ciclo
Fragmentos (F1-F2, y F2- F3)	--	--	2µl por fragmento	94°C/30''	30 ciclos
Iniciadores F1 FWD – F3 RVS	10 Mm	0.4 µM	0.8 µl	56°C/30''	
Buffer	10x	1 x	2 µl	72°C/1'30''	
dNTP's	2 Mm	0.2 Mm	2 µl	72°C/5'	1 ciclo
MgCl ₂	30Mm	1.5 Mm	1 µl	4°C	∞
Taq pol	5 u/µl	1u/rx	0.2 µl		
H ₂ O	cbp 20 µl		8.8 µl		

Cuadro 8. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción F1-F3.

Como estrategia para la clonación en el sistema Bac to Bac® se amplificó el gen completo H con el siguiente juego de iniciadores (cuadro 9), los cuales contienen los sitios de corte para la enzima BamH1; este amplificado se clonó en el vector pTZ57R/T.

Sentido	Secuencia	# Bases	Fragmento
DiHF5'	5' GGATCC ATGCTCTCYTACCAAGACAAGG 3'	22	1824pb
DiHR5'	5' GGATCC TCARGGWTTTGAACGGTTACATGAG 3'	25	

Cuadro 9. Iniciadores para la amplificación del gen completo H, a los cuales se les añadió los sitios de corte para BamH1.

6.5.1.1 Clonación del gen H en el vector pFHBTa.

El ADN plasmídico a partir de la clonación en pTZ57R/T se digirió con la enzima BamHI para recuperar el inserto (cuadro10).

Reactivo	Stock	Final	1 rx.
ADN plasmídico	-	1 µg/rx	50 µl
BamH1	50u/µl	1u/rx	1 µl
Buffer con BSA	10X	1X	15 µl
H ₂ O	-	cbp 150 µl	83.5 µl

Cuadro 10. Protocolo de Digestión del plásmido recombinante con la enzima BamH1.

El inserto linealizado y liberado se clonó en el vector pFHBTa con el siguiente protocolo (cuadro 11):

Reactivos	Stock	Final	1 rx.
Vector pFBHTa	100ng/µl	200ng	2µl
Inserto	40ng/µl	70ng	1.75µl
Buffer de ligación	10X	1X	2µl
T ₄ ligasa	1U/µl	1 U/rx	1 µl
Agua		cbp 20µl	13.25 µl

Cuadro 11. Protocolo de la ligación en el vector pFasBac.

Se seleccionaron las colonias por PCR utilizando los iniciadores del inserto, para posteriormente seleccionar solo las clonas correctamente orientadas, esto se realizó utilizando los iniciadores del inserto y del vector, las clonas correctamente orientadas se amplificaron con el iniciador anterior del vector y el iniciador posterior del inserto, y las clonas incorrectamente orientadas con los iniciadores anterior del vector y el iniciador anterior del inserto.

Se llevó a cabo la técnica de mini preparación para recuperar el ADN del plásmido. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la extracción y ver la calidad del ADN.

6.5.1.1.1 Transposición en células competentes DH10BAC.

Se realizará la transposición en células competentes DH10BAC, las cuales han sido modificadas genéticamente y con ayuda de un plásmido cooperador insertan en su genoma el ADN plasmídico obtenido de la clonación anterior. Se llevó a cabo el siguiente protocolo de transformación:

1. Se colocaron 100 μ l de células competentes DH10BAC en hielo.
2. Se agregaron 40 ng del plásmido recombinante y se mezclaron.
3. Se incubó en hielo 30 minutos.
4. La mezcla se expuso a un choque térmico de 42°C por 1 minuto.
5. Se enfrió en hielo durante 2 minutos.
6. Se agregaron 900 μ l de medio SOC.
7. Los tubos se incubaron en agitación (225 rpm) a 37°C por 4 horas.
8. Se espatularon 100 μ l de cada dilución. En placas de agar LB con 50 μ g/ml de kanamicina, 7 μ g/ml de gentamicina, 10 μ g/ml de tetraciclina, 200 μ g/ml de X-gal, 200 μ g/ml de IPTG.
9. Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas.

Las clonas se seleccionaron por color y por PCR para determinar su correcta transposición. Las clonas correctamente transpuestas se seleccionan utilizando el iniciador anterior del inserto y el iniciador reverso de M13.

Las clonas seleccionadas son sembradas en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, en agitación, a 37°C por 12 horas. Se realizó la técnica de Mini preparación para obtener el ADN del bacmido.

Para la obtención del ADN de los bacmidos recombinantes se realizó la técnica de mini preparación.

6.5.2 Aislamiento viral.

Se obtuvo una muestra de encéfalo positiva a CDV. La muestra pertenecía a un cachorro 2 meses no vacunado, el cual presentaba signología respiratoria. El diagnóstico se realizó por PCR punto final en sangre, amplificando un fragmento de 430 pb del gen P.

Seis días posteriores al diagnóstico el cachorro comenzó la presentación nerviosa de la enfermedad (tremores, ataxia, convulsiones). Se realizó la eutanasia 3 días posteriores a la signología. Se realizó la confirmación del diagnóstico por PCR-Tiempo real a partir de muestras de encéfalo y cerebelo.

Se preparó el inóculo de acuerdo con el protocolo utilizado por (Del Castillo & Gómez, 2006):

- Maceración y suspensión al 10% en PBS estéril
- Centrifugación a 1280 g/10'
- Antibiótico de amplio espectro contra contaminantes bacterianos.

6.5.2.1 Cultivo celular.

Se cultivaron las líneas celulares MDCK (Madin Darby Canine Kidney) y Vero (Células Epiteliales de Riñón de Mono verde) con Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomicina).

Para aislamiento se llevó a cabo el protocolo de incubaciones largas indicado por (Lednicky, 2004) al momento de la infección el monoestrato en el cultivo celular se encontraba en un 80% de confluencia; se eliminó el sobrenadante, se procedió a agregar el inóculo y se mantuvo en agitación durante 1 hora, pasado este tiempo se agregó MEM sin suero fetal bovino y se incubó hasta observar el efecto citopático (ECP), que se puede manifestarse por la presencia de sincitios y lisis celular. Como testigo negativo se mantiene un cultivo sin infectar incubado bajo las mismas condiciones que el anterior.

Como testigo positivo se realizó la replicación de las cepas vacunales Lederle, Onderstepoort y la cepa Americana tipo 2/ A75 bajo las mismas condiciones. La titulación viral se realizó por las técnicas de Reed-Müench y qPCR.

6.5.2.1.1 Titulación viral en cultivo celular

Este método es aplicable a todos los virus que inducen un efecto citopático (ECP). El protocolo que se utilizó se basa en la infección de monocapas celulares sembradas 24 horas antes de la infección:

1. En una placa de 96 pozos se sembraron 1×10^5 células/pozo.
2. Se prepararon diluciones décuples seriadas de cada una de las cepas virales de CDV (UNAM, Onderstepoort, Lederle y A/75).
3. Se retiró el medio de cultivo y se inoculó con 25 ul de cada dilución dentro de cada pozo (por triplicado).
4. Se agregaron 100 ul de medio de mantenimiento a cada pozo, incluyendo los pozos testigo.

5. Se incubó a 37 °C.
6. Se observó el efecto citopático (ECP) durante 5 días.
7. Se fijó la placa con etanol absoluto y se tiñó con violeta de genciana.
8. Se estimó la titulación viral por el método de Reed- Muench.

6.5.2.1.2 Reed-Muench

Cálculo de la dosis infectante en cultivo celular al 50% (TCID₅₀) mediante la fórmula de Reed-Muench.

$$TCID_{50} = \text{Dilución donde ECP} > 50\% + \frac{(\% \text{ positivo arriba del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positivos arriba del } 50\%) - (\% \text{ positivos abajo del } 50\%)} \times \log_{10} 10$$

6.5.3 Suero Hiperinmune.

Se elaboró un suero hiperinmune contra la cepa Lederle del CDV. Se realizaron cuatro inmunizaciones de 200 ug de proteína total por inoculación en los días 0, 14, 28 y 35. Antes de cada inmunización se sangró (1-2ml) cada conejo . En el día 42 se sangró en blanco .

7 RESULTADOS

7.1 Amplificación de dos fragmentos del gen de la Fosfoproteína (P).

Para la identificación molecular de las muestras clínicas positivas a CDV se amplificó un fragmento de 430 pb del gen de la fosfoproteína (P) y un segundo fragmento anidado de 420 pb. Las condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos se establecieron por gradiente de temperaturas, utilizando el ARN de la vacuna NOBIVAC® PUPPY DP (figura 10 y 11).

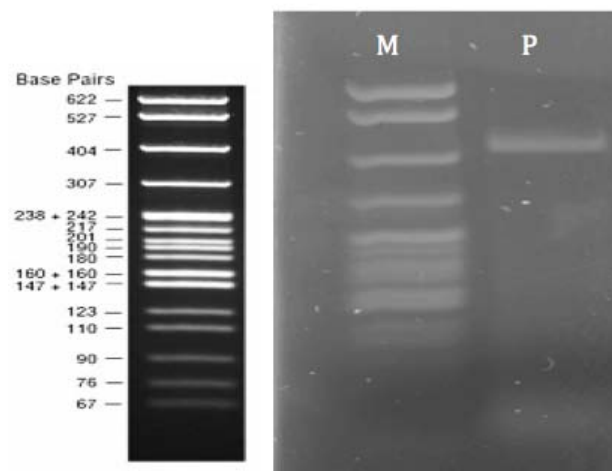


Figura 10. Amplificaciones de un fragmento de 430 pb del gen de la Fosfoproteína (P) del virus de Distemper canino. (M) Marcador de Peso pBR322/Mspl Gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidio..Amplificación del fragmento interno de 420 pb del gen de la fosfoproteína del CDV(AP).

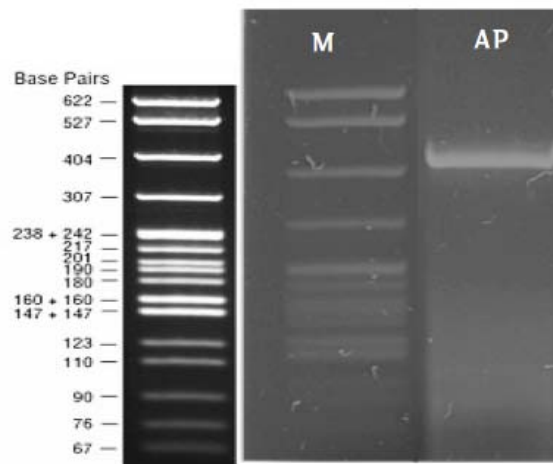


Figura 11. Amplificaciones de un fragmento anidado de 420 del gen de la Fosfoproteína (AP) del virus de Distemper canino. (M) Marcador de Peso pBR322/Mspl Gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidio.

7.2 Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR).

Se estandarizó la técnica de PCR Tiempo real cuantitativa como segunda prueba tamiz para la identificación de muestras positivas a CDV. Amplificando de un fragmento de 83 pb del gen de la Nucleocápside (N) para la elaboración de un control estándar de cuantificación (figura 12).

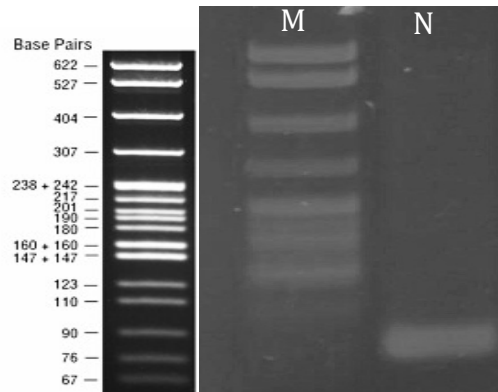


Figura 12. Amplificaciones de un fragmento de 83 pb del gen de la Nucleocápside (N) del virus de Distemper canino. (M) Marcador de Peso pBR322/Mspl. Gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidio.

7.2.1.1 Purificación del producto amplificado.

Posterior a la amplificación de los fragmentos de la PCR anidada para cada construcción se recortaron las bandas obtenidas y se purificaron con yoduro de sodio y perlas de sílica. En la figura 13 se muestra una electroforesis en donde se confirma la recuperación de los fragmentos.

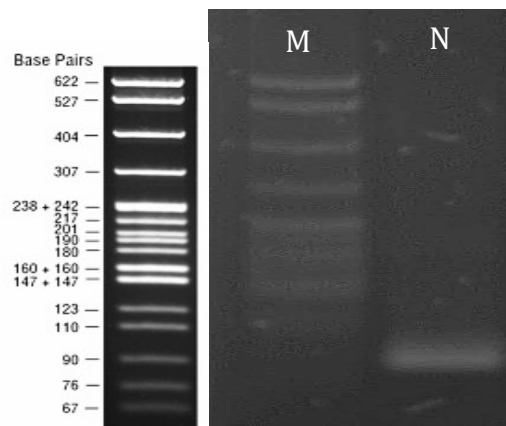


Figura 13. Recuperación de los fragmentos purificados. Geles de Agarosa al 3% teñidos con bromuro de Etidio. (N) fragmento de 83 pb del gen N de CDV. (M) Marcador de Peso pBR322/Mspl.

7.2.1.2 Selección de clonas con el inserto.

Para seleccionar las clonas que contenían el inserto, se realizó una PCR con los iniciadores M13, y se seleccionaron las clonas recombinantes (figura 14).

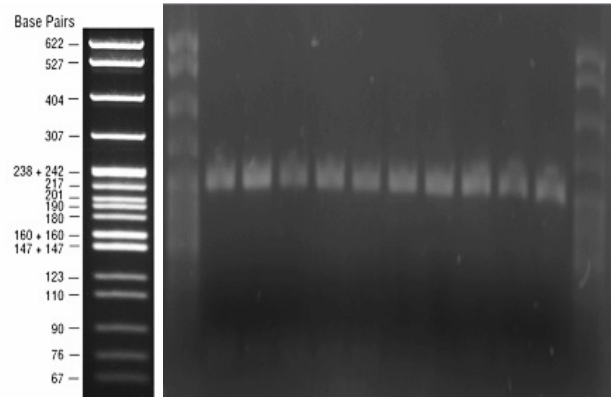


Figura 14. Selección de clonas recombinantes en el vector T. Electroforesis en geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio, en donde se muestran los productos de amplificación con los iniciadores de M13 de las clonas recombinantes candidatas, el peso esperado se calculó sumando el peso del inserto (83 pb) más el peso del polylinker utilizando los iniciadores de M13 (152 pb) dando un total de 235 pb, MP: Lambda/BsEtlI

7.2.1.3 Mini Preparación de ADN de plásmidos.

Para obtener una cantidad suficiente de ADN plasmídico, las clonas seleccionadas se crecieron en un volumen de 15 ml de medio de cultivo con ampicilina. El ADN plasmídico fue purificado mediante la técnica de mini preparación de ADN de plásmidos (MiniPrep), la figura 15 muestra el plásmido purificado.

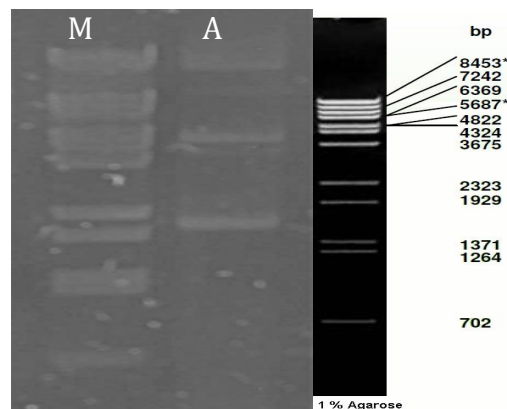


Figura 15. Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector T. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI) A= ADN plasmídico. Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio.

7.2.1.4 Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR).

7.2.1.4.1 Control Estándar de Cuantificación PCR Tiempo Real (N).

El ADN plasmídico fue cuantificado por espectrofotometría (Epoch®). Una vez que se obtuvo la concentración, se realizaron diluciones seriadas del ADN y se generó una curva estándar de cuantificación de 1 a 10^{-6} ng totales (figura 16).

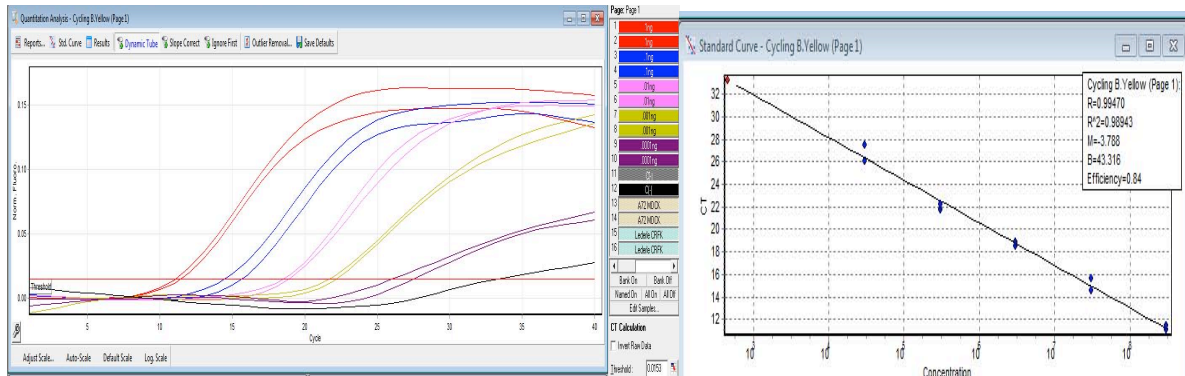


Figura 16. Curva Estándar de amplificación 1 a 10^{-6} ng totales.

7.2.2 Muestras Positivas a Distemper canino.

Se lograron amplificar y secuenciar 21 muestras clínicas positivas a CDV. En el cuadro 12 se muestra si los animales se encontraban previamente vacunados.

Número de Caso	Vacunación contra Distemper canino	Número de Caso	Vacunación contra Distemper canino
UNAM 1	V	UNAM 12	V
UNAM 2	NV	UNAM 13	NV
UNAM 3	V	UNAM 14	V
UNAM 4	V	UNAM 15	NV
UNAM 5	NV	UNAM 16	V
UNAM 6	NV	UNAM 17	V
UNAM 7	V	UNAM 18	NV
UNAM 8	V	UNAM 19	V
UNAM 9	V	UNAM 20	NV
UNAM 10	NV	UNAM 21	V
UNAM 11	V		

Cuadro 12. Relación entre vacunación y casos positivos.

7.2.3 Filogénia

7.2.4 Amplificación de un fragmento de 612 pb del gen de la hemaglutinina (H).

Se realizó la amplificación de un fragmento de 612 pb del gen H del CDV a partir de las muestras clínicas positivas a CDV (figura 17).

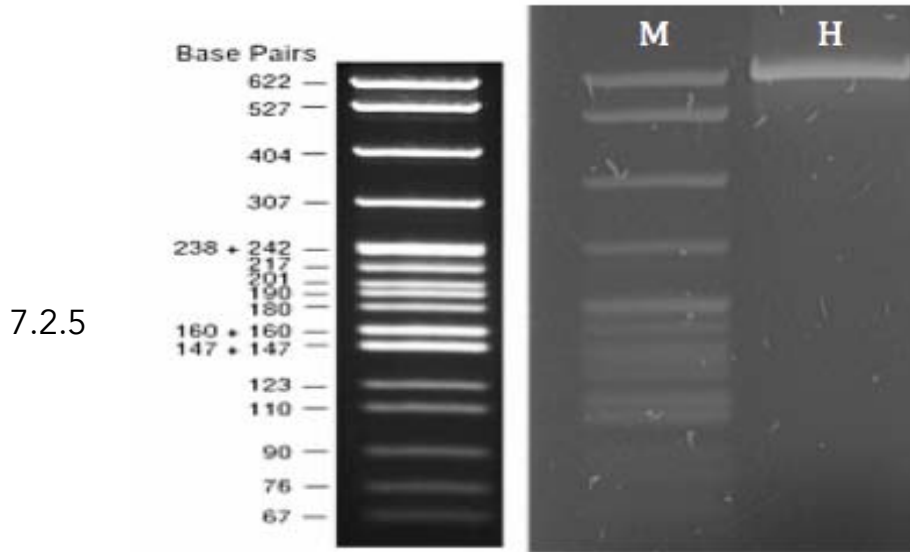


Figura 17. Amplificaciones de un fragmento del gen de la Hemaglutinina del virus de Distemper canino (H). Marcador de Peso pBR322/MspI (M). Gel de agarosa al 3% con Bromuro de Etidid

7.2.6 Secuenciación.

Las secuencias obtenidas presentaron similitud del 98 al 100% a nivel de nucleótidos y aminoácidos, tanto entre ellas como con respecto a las secuencias mexicanas reportadas en el GeneBank.

El análisis de las secuencias reveló sitios polimórficos con cambios sinónimos y no sinónimos, los cuales permiten agrupar a nuestras secuencias con las secuencias mexicanas previamente reportadas. (cuadros 13 y 14).

Secuencias idénticas a nivel de nucleótidos	Secuencias idénticas a nivel de aminoácidos	Mutaciones sinónimas
3 y 7	3 y 7	--
(6) UNAM:5,11,18,21 Edomex: 6 y 7	(10) UNAM: 4,5,16,18,21 Edomex:1,6,7,10,11	Treonina Prolina Serina UNAM 4,16: g78, c192, c249 UNAM 5,18,E6,E7: g78, c192, t249 Edomex10: t78, a192, t249 Edomex11: t78, c192, t249
UNAM: 4 y 16		
UNAM: 12 y 14	(9) UNAM:2,6,12,13,14 Edomex2, 4 y 9	Pro, Al, Pro, Ser, Pro, Pro UNAM 2,6 a21, g78, a213, g273, g288, t360 UNAM12,14: a21, g78, a213, g273, g288, a360 Edomex2: a21, g78, a213, a273, g288, a360 Edomex4: a21, g78, t213, g273, t288, t360 Edomex9: g21, g78, a213, g273, g288, t360 Cepa 19876 a21, a78, a213, g273, g288, t360
UNAM: 2 y 6		

Cuadro 13. Secuencias mexicanas idénticas a nivel de nucleótidos y aminoácidos, donde se muestran los cambios sinónimos entre ellas.

Secuencias	Cambios a nivel de nucleótidos	Cambios no sinónimos
GDL 1	a 289 g	Isoleucina/ Valina
UNAM 1	t 80 c	Isoleucina/Treonina
UNAM 8	t 128 a	Isoleucina/Asparagina
UNAM 9	g 44 a	Isoleucina/Asparagina
UNAM 10	t 14 c t 104 c	Valina/Alanina Fenilalanina/Serina
UNAM 15	t 104 c	Fenilalanina/Serina
UNAM 17	t 14 c	Valina/Alanina
UNAM 19	g 39 a a 269 t	Glicina/Ac Glutámico Lisina/Isoleucina
UNAM 20	g 39 a	Glicina/Ac Glutámico

Cuadro 14. Secuencias mexicanas no agrupadas las cuales muestran cambios no sinónimos a nivel de nucleótidos y aminoácidos.

7.2.6.1 Alineamiento de 32 Secuencias Mexicanas a nivel de Nucleótidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV.

A partir de alineamientos y la construcción de árboles filogenéticos se comparó la diversidad genética existente entre nuestras variantes y el resto de las secuencias mexicas. Se utilizó la cepa 19876, como secuencia de referencia (Pardo *et al*, 2005), el resultado del alineamiento se muestra en la figura 18.

30 Mar 2015 Alignment Results

Alignment: Global DNA alignment against reference molecule
Parameters: Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Reference molecule: Cepa 19876, Region 1 to 509
Number of sequences to align: 32
Total length of aligned sequences with gaps: 509 bps

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
UNAM 1	1	509			
UNAM 3	1	509	507	2	99
UNAM 7	1	509	507	2	99
UNAM 9	1	509	504	5	99
Cepa 19876	1	509	506	3	99
UNAM 2	1	509	507	2	99
UNAM 6	1	509	507	2	99
UNAM 12	1	509	506	3	99
UNAM 14	1	509	506	3	99
UNAM 13	1	509	506	3	99
Edomex2	1	509	504	5	99
Edomex4	1	509	504	5	99
Edomex9	1	509	504	5	99
UNAM 10	1	509	504	5	99
UNAM 17	1	509	505	4	99
UNAM 15	1	509	503	6	98
UNAM 8	1	509	503	6	98
GDL 1	1	509	503	6	98
UNAM 4	1	509	506	3	99
UNAM 16	1	509	506	3	99
UNAM 5	1	509	505	4	99
UNAM 11	1	509	505	4	99
UNAM 18	1	509	505	4	99
UNAM 21	1	509	505	4	99
Edomex6	1	509	505	4	99
Edomex7	1	509	505	4	99
Edomex10	1	509	503	6	98
Edomex1	1	509	503	6	98
Edomex11	1	509	504	5	99
UNAM 19	1	509	503	6	98
UNAM 20	1	509	504	5	99
Edomex8	1	509	504	5	99

Figura 18. Resultado del alineamiento de secuencias mexicanas a nivel de nucleótidos. Secuenciencias Lab. Genética: UNAM 1-21. Secuencias Mexicanas (Martinez S. *et al* 2010) 1,2,4,6,7,8,9,10,11 y GDL1. Cepa 19876 (Pardo *et al*. 2005). Las secuencias enmarcadas representan las secuencias idénticas entre sí.

7.2.6.2 Dendrograma a nivel de Nucleótidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV de las secuencias mexicanas (figura 19).

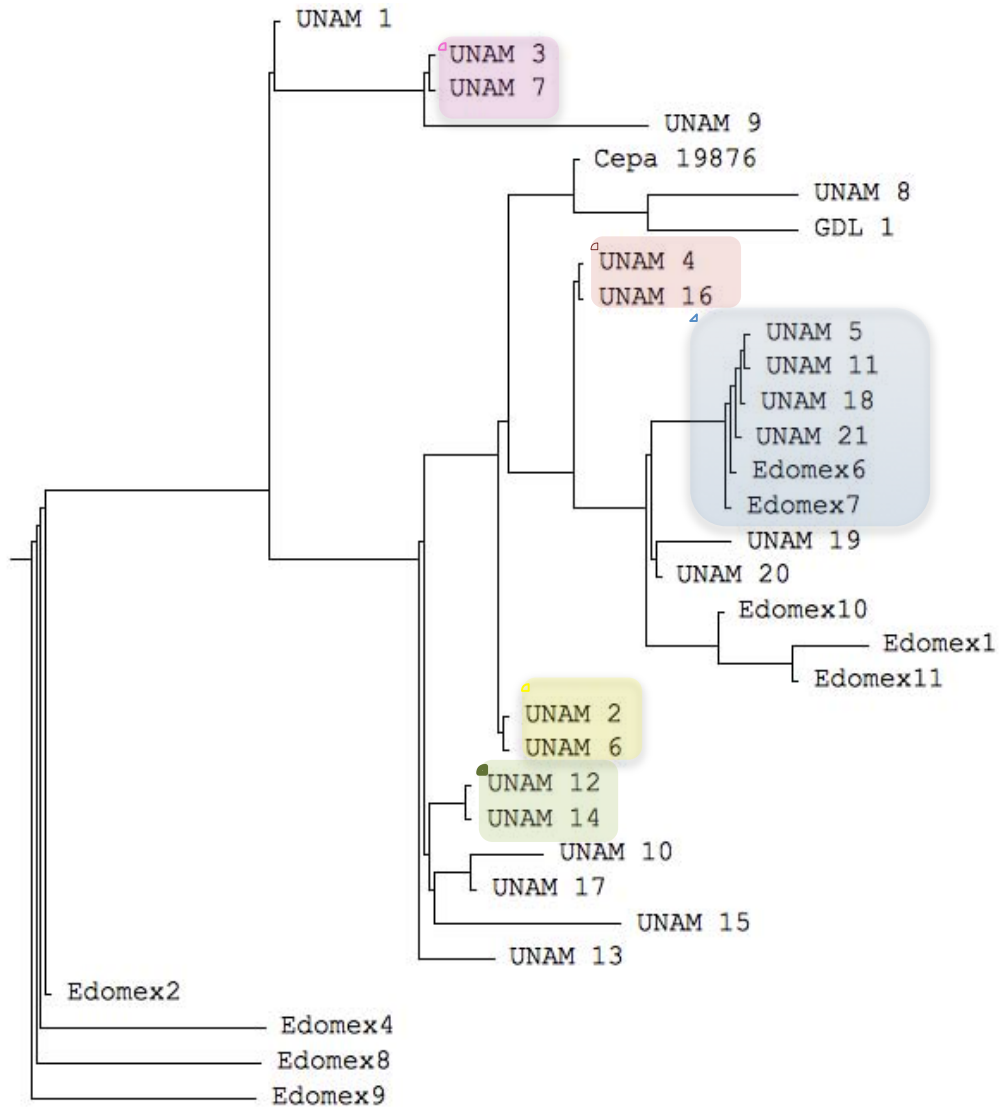


Figura 19. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN alignment. Secuenciencias Lab. Genética: UNAM 1-21. Secuencias Mexicanas : 1,2,4,6,7,8,9,10,11 y GDL1. Ceba 19876 (Pardo et al. 2005). Las secuencias enmarcadas representan las secuencias idénticas entre sí.

7.2.6.3 Alineamiento de 32 secuencias mexicanas a nivel de Aminoácidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV (figura 20).

```

30 Mar 2015                               Alignment Results

Alignment:  Global Protein alignment against reference molecule
Parameters: Scoring matrix:  BLOSUM 62

Reference molecule:  Cepa 19876, Region 1 to 509
Number of sequences to align:  32
Total length of aligned sequences with gaps:  169 aas

```

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
UNAM 1	1	509	168	1	99
UNAM 3	1	509	167	2	98
UNAM 7	1	509	167	2	98
UNAM 9	1	509	165	4	97
Cepa 19876	1	509	169	0	100
UNAM 2	1	509	169	0	100
UNAM 6	1	509	169	0	100
UNAM 12	1	509	169	0	100
UNAM 14	1	509	169	0	100
UNAM 13	1	509	169	0	100
Edomex2	1	509	169	0	100
Edomex4	1	509	169	0	100
Edomex9	1	509	169	0	100
UNAM 10	1	509	167	2	98
UNAM 17	1	509	168	1	99
UNAM 15	1	509	167	2	98
UNAM 8	1	509	168	1	99
GDL 1	1	509	168	1	99
UNAM 4	1	509	168	1	99
UNAM 16	1	509	168	1	99
UNAM 5	1	509	168	1	99
UNAM 11	1	509	168	1	99
UNAM 18	1	509	168	1	99
UNAM 21	1	509	168	1	99
Edomex6	1	509	168	1	99
Edomex7	1	509	168	1	99
Edomex10	1	509	168	1	99
Edomex1	1	509	168	1	99
Edomex11	1	509	168	1	99
UNAM 19	1	509	166	3	98
UNAM 20	1	509	167	2	98
Edomex8	1	509	168	1	99

Figura 20. Resultado del alineamiento de secuencias mexicanas a nivel de aminoácidos. Secuencias Lab. Genética: UNAM 1-21. Secuencias Mexicanas (Martinez S. et al 2010) 1,2,4,6,7,8,9,10,11 y GDL1. Cepa 19876 (Pardo et al. 2005). Las secuencias enmarcadas representan las secuencias idénticas entre sí.

En la figura 21 se muestra el alineamiento de 32 secuencias mexicanas a nivel de aminoácidos.

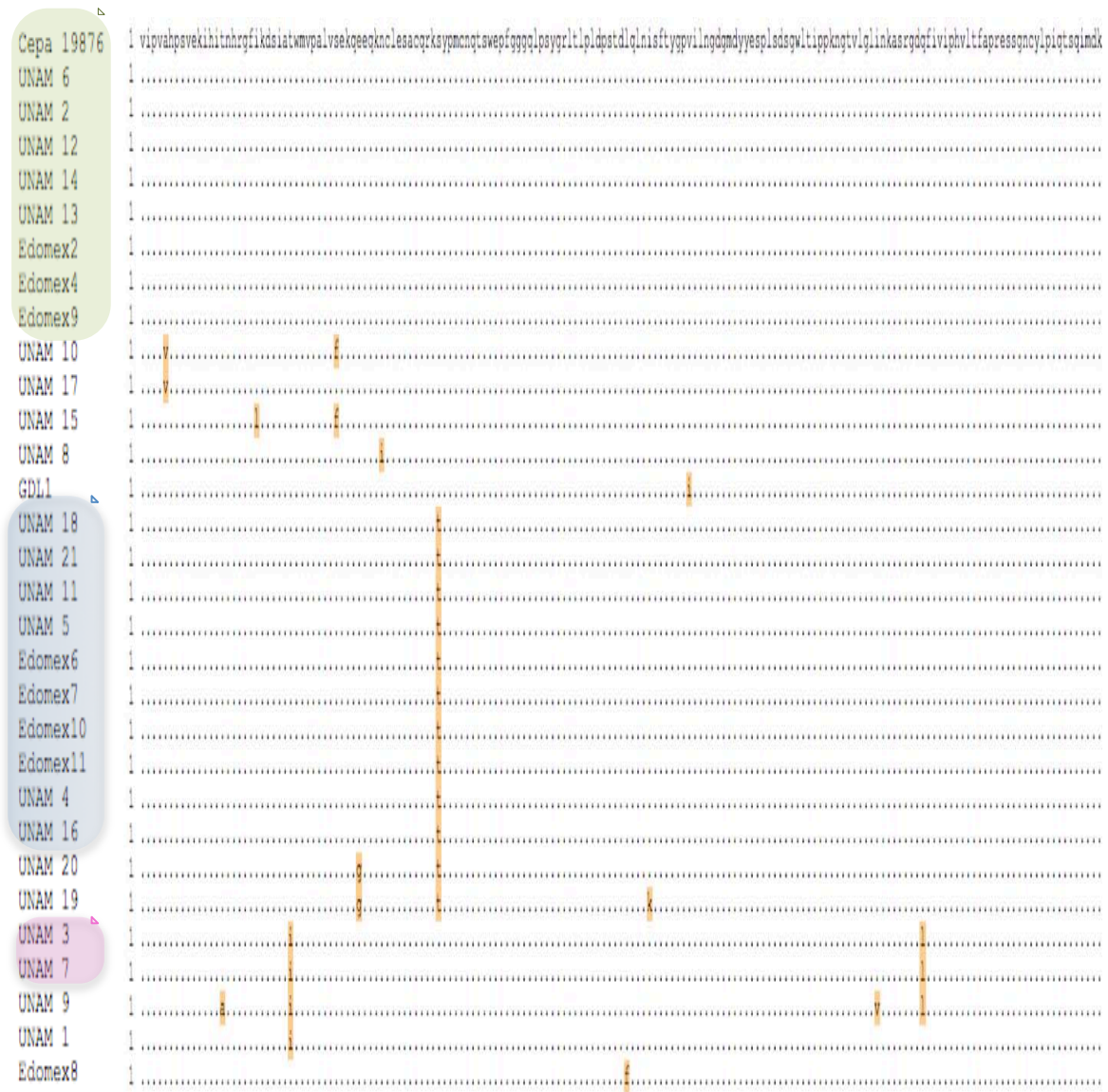


Figura 21. Alineamiento de aminoácidos de secuencias mexicanas. Secuencias Lab. Genética: UNAM 1-21. Secuencias Mexicanas (Martinez S. et al 2010) 1,2,4,6,7,8,9,10,11 y GDL1. Cepa 19876 (Pardo et al. 2005). Las secuencias enmarcadas representan las secuencias idénticas entre sí.

7.2.6.4 Dendrograma a nivel de Aminoácidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV de las secuencias mexicanas (figura 22).

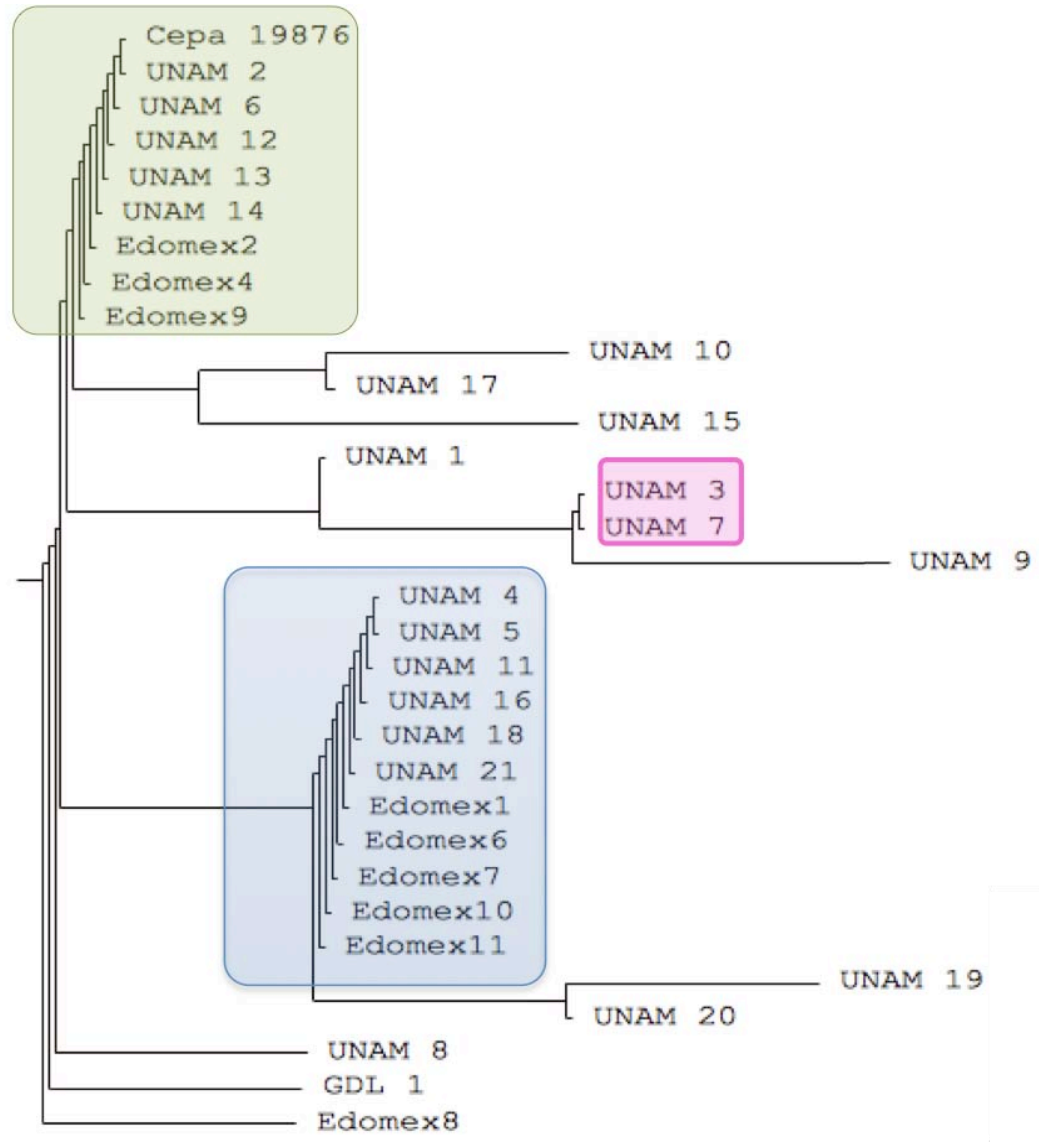


Figura 22. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein alignment. Secuencias Lab. Genética: UNAM 1-21. Secuencias Mexicanas (Martinez S. et al 2010) 1,2,4,6,7,8,9,10,11 y GDL1. Cepa 19876 (Pardo et al. 2005). Las secuencias enmarcadas representan las secuencias idénticas entre sí.

7.2.6.6 Alineamiento de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV a nivel mundial.

El alineamiento de las secuencias a nivel mundial muestra que las cepas vacunales pertenecientes al clado Americano 1 son las más distantes filogenéticamente con respecto a cualquier otra secuencia descrita.

En el caso de las cepas mexicanas, tan solo en el fragmento secuenciado, existe una diferencia desde 41 a 47 nucleótidos y de 14 a 19 aminoácidos con respecto a la cepas vacunales Ondersteepport y Lederle, la cepas vacunales más utilizada a nivel mundial (Figura 23 y 24).

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match	Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
Cepa 19876	1	509				África 1	1	509	479	30	94
UNAM 1	1	509	506	3	99	África 2	1	509	478	31	93
UNAM 2	1	509	508	1	99	África 3	1	509	480	29	94
UNAM 3	1	509	504	5	99	Am2 A75	1	509	495	14	97
UNAM 4	1	509	507	2	99	Am2.2	1	509	493	16	96
UNAM 5	1	509	506	3	99	Am2.3	1	509	489	20	96
UNAM 6	1	509	508	1	99	Am2.4	1	509	486	23	95
UNAM 7	1	509	504	5	99	Am2.5	1	509	488	21	95
UNAM 8	1	509	506	3	99	Argentina1	1	509	489	20	96
UNAM 9	1	509	501	8	98	Argentina2	1	509	487	22	95
UNAM 10	1	509	505	4	99	Argentina3	1	509	488	21	95
UNAM 11	1	509	506	3	99	Argentina4	1	509	487	22	95
UNAM 12	1	509	507	2	99	Argentina5	1	509	487	22	95
UNAM 13	1	509	507	2	99	Ártico1	1	509	478	31	93
UNAM 14	1	509	507	2	99	Ártico2	1	509	475	34	93
UNAM 15	1	509	504	5	99	Ártico3	1	509	475	34	93
UNAM 16	1	509	507	2	99	Asia1	1	509	473	36	92
UNAM 17	1	509	506	3	99	Asia1 .2	1	509	475	34	93
UNAM 18	1	509	506	3	99	Asia1 .3	1	509	475	34	93
UNAM 19	1	509	504	5	99	Asia2	1	509	486	23	95
UNAM 20	1	509	505	4	99	Asia2 .2	1	509	484	25	95
UNAM 21	1	509	506	3	99	Asia2 .3	1	509	485	24	95
GDL 1	1	509	506	3	99	Asia2 .4	1	509	483	26	94
Edomex1	1	509	505	4	99	Asia2 .5	1	509	478	31	93
Edomex2	1	509	505	4	99	Brasil1	1	509	487	22	95
Edomex4	1	509	505	4	99	Brasil2	1	509	483	26	94
Edomex6	1	509	506	3	99	Brasil3	1	509	484	25	95
Edomex7	1	509	506	3	99	Brasil4	1	509	485	24	95
Edomex8	1	509	505	4	99	Brasil5	1	509	484	25	95
Edomex9	1	509	505	4	99	Europa1	1	509	491	18	96
Edomex10	1	509	505	4	99	Europa2	1	509	490	19	96
Edomex11	1	509	506	3	99	Europa3	1	509	487	22	95
Aml CDV3	1	508	466	43	91	Europa4	1	509	491	18	96
Aml Convac	1	509	470	39	92	Europa5	1	509	485	24	95
Aml Lederle	1	509	468	41	91	Fauna Europea1	1	509	494	15	97
Aml Ondersteepor	1	509	462	47	90	Fauna Europea2	1	509	485	24	95
Aml SnyderHill	1	509	468	41	91	Fauna Europea3	1	509	490	19	96
Aml Rockborn	1	509	496	13	97						

Figura 23. Resultado de alineamiento de secuencias mundiales a nivel de ADN.

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match	Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
Cepa 19876	1	509				África 1	1	509	162	7	95
UNAM 1	1	509	168	1	99	África 2	1	509	161	8	95
UNAM 2	1	509	169	0	100	África 3	1	509	159	10	94
UNAM 3	1	509	167	2	98	Am2 A75	1	509	166	3	98
UNAM 4	1	509	168	1	99	Am2.2	1	509	165	4	97
UNAM 5	1	509	168	1	99	Am2.3	1	509	163	6	96
UNAM 6	1	509	169	0	100	Am2.4	1	509	162	7	95
UNAM 7	1	509	167	2	98	Am2.5	1	509	162	7	95
UNAM 8	1	509	168	1	99	Argentina1	1	509	160	9	94
UNAM 9	1	509	165	4	97	Argentina2	1	509	162	7	95
UNAM 10	1	509	167	2	98	Argentina3	1	509	162	7	95
UNAM 11	1	509	168	1	99	Argentina4	1	509	162	7	95
UNAM 12	1	509	169	0	100	Argentina5	1	509	161	8	95
UNAM 13	1	509	169	0	100	Ártico1	1	509	159	10	94
UNAM 14	1	509	169	0	100	Ártico2	1	509	155	14	91
UNAM 15	1	509	167	2	98	Ártico3	1	509	156	13	92
UNAM 16	1	509	168	1	99	Asial	1	509	157	12	92
UNAM 17	1	509	168	1	99	Asial .2	1	509	157	12	92
UNAM 18	1	509	168	1	99	Asial .3	1	509	157	12	92
UNAM 19	1	509	166	3	98	Asia2	1	509	161	8	95
UNAM 20	1	509	167	2	98	Asia2 .2	1	509	160	9	94
UNAM 21	1	509	168	1	99	Asia2 .3	1	509	162	7	95
GDL 1	1	509	168	1	99	Asia2 .4	1	509	161	8	95
Edomex1	1	509	168	1	99	Asis 2.5	1	509	160	9	94
Edomex2	1	509	169	0	100	Brasil1	1	509	163	6	96
Edomex4	1	509	169	0	100	Brasil2	1	509	163	6	96
Edomex6	1	509	168	1	99	Brasil3	1	509	163	6	96
Edomex7	1	509	168	1	99	Brasil4	1	509	164	5	97
Edomex8	1	509	168	1	99	Brasil5	1	509	162	7	95
Edomex9	1	509	169	0	100	Europa1	1	509	163	6	96
Edomex10	1	509	168	1	99	Europa2	1	509	163	6	96
Edomex11	1	509	168	1	99	Europa3	1	509	163	6	96
Aml CDV3	1	508	154	15	91	Europa4	1	509	164	5	97
Aml Convac	1	509	154	15	91	Europa5	1	509	160	9	94
Aml Lederle	1	509	155	14	91	Fauna Europea 1	509	162	7	95	
Aml Ondersteepor	1	509	150	19	88	Fauna Europea 1	509	159	10	94	
Aml SnyderHill	1	509	155	14	91	Fauna Europea 1	509	159	10	94	
Aml Rockborn	1	509	165	4	97						

Figura 24. Resultado de alineamiento de secuencias mundiales a nivel de aminoácidos.

Dendrograma a nivel de Nucleótidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV, secuencias mundiales (figura 25).

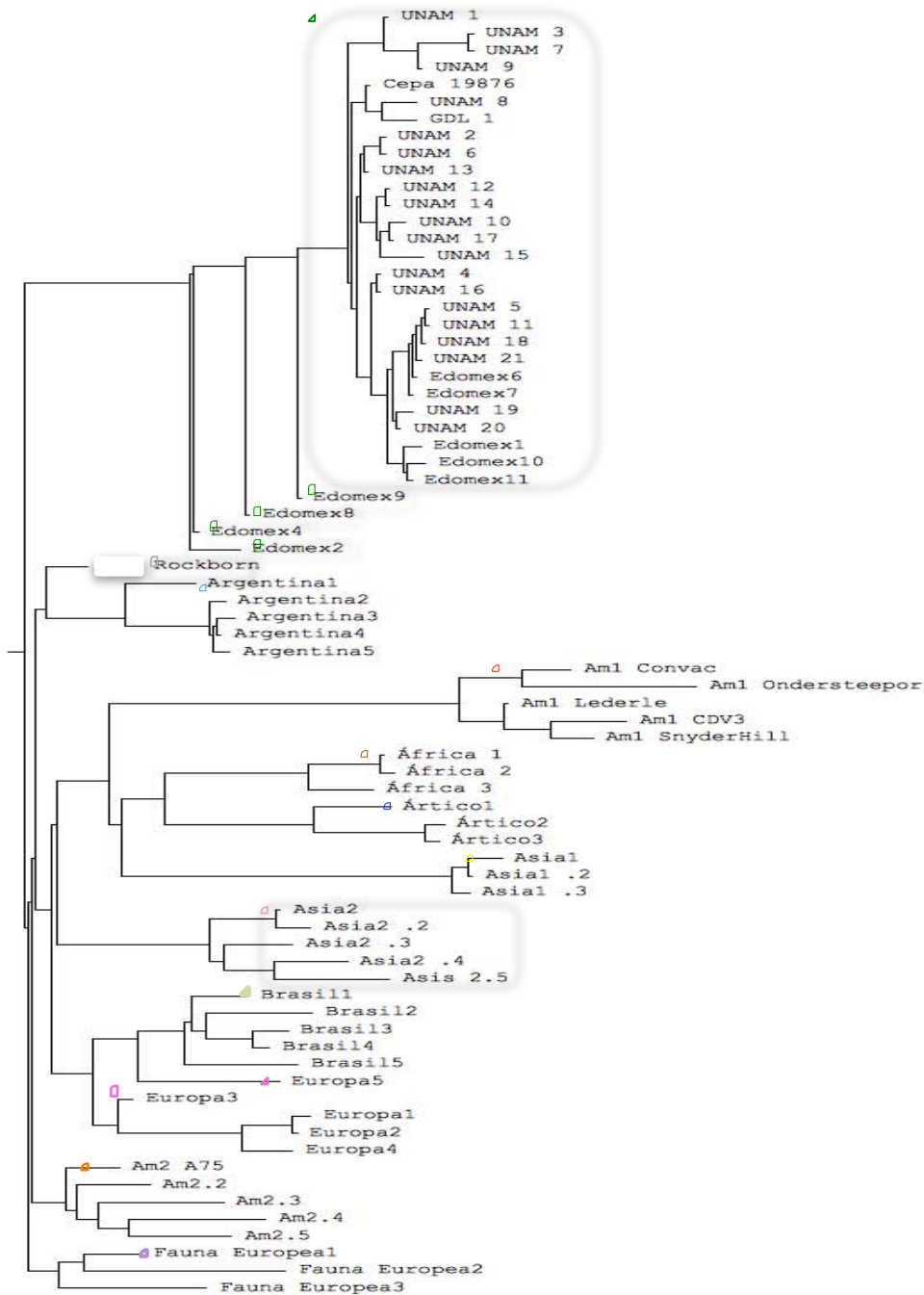


Figura 25. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN aligment. Genotipo: Mexicano (verde), África(café), América 1(rojo), America2(anaranjado), Asia1(amarillo), Asia2(rosa pálido), Brasil(verde limón), Argentina(celeste), Ártico(azul marino), Europa(rosa), Fauna Europea(morado), Rockborn(gris).

7.2.6.7 Dendrograma a nivel de Aminoácidos de un fragmento de 509 pb del gen H de CDV, secuencias mundiales (figura 26).

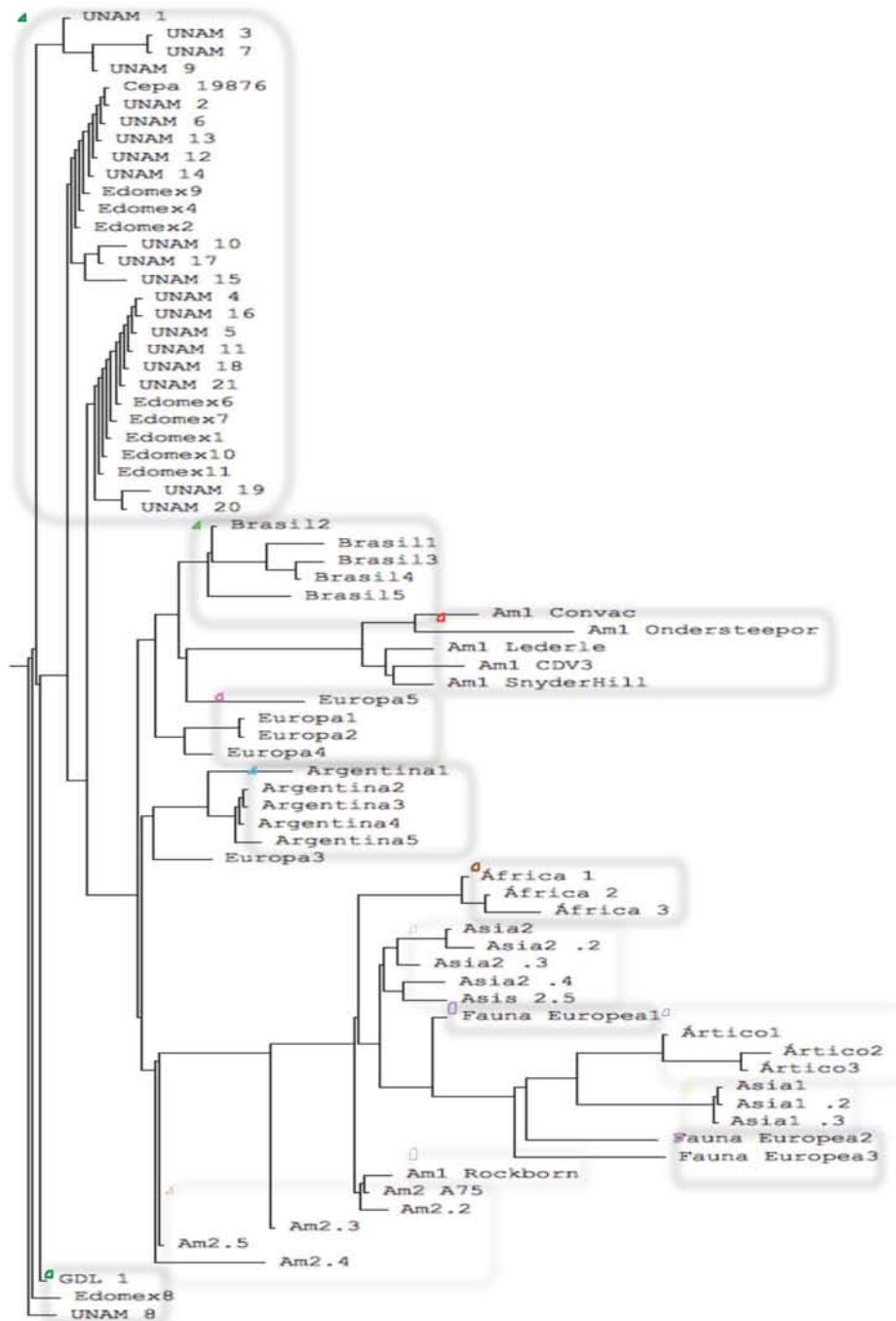


Figura 26. Dendrograma construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein alignment. Genotipo: Mexicano (verde), América 1(rojo), America2(anaranjado), Brasil(azul marino), Argentina(celeste), África(café). Asia1(amarillo), Asia2(verde claro), Europa(rosa), Fauna Europea(morado).

7.3 Estrategia de amplificación del gen completo H de CDV a partir de 3 fragmentos.

En la figura 27 se muestra la amplificación de 3 fragmentos parciales del gen H de CDV, como parte de la estrategia para la amplificación del gen completo H.

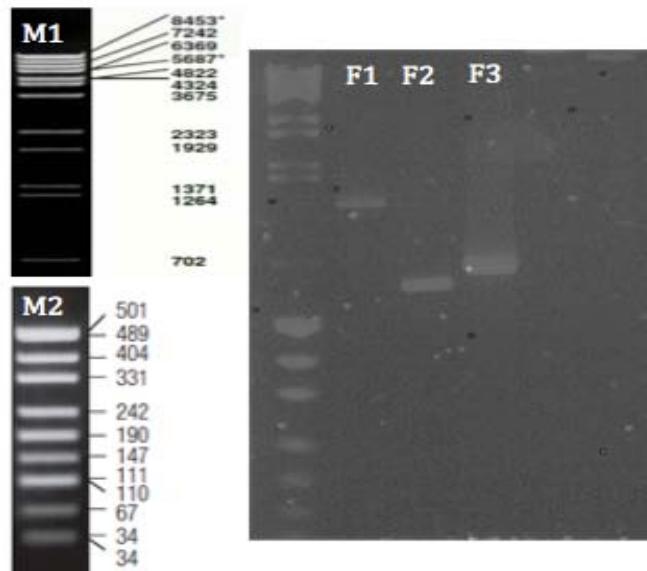


Figura 27. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV. F1: Iniciador del fragmento 1 (1033 pb), F2 Iniciador fragmento 2 de (612 pb), F3: Iniciador del fragmento 3 (714 pb). M1: Marcador de alto peso molecular Lambda/BsEtlI, M2: Marcador de bajo peso molecular pUC / MspI, gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio..

En la figura 28 se observa la unión de los fragmentos f1-2 (1559 pb) y f2-3 (974 pb).

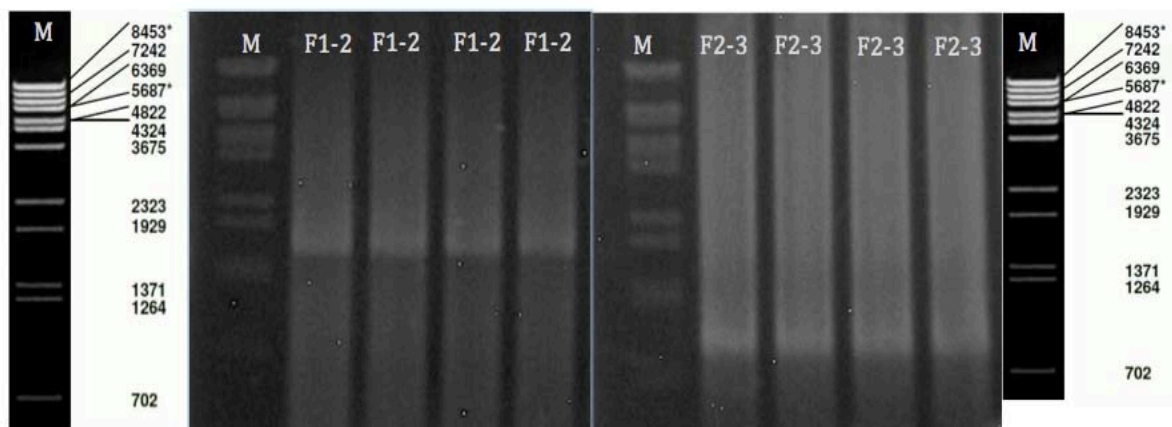


Figura 28. Fragmentos para el ensamblado y amplificación del gen H de CDV. **F1-2:** Unión del fragmento 1 y 2 (1559 pb). **F2-F3** Unión fragmento 2 y 3 (974 pb). M: Marcador de alto peso molecular Lambda/BsEtlI, gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio.

7.4 Amplificación del gen de la Hemaglutinina del CDV de 1824 pb (figura 29).

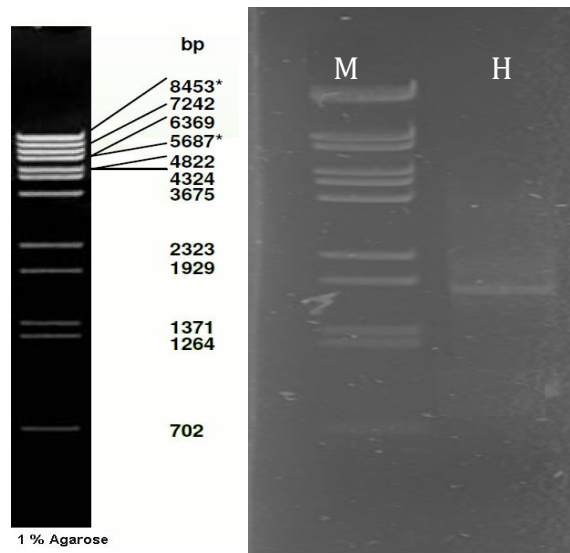


Figura 29 (H) Gen de la Hemaglutinina del Distemper canino 1824pb, (M) marcador de alto peso molecular Lambda/BsEII, gel de agarosa al 1% con Bromuro de Etidio.

Alineamiento del Gen H de CDV a nivel de nucleótidos (figura 30).

Reference molecule: México, Region 1 to 1824
 Number of sequences to align: 15
 Total length of aligned sequences with gaps: 1824 bps

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
México	1	1824			
Cepa 19876	1	1824	1811	13	99
A75 Am2	1	1824	1740	84	95
Lederle Am1	1	1824	1663	161	91
Ondersteeport Am	1	1815	1643	181	90
SnyderHill Am1	1	1824	1664	160	91
Rockborn	1	1824	1749	75	95
CDV3 Am1	1	1824	1662	162	91
Concav Am1	1	1824	1660	164	91
Áfrical1	1	1824	1697	127	93
Ártico	1	1824	1703	121	93
Asia1	1	1824	1690	134	92
Asia2	1	1824	1710	114	93
Europa	1	1824	1731	93	94
FaunaEuropea	1	1824	1741	83	95

Figura 30. Resultado de alineamiento del gH a nivel de ADN.

7.4.1.1 Dendrograma a nivel de Nucleótidos del gen completo H de CDV (figura 31).

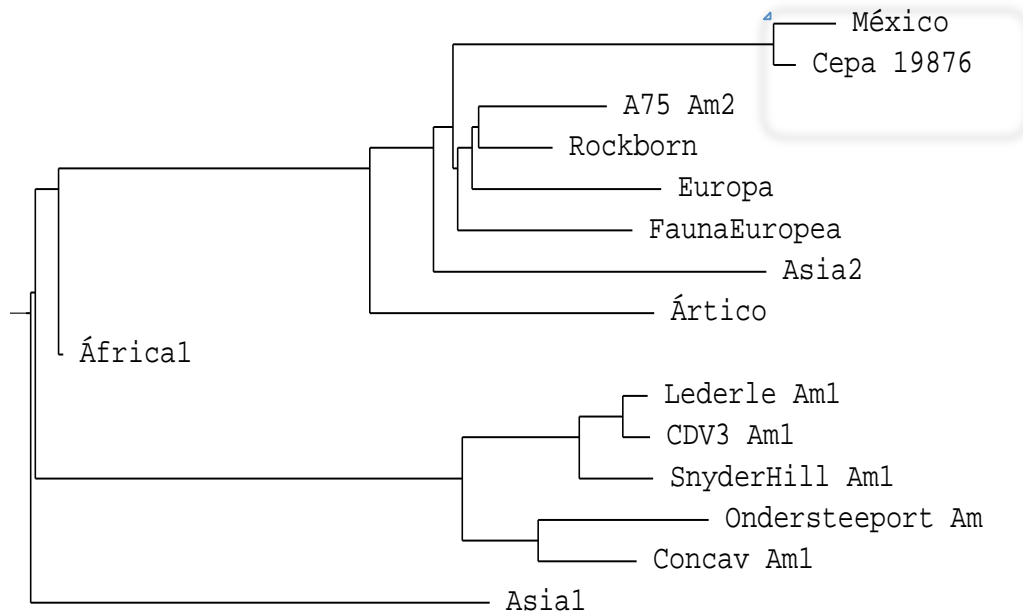


Figura 31. Dendrograma del gen H construido por el método de distancia utilizando el algoritmo neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway ADN alignment

Alineamiento del Gen H de CDV a nivel de aminoácidos (figura 32).

19 Nov 2014 Alignment Results

Alignment: Global Protein alignment against reference molecule
Parameters: Scoring matrix: BLOSUM 62

Reference molecule: México, Region 1 to 1824
Number of sequences to align: 15
Total length of aligned sequences with gaps: 608 aas

Sequence	Start	End	Match	NonMatch	%Match
México	1	1824			
Cepa 19876	1	1824	603	5	99
A75 Am2	1	1824	584	24	96
Rockborn	1	1824	582	26	95
Europa	1	1824	581	27	95
FaunaEuropea	1	1824	583	25	95
Asia2	1	1824	572	36	94
Ártico	1	1824	572	36	94
África1	1	1824	576	32	94
Lederle Am1	1	1824	559	49	91
CDV3 Am1	1	1824	558	50	91
SnyderHill Am1	1	1824	559	49	91
Ondersteeport Am	1	1815	545	63	89
Concav Am1	1	1824	551	57	90
Asia1	1	1824	569	39	93

Figura 32. Resultado de alineamiento del gH a nivel de ADN.

Dendrograma del gen H de Distemper canino a nivel de aminoácidos (figura 33).

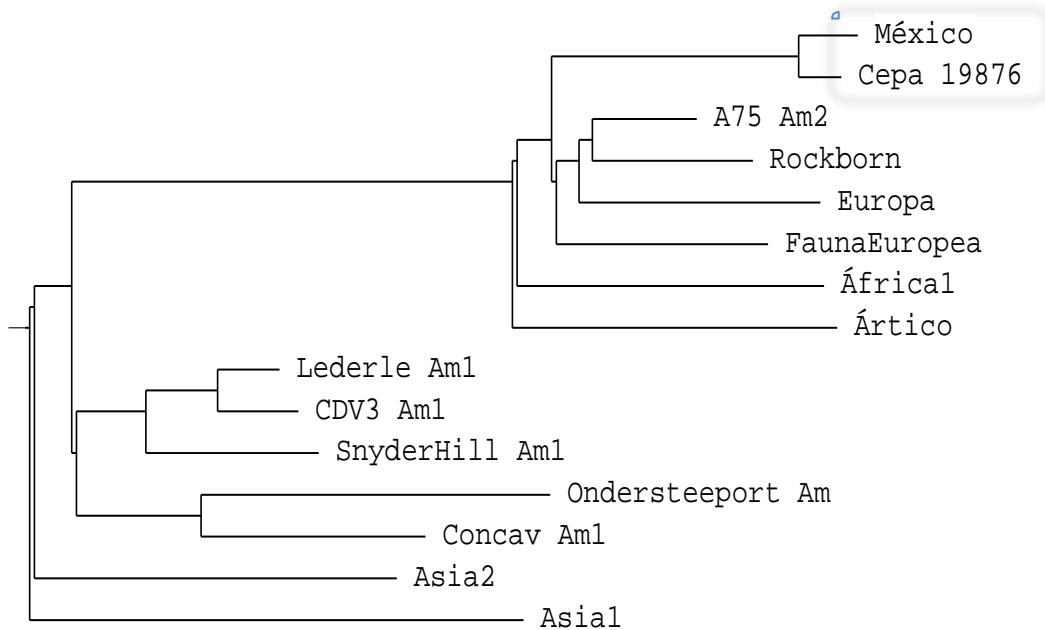


Figura 33. Dendrograma del gen H de CDV construido por el método de Distancia utilizando el algoritmo Neighbor-joining. Software Clone Manager. Multiway Protein Aligment. Secuencias 15.

7.4.1.2 Clonación del gen completo H.

7.4.1.2.1 Clonación en el Vector pTZ57R/T.

Los productos de amplificación de las tres construcciones purificadas se clonaron en el vector pTZ57R/T. Esta clonación se realizó con el fin de garantizar los sitios cohesivos para la enzima BamHI, necesarios para subclonarlos en el vector pFastBac.

7.4.1.2.2 Selección de clonas con el inserto.

Las clonas recombinantes fueron seleccionados por amplificación con los iniciadores específicos del gen H (figura 34).

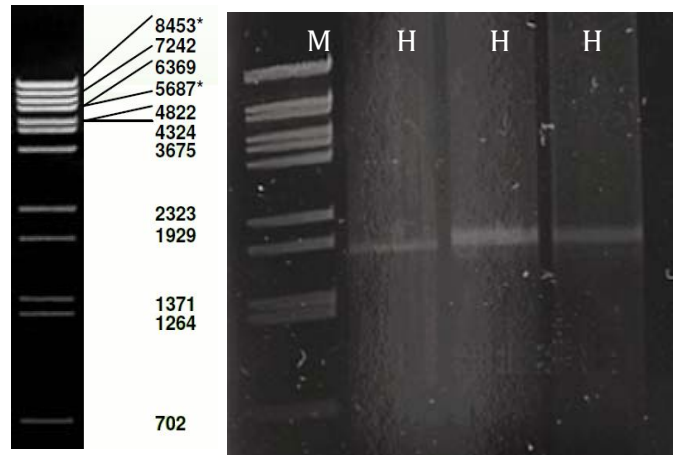


Figura 34. Selección de clonas recombinantes en el vector T. Electroforesis en geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio, en donde se muestran las clonas recombinantes e amplificadas con los iniciadores específicos para el gen H (H), marcado de peso Lambda/BsEII (M).

7.4.1.2.3 Mini Preparación de ADN de plásmidos

Para obtener suficientes cantidades de ADN de los plásmidos y obtener suficiente producto de digestión para clonar en el siguiente vector, las clonas seleccionadas se crecieron en un volumen de 15 ml de medio de cultivo con ampicilina. El ADN plasmídico fue purificado mediante la técnica de mini preparación de ADN de plásmidos (MiniPrep), la figura 35 muestra los plásmidos ya purificados.

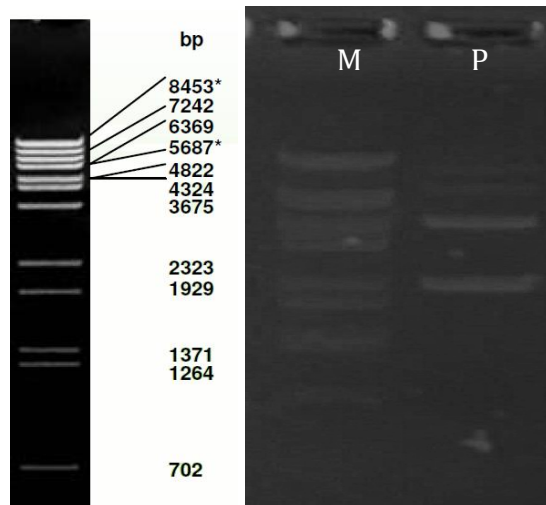


Figura 35. a) Plásmidos purificado de la clona seleccionada en vector T (P), (M) Marcador de peso Lambda/BsEII. Gel de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio.

El plásmido obtenido, se utilizó para transformar células competentes *E. coli* cepa DH5 α

7.4.1.2.4 Digestión con enzima BamHI

Una vez purificados los plásmidos, estos fueron digeridos con la enzima BamHI para liberar los insertos clonados con los extremos cohesivos. En la figura 36 se muestran los plásmidos digeridos con la enzima BamHI.

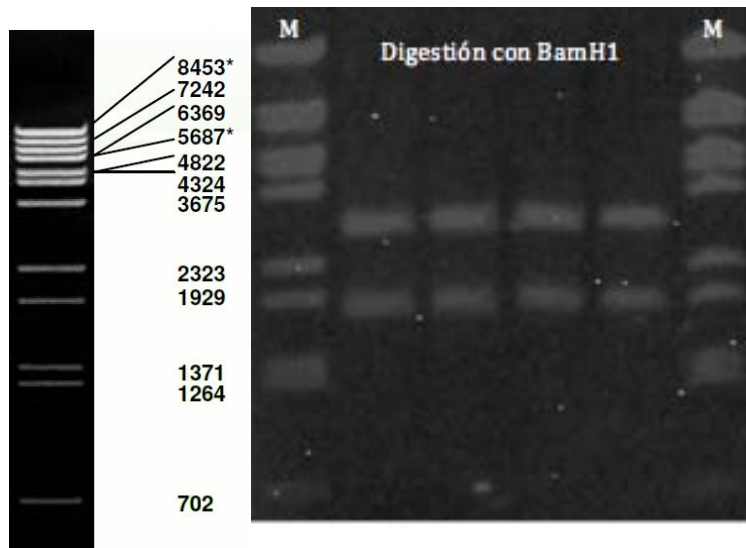


Figura 36. Digestión de los plásmidos purificados con la enzima BamHI. Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio. Se muestran la digestión del gen H clonado en un plásmido pTZ. Se muestra el peso del vector pTZ (3kb) y el peso del gen H (1.8 kb). M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

7.4.1.3 Clonación en Vector pFHBTa

7.4.1.4 Posteriormente a la liberación de los insertos, estos fueron purificados del gel y clonados en el vector de movilización pFHBTa, el cual contiene parte del genoma de Baculovirus.

7.4.1.5 Clonación en Vector pFHBTa

Ya obtenidos los plásmidos se utilizaron para transformar células competentes cepa DH5 α de *E. coli*.

Para seleccionar las clonas recombinantes y correctamente orientadas se realizó una PCR con el iniciador delantero del inserto y el iniciador reverso del vector. Las clonas recombinantes y correctamente orientadas se muestran en la figura 37.

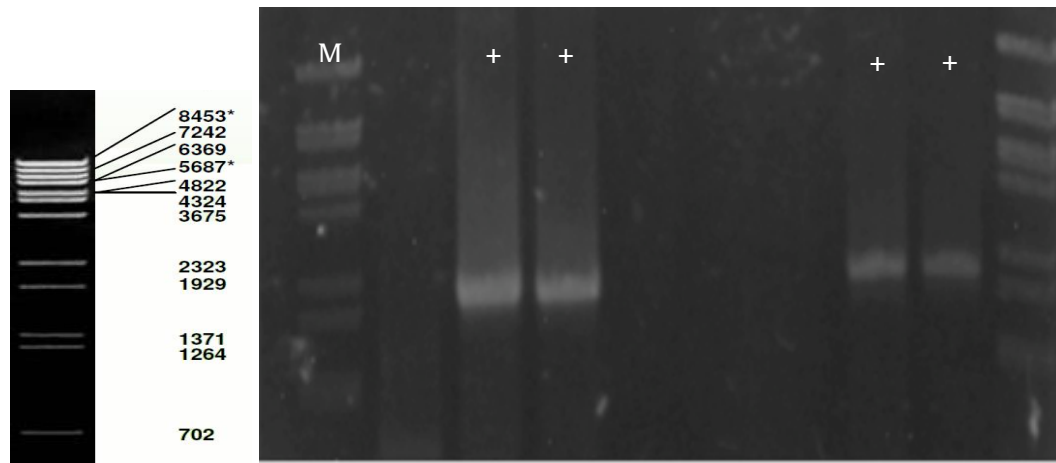


Figura 37. Selección de clonas con el inserto en el vector pFast-Bac. Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI). Las clonas seleccionadas se muestran con una cruz blanca.

7.4.1.5.1 Mini Preparación de ADN de plásmidos

Las clonas recombinantes seleccionadas, se propagaron en un volumen de 15ml de medio de cultivo, y se purificó el ADN plasmídico por la técnica de MiniPrep

figura 38.

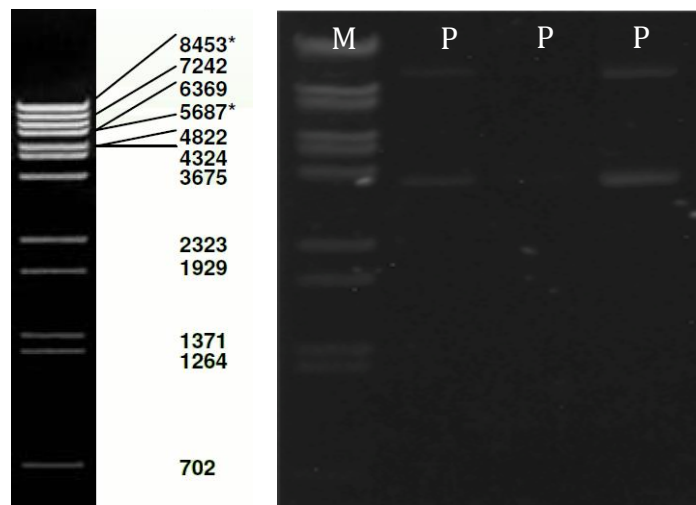


Figura 38. Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector pFHTa Gel de Agarosa al 1% teñido con bromuro de Etidio. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI).

7.4.1.5.2 Transposición en células competentes DH10BAC

Una vez obtenido el ADN plasmídico de las clonas recombinantes en pFAST-BAC se transformaron células competentes cepa DH10BAC de *E.coli*, con el fin de insertar mediante transposición en el genoma del baculovirus.

7.4.1.5.3 Selección de Clonas Correctamente Transpuestas

Para la selección de la clona recombinante y correctamente transpuesta se realizó una PCR con el iniciador delantero del inserto y el iniciador reverso de M13. En la figura 39 se muestra la clona seleccionada.

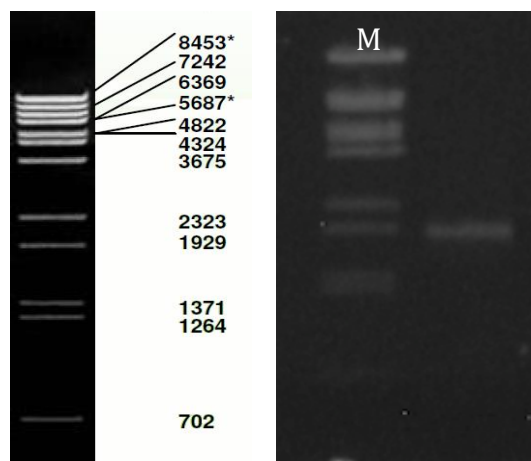


Figura 39. Selección del b́acmido recombinante correctamente transpuesto. Gel de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

7.4.1.5.4

7.5 Estrategia de Aislamiento a partir de Tejido

Se logró el aislamiento de un virus CDV circulante nombrado cepa UNAM, el cual fue caracterizado molecularmente e identificado como la secuencia UNAM 18, este virus local pertenece al clado mexicano más representativo.

El virus CDV UNAM se replicó en células VERO y fue detectado por PCR tiempo real en el tercer pase ciego, el efecto citopático se presenta a partir de las 72

horas pos infección observándose al citoplasma con apariencia granular, vacuolización (pequeñas vacuolas), seguido por redondeo celular y desprendimiento (figura 42).

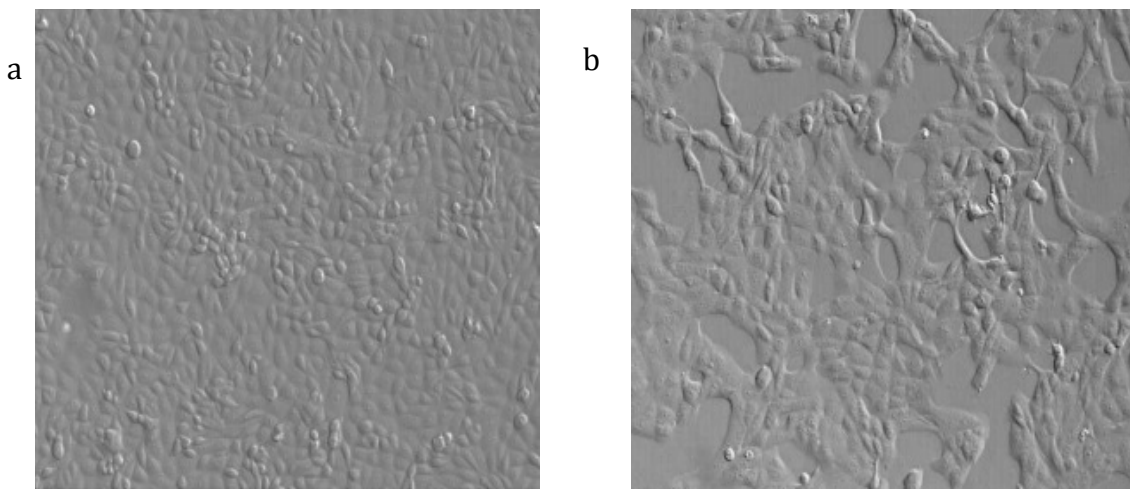


Figura 42 a) Células Vero testigo de 72 horas,

b) Células infectadas con cepa UNAM de CDV a las 72 horas.

Además del aislamiento de la cepa local UNAM, se consiguió la replicación de:

- Cepa vacunal Onderstepoort,
- Cepa vacunal Lederle
- Cepa patógena A75 perteneciente al clado Americano 2.

En las cepas vacunales el ECP se presentó a partir de las 48 horas mientras que en la cepa A75 se manifestó a partir de las 72 horas pos infección, observándose un efecto de vacuolización, redondeo y desprendimiento celular. En ninguna de las cepas replicadas se visualizó la formación de sincitios.

7.5.1 Titulación viral por el método de Reed-Muench

Las cuatro cepas virales fueron tituladas por TCID₅₀% mediante el método estadístico de Reed-Muench.

Titulación por TCID50% Reed-Muench		
Cepa	Título	Línea Celular
Ondersteeport	10 ^{9.4} / ml	VERO
Lederle	10 ^{8.29} / ml	VERO
A75 (América2)	10 ^{7.4} / ml	MDCK
Cepa UNAM	10 ^{6.46} / ml	VERO

Cuadro 15. Cepas virales replicadas en el laboratorio de Genética Molecular de CDV, su titulación viral y líneas celulares utilizadas.

7.5.2 Titulación de virus de CDV por qPCR

Se correlacionó el título viral con el número de copias virales obtenido por qPCR.

$$y = 39.227x - (2 \times 10^9)$$

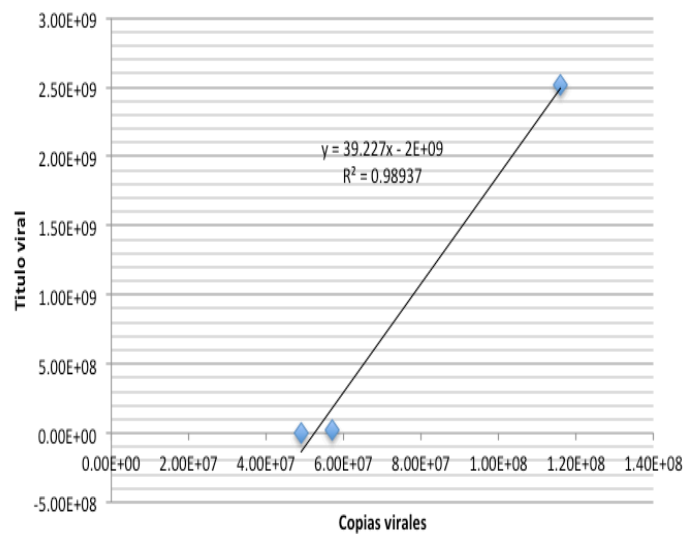
Siendo:

x= el número de copias virales

y= el título viral

Cepas	Copias virales	Título Viral
UNAM	4.90E+07	2.88E+06
Onder	1.16E+08	2.51E+09
A 75	5.71E+07	2.51E+07

Correlación lineal entre el numero de copias virales y título viral.



7.6 Suero Hiperinmune

7.6.1 Evaluación del suero hiperinmune por ELISA

La figura 43 muestra la evaluación de la reactividad antigénica del suero hiperinmune contra la cepa Lederle de CDV a través de un ensayo por triplicado de ELISA indirecta. Se sensibilizó con 100 ug/ul , el primer anticuerpo fue el suero hiperinmune de conejo contra el CDV en diluciones decuples seriadas, como segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo acoplado a peroxidasa en dilución 1:1500, el ensayo fue revelado con OPD.

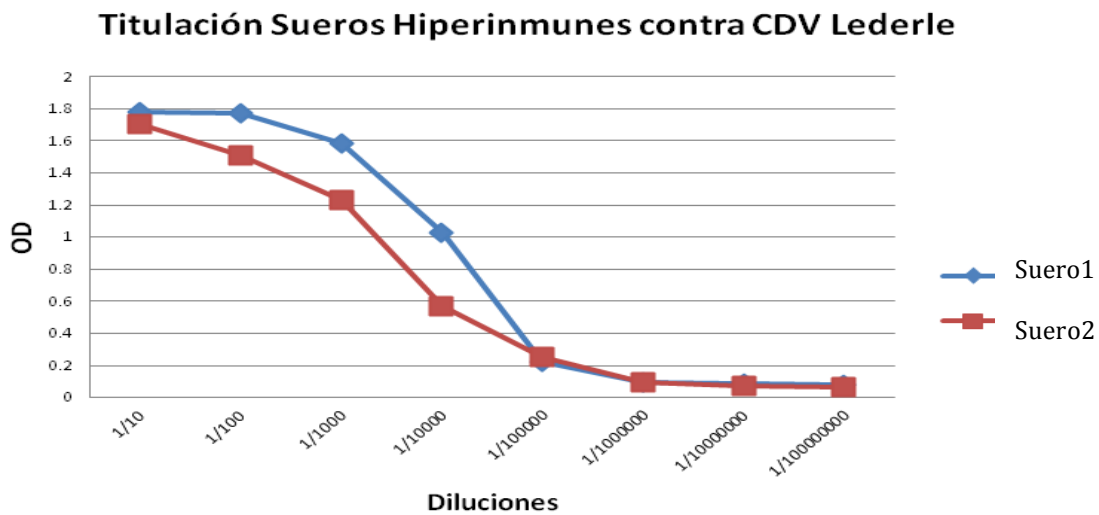


Figura 43. Titulación del suero hiperinmune contra CDV cepa Lederle. Antígeno: Virus de Lederle en dilución 1/10, primer anticuerpo: suero hiperinmune de conejo, segundo anticuerpo: anti-conejo en dilucion 1:1500, revelado con OPD.

Se llevó a cabo un ensayo por Western Blot para evaluar el reconocimiento de la proteína antigénica del CDV, la proteína H, por parte del suero hiperinmune contra CDV elaborado previamente.

7.6.2 Evaluación del suero hiperinmune por Western Blot (figura 44).

Figura 44. (1) Gel de acrilamida al 12% con 30 ug de antígeno (CDV cepa Lederle), (2) Gel de acrilamida al 12% con 30 ug de BSA. Westernblot con 30 ul de antígeno más control de BSA contra suero hiperinmune CDV. (3 y 4) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/100, (5 y 6) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/200, (7 y 8) Suero hiperinmune contra CDV en dilución 1/400. (9) carril control con BSA.

7.6.3 Evaluación del suero hiperinmune por Inmunodifusión

Se realizó un ensayo de inmunodifusión en agar el cual consiste en enfrentar en pequeñas perforaciones efectuadas en el agar las soluciones de antígeno y anticuerpo. Cuando un anticuerpo es puesto en contacto con el antígeno correspondiente, se forman complejos antígeno-anticuerpo que se insolubilizan en su mayor parte, dando lugar a una reacción de precipitación, que podemos observar como la formación de una banda de identidad (figura 45).

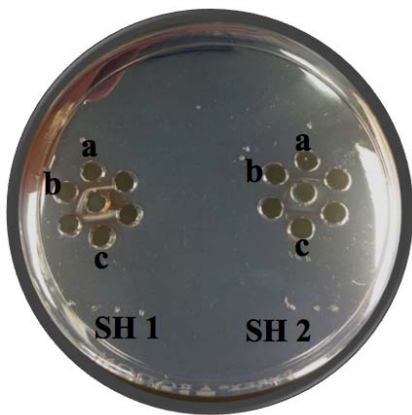


Figura 45. SH1: Suero Hiperinmune de conejo 1 contra cepa Lederle CDV, SH2: Suero Hiperinmune de conejo 2 contra cepa Lederle CDV, a: Cepa vacunal Onderstepoort, b: Cepa vacunal Lederle, c: Cepa UNAM.

8 DISCUSIÓN

Diversos análisis filogenéticos han observado que las cepas circulantes de CDV se agrupan en linajes con una clara distribución geográfica (Martella, 2006; Bolt, 1997; Haas, 1997; Pardo & Johnson, 2005; Martínez, 2011; Sarute & Pérez, 2014). En este estudio se analizaron 21 secuencias parciales del gen H, las cuales mostraron un porcentaje de identidad del 99 al 100% a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre sí y con respecto a las secuencias mexicanas previamente reportadas por (Martínez, 2011), confirmando la existencia de un clado mexicano claramente distinto de las cepas vacunales, así como del resto de las cepas alrededor del mundo.

Moreno, 2015 (comunicación personal), estudió comunidades de carnívoros en el noroeste de Chihuahua, encontrando muestras positivas a CDV en perros ferales cuyas secuencias parciales del gen H correspondían al clado mexicano con un elevado porcentaje de identidad, reafirmando los resultados obtenidos en este estudio.

Iwatsuki, *et al* 2000, demostraron a través de un estudio realizado en hospitales de Tokyo, Japón que dos tercios de los perros positivos a CDV habían sido vacunados, la mayoría con altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra la cepa vacunal Onderstepoort.

En las últimas décadas, se han presentado diversos reportes del resurgimiento de CDV en poblaciones de animales vacunados, de acuerdo con diversos autores (Iwatsuki, 2000; Decaro, 2004; Calderon, 2007; Martella, 2006). Nuestro estudio

indica que las muestras positivas a CDV pertenecientes a perros previamente vacunados, corresponden a cepas circulantes mexicanas, rechazando la posibilidad de reversión a la virulencia por parte de las cepas vacunales; contrario a lo sugerido por (Pardo & Johnson, 2005; Keawcharoen, 2005).

En este trabajo observamos que las cepas vacunales más utilizadas en el mundo, pertenecen al clado más alejado filogenéticamente, coincidiendo con lo reportado por diversos autores (Calderon, 2007; Sarute & Pérez, 2014; Woma & Van Vuuren, 2010; Martínez, 2011). La eficacia de las vacunas empleadas en la actualidad, puede ser parcialmente comprometida por la magnitud de la variación genética observada. Martella, *et al* 2006 demostraron que los sueros generados contra cepas CDV de campo tienen títulos neutralizantes hasta 10 veces mayores contra el virus homólogos que contra las cepas vacunales.

En este trabajo se logro aislar una cepa circulante del virus de CDV en la línea celular Vero, al igual que lo reportado por (Appel & Gillespie, 1972; Xian, 2005; Lednicky, 2004).

Se ha reportado que la eficiencia en el aislamiento de CDV se considera baja, tiende a ser prolongado y requiere de múltiples pases ciegos (Barrett, 1999; Roelke-Parker, 1996; Appel, 1987). Para lograr un aislamiento exitoso nosotros requerimos de periodos de incubación prolongados como los descritos por Lednicky, 2004; en comparación con los cortos periodos de tiempo indicados por (Appel, 1992).

No se observó ECP característico de CDV en las células Vero infectadas por el aislado mexicano, la ausencia de ECP en células Vero se informó previamente durante el aislamiento primario de CDV circulante realizado por Appel, *et al.*1994.

9 CONCLUSIONES

Se desarrollaron dos métodos diagnósticos del CDV basados en la RT-PCR anidada de una secuencia parcial del gen P y una prueba de PCR en Tiempo Real cuantitativa para la amplificación de un fragmento del gen N.

Se obtuvieron 21 secuencias parciales del gen H de CDV a partir de muestras clínicas provenientes del Distrito Federal, Estado de México y Guadalajara.

El análisis filogenético realizado demostró que las genovariedades presentes en este estudio, tienen un porcentaje de identidad del 99 al 100% a nivel de nucleótidos y aminoácidos entre sí y con respecto a las secuencias mexicanas previamente reportadas, confirmando la existencia de un clado mexicano claramente distinto de las cepas vacunales, así como del resto de las cepas alrededor del mundo.

El 100% de las secuencias obtenidas corresponden a cepas pertenecientes al clado mexicano de CDV, de las cuales el 62% fueron obtenidas a partir de perros enfermos con antecedentes de vacunación previa, descartando en estos casos, que la enfermedad presente en los perros vacunados contra CDV sea resultado de la reversión a la virulencia por parte de las cepas vacunales, si no la infección por genovariedades locales.

Se amplificó y secuenció el gen completo H de una variante mexicana del virus de CDV. El cual se clonó en el sistema comercial Bac to Bac ® (Invitrogen) para la expresión de proteínas recombinantes. La obtención de la proteína recombinante

H local podrá emplearse en la elaboración de un sistema diagnóstico tipo ELISA con la finalidad de utilizar antígenos homólogos a las cepas circulantes. Esta proteína recombinante podrá ser utilizada en el desarrollo de un inmunógeno específico para el control de las cepas locales.

Se logró el aislamiento de un virus CDV circulante y se caracterizó molecularmente, perteneciendo al clado mexicano más representativo. La obtención un aislamiento viral de una cepa circulante permitirá determinar la presencia de posibles cambios antigénicos, así como la existencia de serogrupos en el virus de Distemper canino. Este aislado también podrá ser usado como cepa de desafío en experimentos de protección y dinámica de la infección.

Se obtuvieron anticuerpos en conejo contra la cepa Lederle del CDV que permitirán la evaluación inmunológica del virus.

Análisis más extensos sobre los posibles cambios antigénicos en las cepas circulantes de CDV podrán proporcionar un conocimiento más profundo de la ecología global del virus, sirviendo como base para la evaluación de las vacunas actuales.

10 BIBLIOGRAFÍA

Calderon, M. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol* , 125, 341–349.

Lamb, R. (2007). Structure of the uncleaved ectodomain of the paramyxovirus fusion protein. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* , 102, 9288-9293.

Lan, N. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet. Microbiol* , 115, 32-42.

Carpenter, M. (1998). Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Vet. Immunol. Immunopathol* , 65, 259-266.

Lednicky, J. (2004). Effective primary isolation of wild-type canine distemper virus in MDCK, MV1 Lu and Vero cells without nucleotide sequence changes within the entire haemagglutinin protein gene and in subgenomic sections of the fusion and phospho protein genes. *Journal of virological methods* , 118 (2), 147-157.

Luckow, V., & Lee, S. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology* , 67 (4566-4579).

An, D., & Yoon, S. (2008). Phylogenetic characterization of Canine Distemper virus isolated from naturally infected dogs and marten in Korea. *Veterinary Microbiology* , 132 (389-395).

Appel, M. (1987). Canine distemper virus. *Virus Infections of Carnivores. Virus Infections of Vertebrate* , 1, 133–159.

Appel, M. (1978). Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and in vitro. *J. Gen. Viro* , 41, 385–393.

Appel, M., & Gillespie, J. (1972). Canine distemper virus. *Viol. Monogr* , 11, 1–96.

Appel, M., & Jones, O. (1967). Use of alveolar macrophages for cultivation of canine distemper virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* , 126, 571–574.

Appel, M., & Pearce-Kelling, S. (1992). Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. *J. Vet. Diagn. Invest* , 4, 258–263.

Appel, M., & Summers, B. (2009). *Distemper canino:estado actual*. Retrieved 03 25, 2014, from Institute for Animal Health. College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA.: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/appel_es/chapter_frm.asp?LA=2

Blixenkrone-Møller, M. (1993). Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microbiol* , 37, 163-173.

Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on morbilliviruses of carnivores. *Veterinary microbiology* , 69 (1), 3-13.

Beineke, A; Puff, C; et al . (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* , 127, 1-18.

Bolt, G. (1997). Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *J. Gen. Virol* , 78, 367–372.

Budaszewski, R. (2013). Genotyping of canine distemper virus (CDV) strains circulating in Brazil. *Unpublished Submitted (19-NOV-2013) Departamento de Patologia Clinica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av Bento Goncalves, 9090, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91540000, Brazil* .

Datsenko, K., & Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 97 (12), 6640-6645.

Del Castillo, C., & Gómez, A. (2006). *Manual de prácticas para el laboratorio de virología*. Distrito Federal, México: FMVZ-UNAM.

Decaro, N. (2004). Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *The new Microbiologica* , 27, 177-182.

Delpeut, S., Noyce, R., Siu, R., & Richardson, C. (2012). Host factors and measles virus replication. *Current opinion in virology* , 2 (6), 773-783.

Demeter, Z. (2010). Controversial results of the genetic analysis of a canine distemper vaccine strain. *Vet. Microbiol* , 142 (3-4), 420–426.

Dempsey, T., & Mayer, V. (1934). CANINE DISTEMPER VACCINE- Two experiments with vaccine prepared by photodynamic inactivation of the virus with methylene blue. *General Articles* , 197-201.

Elia, G. (2006). Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* , 136 (1), 171-176.

Fenner, F., Bachmann, P., & Gibbs, E. (2014). *Veterinary virology*. Massachusetts, Estados Unidos: Elsevier.

Gemma, T., & Iwatsuki, K. (1996). Serological analysis of canine distemper virus using an immunocapture ELISA. *J. Vet. Med. Sci.* , 58 (8) , 791-794.

Haas, L. (1997). Analysis of the haemagglutinin gene of current wildtype canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res* , 48, 165–171.

Haas, L., Liermann, T., Harder, T., & von Messling, W. (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: immunization with avianized virus. Onderstepoort . *J. Vet. Res* , 17, 19-53.

Harder, T. (1997). Canine distemper virus- a Morbillivirus in search of new host. *Trends Microbiol* , 5, 120-124.

Harder, T. (1996). Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol* , 77, 397–405.

Harder, T. (1993). Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid distemper morbillivirus isolates by kinetic neutralization using a novel immunoplaque assay. *J. Virol Methods* , 41, 77-92.

Harrison, R., & Jarvis, D. (2006). Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins. *Advances in virus research* , 68, 159-191.

Hirama, K. (2004). Phylogenetic analysis of the hemagglutinin (H) gene of canine distemper viruses isolated from wild masked palm civets (*Paguma larvata*). *Journal of veterinary medical science* , 66 (12), 1575-1578.

Iwatsuki, K. (2000). Antigenic difference in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet. Microbiol* , 71, 281-286.

Iwatsuki, K., Miyashita, N., & Yoshida, E. (1997). Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol* , 78, 373-380.

Kai, C. (1993). Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. *J. Vet. Med. Sci* , 55, 1067-1070.

Keawcharoen, J. (2005). Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol* , 105, 137-142.

Keawcharoen, J. (2005). Nucleotide sequence analysis of nucleocapsid protein gene of canine distemper virus isolates in Thailand. *Vet. Microbiol* , 105, 137-142.

King, A., & Lefkowitz, E. (2011). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (1^a ed.). Estados Unidos de América: Elsevier.

Krakowka, S., & Higgins, e. a. (1985). Canine distemper virus: review of structural modulations in lymphoid tissues. *American Journal of Veterinary Research* , 41, 284-292.

Márquez, M. (2006). Seroprevalencia de anticuerpos contra Moquillo canino en perros no vacunados en dos municipios de Ciudad de la Habana (Antibodies

seroprevalence against Canine Distemper in non vaccinated dogs in two localities in Havana City) . *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET* , 1-6.

Martella, V. (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) 14 strains detected in Italy. *Vet Microbiol* , 116, 301-309.

Martínez, S. (2011). Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Veterinary research communications* , 35 (6), 381-390.

Mochizuki, M. (2002). Complement-mediated neutralization of canine distemper virus in vitro: cross-reaction between vaccine Onderstepoort and field KDK-1 strains with different hemagglutinin gene characteristics. *Clin Diagn Lab Immunol* , 9 (4), 921-4.

Mochizuki, M. (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.

Moreno, K. (2015). *Estudio serológico y molecular de distemper y parvovirus canino en comunidades de carnívoros del noroeste de Chihuahua*. Tesis de Maestría, FMVZ, UNAM, Fauna Silvestre, Distrito Federal.

Nelson, R., & Couto, C. (2010). *Medicina Interna de Pequeños Animales*. Barcelona, España: Elsevier.

Origgi, F., Plattet, P., Sattler, U., Robert, N., Casaubon, J., Mavrot, F., et al. (2012). Emergence of Canine Distemper Virus Strain With Modified Molecular Signature and Enhanced Neuronal Tropism Leading to High Mortality in Wild Carnivores. *Veterinary Pathology Online* .

Palomares, L. (2010). Efecto de la densidad celular y la multiplicidad de infección sobre la producción de baculovirus recombinantes en cultivos de células de insecto. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* , 13 (2), 65-72.

Panzerá, Y., & Calderón, M. (2012). Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Res.* , 163 (1).

Pardo, I., & Johnson, G. (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Clin. Microbiol.* , 12 (43), 5009-5017.

Patronek, G. (1995). Canine distemper 15 infection in pet dogs: II. A case-control study of risk factors during a suspected outbreak in Indiana. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* , 31 (16), 230-235.

Patterson, J., Thomas, D., & Lewicki, H. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Oldstone MB: Virology* , 267, 80-89.

Perrone, D., Bender, S., & Niewiesk, S. (2010). A comparison of the immune responses of dogs exposed to canine distemper virus (CDV) — Differences between vaccinated and wild-type virus exposed dogs. *Can J Vet Res* , 74 (3), 214–217.

Pinotti, M., & Gollan, A. (2009). Distemper canino. 8 (2), 29-45.

Rima, B., Baczkó, K., & Imagawa, D. (1987). Humoral immune response in dogs with old dog encephalitis and chronic distemper meningo-encephalitis. *J. Gen. Virol.* , 68, 1723-1735.

Roelke-Parker, M. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* , 379, 400–401.

Schönbauer, M., Kölbl, S., & Schönbauer-Längle, A. (1984). Perinatale staupinfektion bei drei eisbären (*Ursus maritimus*) und bei einem brillenbären (*Tremarctos ornatus*). *Verh. Int. Symp. Erkrank. Zoot.* , 26, 131–136.

Scagliarini, A. (2003). Molecular analysis of the NP gene of Italian CDV isolates. *Vet. Res. Commun* , 27, 355-357.

Santos de la Torre, J. (2014). Presencia de anticuerpos contra el virus de distemper canino en perros domésticos (*canis lupus familiaris*) de áreas rurales habitadas por el zorro de sechura (*lycalopex sechurae*).

Sarute, N., & Pérez, R. (2014). Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes* , 48, 474-478.

Sato, H. (2012). Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection . *Frontiers in microbiology* , 3.

Stern, L. (1995). The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J. Virol* , 9, 1661-1668.

Summers, M. (2006). Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides . *Advances in virus research* , 68 (3), 73.

Visser, I. (1990). Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North Europe and Siberia. *Arch. Virol* , 111,, 149–164.

von Messling. (2004). Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers; partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J. Virol* , 78, 7894-7903.

von Messling, V. (2001). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J. Virol.* , 75, 6418-6427.

Von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L., & Cattaneo, R. (2011). The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *American Society for Microbiology* , 75 (14), 6418-6427.

Whetstone, C., Bunn, T., & Gourlay, J. (1981). Canine distemper virus titration in ferret peritoneal macrophages. *Cornell Vet.* , 71, 144–148.

Woma, T., & Van Vuuren, M. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: Lineage Africa. *Veterinary Microbiology* , 143 (2), 126–132.

Xian, S. (2005). Isolation of canine distemper virus. *Journal of Mountain Agriculture and Biology* , 5, 002.

Yang, J. (2009). Novel Vectors for Baculovirus Expression. *Genetic Engineering & Biotechnology News* , 29 (21), 1-3.

Zhao, J. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Veterinary microbiology* , 140 (1), 34-42.

Zipperle, L. (2010). Identification of key residues in virulent canine distemper virus hemagglutinin that control CD150/SLAM-binding activity. *J. Virol* , 84, 9618-9624.