

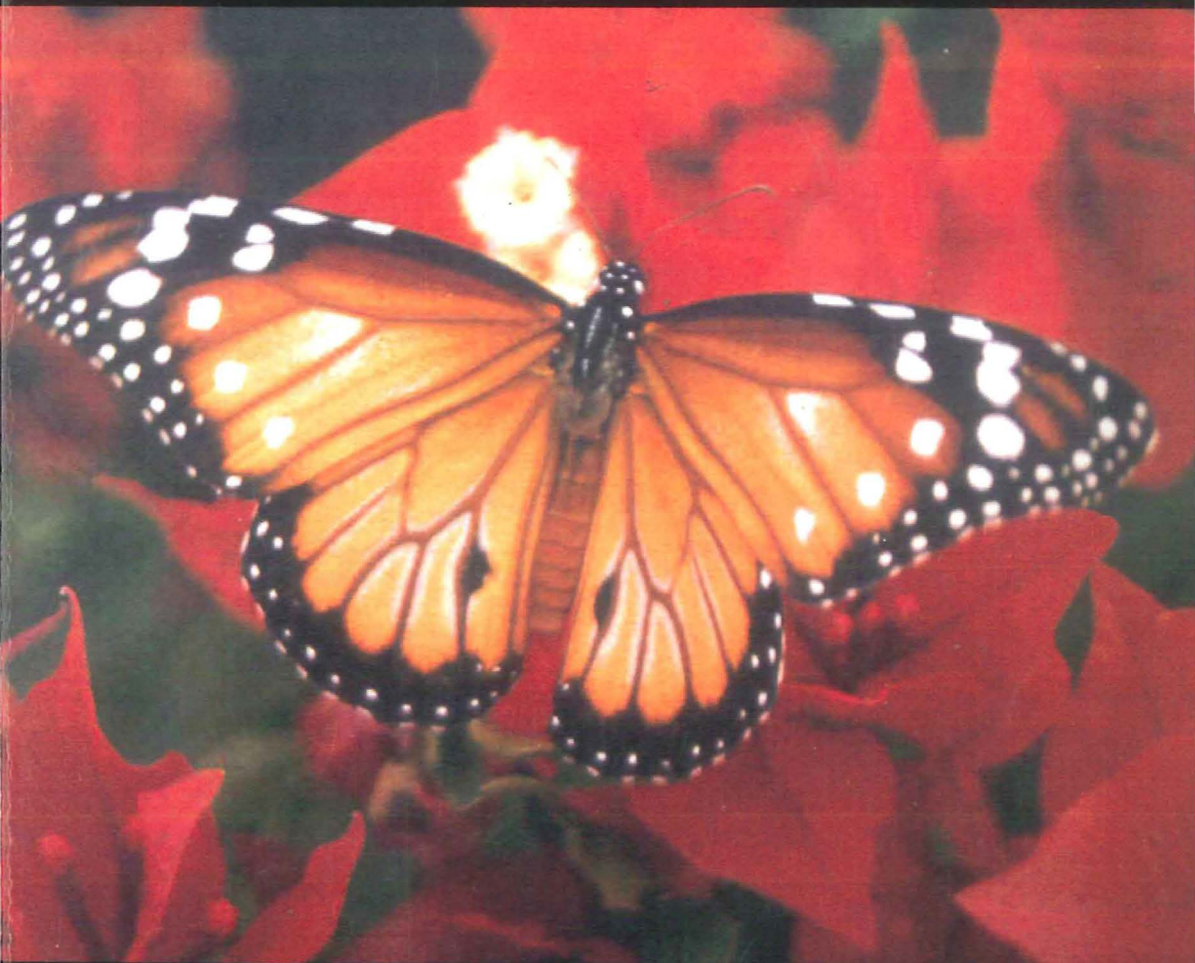
Universitas

ISSN 0122-7483

Scientiarum

Vol 6 No. 2

Julio - Diciembre 2001



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Revista de la Facultad de Ciencias



ANÁLISIS GENÓMICO DE PARVOVIRUS CANINO POR PCR - RFLP A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CASOS CLÍNICOS SINTOMÁTICOS TOMADOS EN BOGOTÁ - COLOMBIA -ESTUDIO PRELIMINAR-

Ángela Castillo¹, Hugo Díez¹, Jorge Almanza², Lois Jerabek¹, Orlando Torres¹

¹ Grupo de enfermedades infecciosas, Microbiología Agrícola y Veterinaria, Pontificia Universidad

Javeriana, Bogotá, Colombia; Grupo de Inmunología², CORFOICA, Bogotá, Colombia.

Pontificia Universidad Javeriana - Carrera 7 n° 43 - 82 Bogotá D. C. - Colombia. Fax (57 - 1) 288 23 35.
Correo electrónico: otorres@javeriana.edu.co

RESUMEN

Con el objetivo de determinar el genotipo del parvovirus canino (CPV) circulante en Bogotá, se analizaron 56 muestras tomadas a conveniencia, de materia fecal y sangre de perros menores a un año con gastroenteritis hemorrágica presuntiva de parvovirus, por reacción en cadena de la polimerasa - huella genómica (PCR - RFLP). Se obtuvieron fragmentos amplificados de DNA de 2.2 Kb por PCR de la cepa vacunal de CPV-2 y de cuatro muestras de heces, no se obtuvieron amplificados de las muestras de sangre. Los productos amplificados fueron digeridos por la enzima de restricción Rsa I permitiendo la identificación de los genotipos CPV-2a y CPV-2b así como su diferenciación con el parvovirus tipo - 2 (CPV-2).

Palabras clave: parvovirus canino; reacción en cadena de la polimerasa; huella genómica; genotipo.

ABSTRACT

With the objective of determining the genotypes of canine parvovirus (CPV) circulating in Bogotá, 56 fecal and blood samples were obtained from younger dogs, up to a year old with hemorrhagic gastroenteritis for its analysis by the polymerase chain reaction - fingerprints (PCR - RFLP) assay. DNA fragments were obtained from (2,2 Kb) a representative vaccine strain of parvovirus type -2 (CPV-2) and from the four fecal samples were amplified by the PCR assay; they were not obtained from the amplification of the blood samples. The amplified products were digested by the restriction enzyme Rsa I, permitting the identification of genotypes PCV-2a and PCV-2b and the differentiation of CPV-2 from CPV-2a and CPV-2b.

Keywords: Canine parvovirus; polymerase chain reaction; fingerprints; genotype.

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de evolución del parvovirus canino (CPV) aún no son claros; desde su descubrimiento el parvovirus canino tipo II (CPV-2) (1978), distinto del virus diminuto canino (CPV-1) (Binn *et al.* 1970), ha presentado modificaciones en su genoma y por tanto variación antigénica, haciendo que la patología se manifieste de forma diferente. Los aislamientos efectuados entre 1979 y 1981 mos-

traron la presencia de una nueva "cepa", denominada CPV-2a, y a mediados de los ochenta se comprobó la emergencia de un tercer subtipo en los Estados Unidos, el CPV-2b (Parrish *et al.* 1990).

Estudios desarrollados en Brasil, Italia, Inglaterra, Estados Unidos y Japón, han demostrado que el CPV ha sufrido cambios genómicos en un período relativamente corto. Se cree que estos cambios le confieren al virus mayor

adaptabilidad y resistencia al medio ambiente (Sagazio, P. *et al.* 1998).

Diferentes metodologías han sido empleadas para caracterizar el genotipo de dichos subtipos; Greenwood *et al.* (1995), aislaron CPV de casos clínicos de enteritis en el Reino Unido, Alemania y Estados Unidos, utilizando un panel de anticuerpos monoclonales. Sagazio *et al.* (1998), caracterizaron el tipo antigénico que predomina en Italia y los diferenciaron con enzimas de restricción, en tres grupos, tipo CPV2, CPV2a y CPV2b.

El presente trabajo tuvo como objetivo identificar por PCR-RFLP el genotipo del parvovirus canino aislado de muestras de sangre y materia fecal de perros menores de un año con cuadro clínico de enteritis hemorrágica tomados a conveniencia, en diferentes clínicas veterinarias de Bogotá – Colombia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se estudiaron muestras de sangre y materia fecal (56 de sangre y 17 de materia fecal), de 56 perros tomados a conveniencia menores de un año con signos clínicos compatibles con cuadro de parvovirus canina en la ciudad de Bogotá. D.C. - Colombia, entre los años 2000 y 2001. Cuatro de cincuenta y seis perros estaban confirmados para CPV; dos por IH, uno por ELISA, y uno por histopatología.

Aislamiento del virus a partir de muestras de materia fecal

El virus se aisló siguiendo el protocolo estándar reportado por Matiz *et al.* (1983).

Extracción de DNA

La extracción de DNA viral se realizó siguiendo el protocolo estándar del GFX Genomic Blood DNA Purification Kit^o (Code: 27-9603-01 Amersham Pharmacia Biotech).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para amplificar del gen VP1/VP2 que codifica para la proteína de la capsida del CPV se utilizaron dos primers; el primer A (VPF) comprendido entre los nucleótidos 2284 - 2303 (5'-GAT GGC ACC TCC GGC AAA GA-3') y el primer B (VPR) complementario a los nucleótidos comprendidos entre la región 4512 - 4530 (5'-TTT CTA GGT GCT AGT TGA G-3') del genoma viral según la secuencia reportada por Reed *et al.* (1988).

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: Buffer PCR 1X, dNTPs 0,2mM, Primer A 1mM, Primer B 1mM, MgCl₂ 1,5mM, taq DNA polimerasa 0,20 U. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer (Gene Amp PCR System 2400) por 35 ciclos de denaturación a 94°C 5 min., anillamiento a 55°C 2 min. y extensión a 72°C 5 min.

Posteriormente los productos amplificados fueron corridos electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y visualizados por luz UV, usando tinción con bromuro de etidium.

Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Se sometió a digestión 10ml de amplificado con 1.5 U de enzima de restricción Rsa I (5'-GT ? AC-3': 3'-CA ?? TG-5') (Code: 15424-013 Gibco BRL) en buffer 10mM Tris- CHl (pH 7.4), 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 1mM DTT, 1mg/ml BSA, 50% (v/v) de glicerol, a 37°C por 1 hora. Los fragmentos de restricción fueron analizados posteriormente por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% y visualizados por tinción de plata.

RESULTADOS

Muestras

Un total de 73 muestras entre materia fecal y sangre, fueron colectadas de 56 perros en di-

ferentes centros veterinarios de Bogotá, el 32.2% de los perros fueron de raza French Poodle, el 60.7% se encontraban entre los 2 y 3 meses de edad y el 7.1% de los animales tenían esquema de vacunación completo para parvovirus.

Cuatro de los 56 perros (7.1%) tenían confirmación para CPV; dos por IH y los dos restantes por ELISA e histopatología respectivamente.

Técnica de PCR

Un producto de PCR de aproximadamente 2.2 Kb se obtuvo con el DNA temple de referencia (DNA de CPV cepa vacunal). Todas las muestras (73) fueron sometidas a PCR; cuatro (7.1%) de estas mostraron una banda de tamaño similar al de referencia como muestra el análisis electroforético en la figura 1.

En ninguna de las muestras de sangre se obtuvo amplificado por PCR.

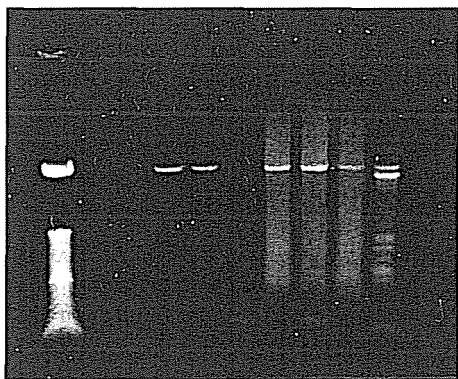


FIGURA 1. Un ejemplo de productos amplificados por PCR a partir de CPV aislado de muestras de materia fecal. Línea M) marcador de peso molecular (de arriba para abajo: >3000, 2000, 800, 350, 50 pb); líneas 1 a 4 y la 8) muestras sometidas a PCR, muestras 2, 3, y 8 positivas (aprox. 2.2 Kb), muestras 1 y 4 negativas; líneas 5, 6 y 7) producto de PCR generado a partir del CPV de referencia (CPV cepa vacunal).

RFLP

De los cuatro productos obtenidos por PCR, dos mostraron idéntico patrón de restricción al subtipo CPV-2a de las dos restantes una mostró patrón idéntico al subtipo CPV-2-b y la otra un patrón idéntico al tipo CPV-2 después de la digestión con la endonucleasa Rsa I. En contraste, el producto amplificado de la cepa vacunal (CPV de referencia) mostró un patrón de restricción idéntico al tipo CPV-2 como se esperaba (figura 2).

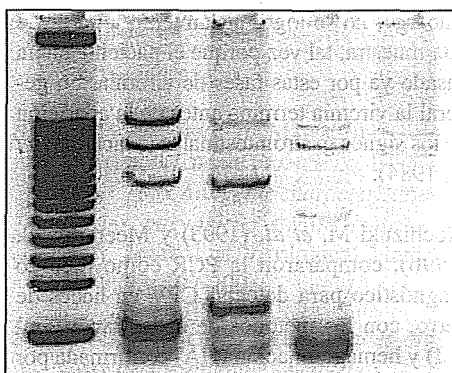


FIGURA 2. Un ejemplo de patrones de reacción de la enzima Rsa I en productos de PCR. Línea M) marcador de peso molecular (de arriba para abajo: 2.000, 800, 350, 50 pb); línea 1) restricción del CPV de referencia (CPV cepa vacunal) CPV-2. Línea 2) muestra con genotipo CPV-2; línea 3) muestra con genotipo CPV-2a; línea 4) muestra con genotipo CPV-2b.

DISCUSIÓN

Con frecuencia se diagnostica clínicamente como "parvovirus canino" a un alto porcentaje de casos de gastroenteritis hemorrágica, omitiéndose la probabilidad de otras etiologías que presentan cuadros similares como ocurre con algunas infecciones virales, bacterianas, micóticas y parasitarias; sin mencionar procesos de tipo idiopático, tóxico o metabólico (Strombeck D., 1995), por el hecho de no hacerse confirmación al diagnóstico. En este es-

tudio, de un total de 56 perros se colectaron muestras en diferentes centros veterinarios con diagnóstico clínico de parvovirus canina, sólo cuatro tenían confirmación de laboratorio (IH, ELISA e histopatología), hecho que corrobora lo mencionado anteriormente.

El objeto de tomar muestra de sangre fue el de observar si era posible detectar el virus en pacientes caninos, puesto que la literatura reporta que el CPV presenta tres períodos de viremia cortos después de la infección (Strombeck D, 1995 y Studdert M., 1983). Sin embargo, no se logró aislamiento a partir de esta muestra, tal vez porque el paciente había pasado ya por estas fases de viremia. En general la viremia termina antes de la aparición de los signos gastrointestinales (Macartney *et al.*, 1984).

Mochizuki M. *et al.* (1993) y Meerarani S. (1996), compararon la PCR como método diagnóstico para detectar CPV en heces de perro, con los métodos de aislamiento viral (VI) y hemaglutinación (HA) confirmada por inhibición de la hemaglutinación (IH); concluyendo que la PCR es una técnica rápida, sensible y específica para la detección de CPV en materia fecal de especímenes contaminados. Las muestras amplificadas por PCR en este estudio, resultaron ser coincidentalmente las mismas que presentaban confirmación por otra prueba, sin embargo, esto de ninguna manera determina la sensibilidad del PCR en este trabajo, además, se debe recordar que existen inhibidores en muestras de materia fecal para el PCR (Wilde *et al.*, 1990 y Louvea *et al.*, 1991).

Se determinó suficiente, el usar PCR para amplificar el gen VP1/VP2 del parvovirus canino con los primers VPF (5'-ATGGC-ACCTCCGGCAAAGA-3') y VPR (5'-TTTCTAGGTGCTAGTTGAG-3') de acuerdo a la secuencia de Reed *et al.* (1988) y RFLP con la enzima de restricción Rsa I para diferenciar entre los genotipos CPV-2, CPV-2a y

CPV-2b, tal como lo reportó Sagazio *et al.*, (1998) y Mochizuki *et al.*, (1993).

En conclusión, este estudio deja ver que es posible que se encuentre circulando en Bogotá otra(s) etiología(s) diferente a parvovirus canino que esté causando en perros menores de un año un cuadro agudo de gastroenteritis hemorrágica.

Utilizando la PCR-RLFP se diferenciaron los genotipos CPV-2a y CPV-2b del CPV-2 vacunal en las muestras tomadas. Pese a que la PCR resulta ser eficiente y rápida, ésta puede ser bloqueada por inhibidores presentes en muestras de materia fecal (datos no mostrados).

Son necesarios futuros estudios con base poblacional para poder precisar la predominancia o no de los genotipos CPV-2a y CPV-2b.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Almansa J., por la revisión y contribución al presente estudio. Dr. Castellanos J.; al Grupo de investigación de parvovirus canina de la Pontificia Universidad Javeriana, por su incondicional colaboración y a INMUNOLAB de Colombia por la donación del GFX Genomic Blood DNA Purification KIT^o (Code: 27-9603-01 Amersham Pharmacia Biotech).

LITERATURA CITADA

- BINN L.N., LAZAR E.C., EDDY G.A., KAJIMA A. *Recovery and characterization of a minute - virus of canines.* Infection and Immunity, 1970; 1: 503
- GREENWOOD N.M., CHALMERS W.S.K., BAXENDALE W., THOMPSON H. *Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains.* Vet. Record, 1995: 136: 63-67.
- LOUVEA V., ALLEN J.K., HANS P.D., ZANG Z.Y., BREMONT M., COHEN J., MC CRAE M.A.,

- SAIF L.J., SENARCHATANANT P., CAUL E.O. *Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction*. J. Clin. Microbiol, 1991; 29: 519-523.
- MACARTNEY L., MC CANDLISE I.A., JHONPSON H., CORNIVELL H.J., *Canine parvovirus enteris*. Clinical, Hemathological and pathological features of experimental infection. Vet. Rev. 1984; 115: 201.
- MATHYS R., MUELLER N.C., PEDERSEN G.H., THEILEN. *Hemagglutination with forlalin-fixed erythrocytes for detection of canine parvovirus*. Am. J. Vet. Res., 1983, enero; 44 (1): 150-151.
- MEERARANI S., RAMADASS P., SUBHASHINI, C.R., NACHIMUTHU K. *Polymerase chain reaction assay for early detection of canine parvovirus*. Indian Vet. J. 1996; 73: 1013-1016.
- MOCHIZUKI M., San GABRIEL M.C., NAKATANI H., YUSHIDA M. *Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of Canine Parvovirus in fecal specimens*. Japenese Journal of Veterinary Science, 1993; 55: 60-63.
- MOGOLLÓN J., CORTÉS ESPERANZA, BENAVIDES ÓSCAR, FORERO G. *Parvovirus canina en Colombia I. Aspectos clínicos y morfológicos*. ACOVEZ, 1981; 5 (18): 25-31.
- PARRISH C.R., AQUADRO CH.F., STRASSHEIM M.L., EVERMANN J.F., SGRO J-Y., MOHAMMED H.O. *Rapid Antigenic - Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus*. J. Virology, 1991; 65(12): 6544-6552.
- PARRISH COLIN. *Emergence, natural history and variation of canine, mink, and feline parvoviruses*. Advances in virus research, 1990; 38: 403-451.
- PEREIRA CÉSAR, MONEZI TELMA DURIGON, EDISON L., y colaboradores. *Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay*. Veterinary microbiology, 2000; 75: 127-133.
- REED A.P., JONES E.V., MILLER T.J. *Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus*. J. Virology, 1988; 62(1): 266-276.
- SAGAZIO PAOLA, TEMPESTA MARÍA, BUONAVOGLIA DOMÉNICO, CIRONE FRANCESCO, BUONAVOGLIA CANIO. *Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy*. Journal of Virological Methods, 1998; 73: 197-200.
- STROMBECK DONALD R. *Enfermedades digestivas de los animales pequeños*, 2ª edición, Buenos Aires, República de Argentina, Editorial Inter-Médica, 348-350, 1995.
- STUDDERT M.J. *Aspect of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus*, Australian Veterinary Journal. 1983; vol. 60, nº 7, 197-200.
- WILDE J., EIDEN J., YOLKEN R., *Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction*. J. Clin. Microbiology 1990; 28: 1300-1307.