



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

USO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR Y SECUENCIACIÓN
PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DISTEMPER
CANINO VACUNAL EN MUESTRAS CLÍNICAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

MÓNICA IVONNE NUNCIO LIMÓN



ASESORES:

Dra. Laura Cobos Marín

Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara

México, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

A mis amados padres:

Mónica Limón Velásquez mami eres el amor más sublime y desinteresado que conoceré en mi vida. Tus brazos siempre han estado cerca cuando he necesitado un abrazo. Tu corazón sabe comprender cuándo necesito una amiga. Tus ojos sensibles se endurecen cuando necesito una lección. Tu fuerza y tu amor me han dirigido por la vida y me han dado las alas que he necesitado para volar. Gracias por ayudarme a cumplir este sueño te quiero ma.

José de Jesús Nuncio Salinas papá eres el ejemplo vivo de lucha, fuerza y perseverancia. Te admiro enormemente, siempre serás mi súper héroe, no solo me diste la vida también me has enseñado a vivir, a saber que es bueno y que es malo, pero lo que principalmente me has enseñado es como ser feliz. Gracias profundamente por todo lo que has hecho por mí, por la vida que me has dado. Hombres como tu hay pocos te quiero mucho pa.

A mis hermanas Pao's, Vane y Xime:

La vida me concedió un deseo sin haberlo pedido; tenerlas a ustedes. Mis grandes compañeras de vida y de juegos, juntas hemos vivido lo bueno y lo malo; la vida ha sido mas fácil por que la he aprendido junto a ustedes. El cariño que nos une es único, indestructible y no sabrá jamás de distancias ni de silencios, contar con ustedes le ha dado a mi vida luz, alegría y confianza. Mi corazón se siente agradecido por haber sido bendecido con su presencia las amo.

A Majo y a Max:

Por ser los pequeños solecitos que han llenado mi vida de alegría.

A mis Abuelitos Aurorita y Manuel:

Gracias por enseñarme que el amor, los valores y la familia son las cosas más grandes que existen. Siempre estaré agradecida por su infinito amor y consejos.

A mi tía Marilú:

Eres una persona muy especial en mi corazón las palabras no son suficientes para expresar todo mi cariño por ti, encontrar a alguien como tú no me sería posible nunca, porque eres sin igual. Mil gracias por las cosas buenas que desde que era niña has hecho por mí. Te quiero por siempre.

A Miguel Ángel Jasso Escutia:

Gracias por todo tu apoyo, por siempre tener palabras de aliento para mi, eres el compañero perfecto a mi locura, mi mejor amigo, el principio y fin de mi mundo, gracias infinitas por transformar mi vida con tu alegría, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara por creer en mí y aceptarme en su laboratorio, por permitirme vivir esta gran experiencia profesional la cual ha marcado mi vida, por siempre preocuparse en generar los medios para la realización de los proyectos pero principalmente por su gran amistad y consejos; gracias por todo.

A la Dra. Laura Cobos Marín por siempre estar al pendiente de mí y por dedicarme su valioso tiempo mil gracias doctora.

Al Dr. Ángel Retana Reyes por asesorarme en los procedimientos experimentales, por enseñarme a trabajar el cultivo celular, por siempre estar dispuesto a compartir sus conocimientos, experiencia profesional y su amistad.

Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por sus comentarios hacia mi trabajo ya que ayudaron a que este mejorara y por siempre insistir en la importancia de la formación académica.

A Ninna y Clau chiquillas gracias por compartir esta gran aventura, por hacer mas amenos los días de trabajo con su alegría, por compartir esta experiencia, por todo su apoyo y palabras de aliento en los momentos difíciles, en ustedes encontré grandes amigas las quiero.

A mis compañeros de laboratorio de Vacunología, Virología y Mycoplasmas; Víctor, Marina, Manu, Isa, Luz, Pablo, Montse, Naomi, Tere, Pancho y Martita Juárez, gracias por ayudarme cuando lo necesite, por compartir su tiempo y su amistad, es grato saber que se cuenta con personas tan especiales como ustedes.

A los miembros del LMM por su amistad y consejos Lázaro, Rodrigo, Vicky, Aidé, Dianita, Julia, Moni, Julio, gracias por compartir momentos de alegría y desesperación durante la realización de este trabajo.

A Raúl Hernández gracias por siempre estar al pendiente del material de laboratorio pero principalmente por tu gran amistad y por los agradables momentos de conversación.

Dra. Rosa Elena Sarmiento por estar al pendiente de mi formación, por ayudarme a aclarar mis dudas, por las agradables pláticas y su amistad.

A mis amigos Aline Moreno, Lane Huerta, Paola Hernandez, Adriana Ruiz, Karla Esparza, Laura Puebla, Jose Luis Angeles, Josh Llanes, Joseph Curwen, soy muy afortunada de tenerlos a todos ustedes, mil gracias por su gran amistad y por compartir conmigo momentos inolvidables.

A toda mi familia, son únicos gracias por su amor.

A toda la Familia Escutia, por recibirme con los brazos abiertos y con tanto cariño, gracias por siempre estar al pendiente de mí, es increíble saber que se cuenta con personas tan lindas y llenas de valores.

Al laboratorio Holland de México S.A de C.V y Pfizer, por la donación de material.

A la Máxima Casa de Estudios UNAM por ser la columna de mi formación académica y brindarme la oportunidad de ser Médica Veterinaria Zootecnista.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el proyecto PAPIIT IN228710.

CONTENIDO

	Página
<u>RESUMEN</u>	1
<u>1.INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>2.JUSTIFICACIÓN</u>	25
<u>3.HIPÓTESIS</u>	26
<u>4.OBJETIVOS</u>	26
<u>5.MATERIALES Y MÉTODOS</u>	28
<u>6.RESULTADOS</u>	44
<u>7.DISCUSIÓN</u>	57
<u>8.CONCLUSIONES</u>	62
<u>9.PROSPECTIVA</u>	63
<u>10.REFERENCIAS</u>	64
<u>11.ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES</u>	74

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	Página
<u>FIGURA 1</u>	6
<u>FIGURA 2</u>	8
<u>FIGURA 3</u>	10
<u>FIGURA 4</u>	17
<u>FIGURA 5</u>	28
<u>FIGURA 6</u>	30
<u>FIGURA 7</u>	30
<u>FIGURA 8</u>	30
<u>FIGURA 9</u>	40
<u>FIGURA 10</u>	42
<u>FIGURA 11</u>	44

<u>FIGURA 12</u>	45
<u>FIGURA 13</u>	46
<u>FIGURA 14</u>	46
<u>FIGURA 15</u>	47
<u>FIGURA 16</u>	48
<u>FIGURA 17</u>	49
<u>FIGURA 18</u>	50
<u>FIGURA 19</u>	51
<u>FIGURA 20</u>	52
<u>FIGURA 21</u>	53
<u>FIGURA 22</u>	54
<u>CUADRO 1</u>	4
<u>CUADRO 2</u>	24
<u>CUADRO 3</u>	28
<u>CUADRO 4</u>	29
<u>CUADRO 5</u>	38
<u>CUADRO 6</u>	38
<u>CUADRO 7</u>	39
<u>CUADRO 8</u>	39
<u>CUADRO 9</u>	41
<u>CUADRO 10</u>	41
<u>CUADRO 11</u>	55
<u>CUADRO 12</u>	56

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
DC	Distemper canino
DEPC	Dietil pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfoxido
F	Proteína de fusión
g	Gramos
G	Gravedades
H	Proteína hemaglutinina
HLA	Hidrolizado de lactoalbúmina
kg	Kilogramo
L	Litro
LCR	Líquido ceforraquídeo
m	Minuto
M	Proteína de matriz
MDCK	Línea celular de riñón de perro; (<i>Madin-Darby canine kidney</i>)
MEM	Medio Minimo Esencial; (<i>Minimum essential Medium</i>)
mg	Miligramo
µg	Microgramo
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II: (Major histocompatibility complex II)
mL	Mililitro
µl	Microlitro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramo
nm	Nanometros
NP	Nucleoproteína
ODE	Encefalitis del perro viejo
P	Fosfoproteína
PBS	Solución amortiguadora de Fosfatos

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, (Polimerase Chain Reaction)
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (Reverse transcription – polymerase chain reaction)
s	Segundo
SLAM	Molécula de señalización de activación de linfocitos; (Signaling lymphocyte activation molecule)
SNC	Sistema nervioso central
SSPE	Panencefalitis Esclerosante
TNF α	Factor de necrosis tumoral <i>alfa</i>
U	Unidades
Vero	Línea celular de riñón de mono verde africano
VDC	Virus de Distemper canino
VS	Virus de sarampión

RESUMEN

NUNCIO LIMÓN MÓNICA IVONNE. USO DE LA TÉCNICA DE RT-PCR Y SECUENCIACIÓN PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO VACUNAL EN MUESTRAS CLÍNICAS. (Bajo la dirección de la Dra. Laura Cobos Marín, Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara).

En los últimos años se han hecho reportes a nivel mundial sobre la presentación de cuadros clínicos de Distemper Canino postvacunal en animales. Tomando como base estos reportes y que en las pruebas de diagnóstico convencionales no es posible diferenciar al virus de campo del vacunal, se implementó la prueba de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para diferenciar cepas de este virus a partir de muestras clínicas de perros con Distemper canino postvacunal. Se diseñaron los iniciadores tomando como base un fragmento de 756 pb de las secuencias reportadas en el Gene Bank del gen de la nucleoproteína de las cepas Lederle, Onderstepoort, Rockborn así como una cepa *Wild type*. Se utilizaron como testigos positivos de prueba las cepas antes mencionadas en cultivo puro y que fueron donadas por diversas empresas productoras de vacunas. Como muestra testigo de extracción de ARN se utilizó la amplificación del gen de la Beta actina. Se trabajaron muestras previamente positivas por inmunofluorescencia, de éstas 29 eran de sangre, 2 de encéfalo y 2 de linfonodo; 12 resultaron positivas por RT-PCR. A la fecha se han obtenido 13 secuenciaciones de los productos amplificados y que han sido comparados mediante el sistema BLAST del NCBI, los cuales corresponden a las siguientes cepas: 1 testigo con el 95% de homología con la cepa Lederle, otro tiene 99% de homología con la cepa Onderstepoort. El amplificado obtenido de una muestra de encéfalo y la muestra 2583 obtuvieron 97% de homología con un virus de Distemper canino aislado en China; la muestra 133 presento un 90% de homología con la cepa Shuskiy secuenciada en Kazakhstan, las muestras 160 y el aislamiento Adulto tuvieron un 100% de homología con un aislado de Guadalajara; las muestras 182 y 2568 obtuvieron un 98% y 100% respectivamente con un aislado del Estado de México; la muestra 1455 obtuvo un 92 % de homología con un aislado de USA; Uno de los testigos de Lederle presentó dos bandas, una de 756 pb que correspondió a la secuencia esperada y otra banda de 1000 pb que en la secuenciación tuvo una homología del 99% con *Mycoplasma arginini*. Con los resultados obtenidos de la secuenciación se observó que ninguna muestra coincide con cepas vacunales; además la prueba de RT-PCR y la secuenciación pueden ser utilizadas como pruebas de identidad y pureza en la constatación de biológicos y en el control de calidad de vacunas.

1. INTRODUCCIÓN

El moquillo canino también conocido como Distemper canino (DC), enfermedad de Carré o hard pad, es una enfermedad viral multisistémica grave. Se caracteriza por diversos signos que incluyen: fiebre ondulante (de allí el nombre Distemper), signos respiratorios, intestinales y trastornos neurológicos.¹

La infección por virus de Distemper canino (VDC) es una de las principales causas de muerte en perros domésticos y una de las principales amenazas para la conservación de especies silvestres en peligro de extinción. Se presenta principalmente en cachorros, animales seniles e individuos inmunocomprometidos. Es considerada una de las enfermedades de mayor trascendencia y de gran interés veterinario.^{2,3}

Debido a su distribución global, el virus representa un desafío para la medicina de pequeños animales y los programas de preservación de especies silvestres. Se sabe que las vacunas para el control del DC son de virus vivo atenuado o modificado y que además son vacunas de los tipos polivalentes o combinados con otros antígenos. Dentro de las desventajas de estos inmunógenos, se pueden citar: que las vacunas polivalentes proporcionan una limitada protección y su uso debe ser exclusivo en animales sanos, el riesgo del desarrollo de encefalitis postvacunal y la reversión a virulenta de las vacunas. Además, el VDC puede producir inmunosupresión por sí solo, y mezclado con otros antígenos los efectos sobre el sistema inmune (SI) suelen ser letales para el individuo inmunocomprometido. Muchas de las desventajas antes mencionadas, aunque son de gran importancia, suelen ser ignoradas en la práctica clínica.⁴

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Se menciona que la enfermedad se originó en España en el siglo XVIII. La primera vez que se describió fue en 1748 por Antonio de Ulloa en su trabajo “Relación histórica del viaje a la América meridional”⁵.

Fue hasta 1809 cuando el DC fue descrito por Edward Jenner, que basó sus observaciones en perros con signología grave de la enfermedad, y realizó una descripción muy amplia acerca de los signos y lesiones que causaba. Por otra parte, intentó establecer una línea diagnóstica entre el DC y la hidrofobia, concluyendo que no contaba con los antecedentes necesarios que le permitieran entregar un concepto definitivo⁶.

En 1923 Laidlaw y Dunkin trabajaron en la preparación de una vacuna para inmunizar contra DC, utilizan tejido de SNC de perro, inactivado con formalina. Aun cuando sus resultados fueron dudosos acerca de la protección contra la enfermedad.^{7,8,9} Es a ellos a quienes se les atribuye los primeros trabajos en la realización de una vacuna contra el DC.

1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO

El virus de Distemper canino (VDC) es un virus envuelto de tipo ARN de cadena sencilla polar negativa, de simetría helicoidal con un tamaño de entre 150 y 300 nm de diámetro. Presenta una envoltura lipoproteica con proyecciones que corresponden a las glicoproteínas. Pertenece al orden de los *Mononegavirales* de la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Paramixovirinae*, género *Morbillivirus* (Véase Cuadro 1).

Orden	<i>Mononegavirales</i>
Familia Genero	<i>Bornaviridae</i> <i>Bornavirus</i>
Familia Genero	<i>Rabdoviridae</i> <i>Vesiculovirus</i> <i>Lissavirus</i> <i>Efimerovirus</i> <i>Novirabdovirus</i> <i>Citorabdovirus</i> <i>Nucleorabdovirus</i>
Familia Genero	<i>Filoviridae</i> <i>Marburvirus</i> <i>Ebolavirus</i>
Familia Subfamilia Genero	<i>Paramixoviridae</i> <i>Paramixovirinae</i> <i>Rubulavirus</i> <i>Avulavirus</i> <i>Respirovirus</i> <i>Henipavirus</i> <i>Morbillivirus</i>
Subfamilia Genero	<i>Neumovirinae</i> <i>Neumovirus</i> <i>Metaneumovirus</i>

Cuadro 1. Organización Taxonómica del orden de los *Mononegavirales*.
Tomado y modificado del Virus Taxonomy ICTV, octavo reporte Elsevier 2005.

Hasta la fecha, el género de los *Morbillivirus* de la familia *Paramixoviridae* se compone de seis miembros establecidos: el virus de Distemper canino (VDC), virus del sarampión (VS), que afecta principalmente a niños y produce enfermedades crónicas en los adultos humanos como la panencefalitis esclerosante (SSPE), esclerosis múltiple y enfermedad de Paget, el *Morbillivirus* de los cetáceos que afecta a delfines, marsopas y ballenas^{10, 11}, el *Morbillivirus* de las focas o fócidos^{12,13,14}, responsable de la muerte de 23,000 focas en Europa en 1988 y 30,000 en el año 2000 respectivamente¹⁵. Se reporta también el virus de la

peste de los pequeños rumiantes que afecta a caprinos y ovinos^{16,17} y el virus de la peste bovina o Rinderpest que afecta bovinos, búfalos domésticos y algunas especies silvestres de pezuña hendida¹⁸ el cual fue erradicado en el año 2011¹⁹.

Las especies del género *Morbillivirus* poseen características biológicas desarrolladas en la infección *in vitro* como es la formación de sincitios y lisis celular.^{20, 21, 22} En específico el DC está relacionado estrechamente con el virus de sarampión en un 75-80% de su genoma²³.

Tiene una amplia variedad de huéspedes entre los que se encuentran los siguientes: canidos (perros, lobos, zorro, coyotes)^{24, 25, 26}, mustélidos (hurones, martas, minks, mofetas, tejones)^{27, 28, 29}, prociónidos (mapaches, coatíes), ailúridos (pandas menores y gigantes),³⁰ ursidos (osos),^{31, 32, 33} félidos (leones, tigres, leopardos, lince),^{34, 35, 36, 37, 38, 39} mamíferos marinos,^{40, 41, 42} se mencionan también casos en la hiena manchada⁴³ y en monos infectados de forma natural.^{44,}

45

Se reconocen al menos siete linajes a nivel mundial basándose en la Hemaglutinina (H) viral, proteína mas variable entre los Morbillivirus, estos son: América -1(cepas vacunales), América- 2, Asia-1, Asia-2, cepas Articas, cepas Europeas y cepas Europeas de fauna silvestre^{46, 47}

1.3 ORGANIZACIÓN GENOMICA

El genoma del VDC está compuesto por 15,690 pb,⁴⁸ codificando en dirección 3'-5'. Comprenden seis genes en el siguiente orden: Nucleoproteína- Fosfoproteína V/C- Matriz- Fusión- Hemaglutinina- Proteína Grande (**Ver Figura 1**).

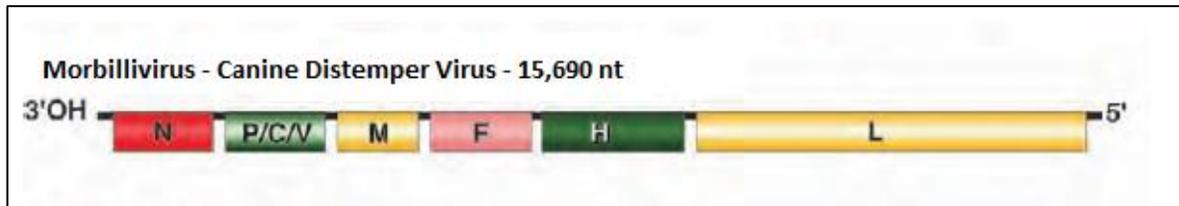


Figura 1. Organización del Genoma del virus de Distemper canino. Tomada y modificada del ICTV, octavo reporte Elsevier 2005.

La Nucleoproteína (NP), está constituida por 1,572 pb y se encarga de envolver y proteger el genoma.

La Fosfoproteína (P) es fosforilada, es conservada entre los Morbillivirus, está asociada con la Nucleoproteína y la Proteína Grande en la nucleocápside. En conjunto con la proteína Grande (L) forma un complejo ribonucleoproteico con actividad de polimerasa que sirve para la transcripción y la replicación del genoma viral.⁴⁹ Tiene un tamaño de 1,524 pb, codifica en las primeras 500 a 1,000 pb de su extremo 5' el gen C y gen V de las proteínas C y V, respectivamente, de las cuales su función está íntimamente relacionada con la replicación y actividad la inmunosupresora del virus.⁵⁰

La Proteína de Matriz (M) es el tercer gen transcrito, constituido por 1,008 pb. Se encuentra debajo de la bicapa lipídica y sirve como un enlace entre la nucleocápside y las dos glicoproteínas de la superficie (H y F), forma parte de la

membrana interna, posee la característica de ser hidrófoba. Desempeña una función importante durante la maduración del virus⁵¹.

El gen de la proteína de Fusión (F) está constituido por 1,989 pb, proteína estructural y glicoproteína de la envoltura, involucrada en la unión del virus con la membrana plasmática de la célula. Es altamente conservada entre los morbillivirus, y la protección cruzada observada entre los virus del grupo puede ser debido a esta región.⁵²

El gen de la Hemaglutinina (H) es el más variable de los morbillivirus,⁵³ y está constituido por 1,815 pb. La proteína se caracteriza por ser glicosilada y altamente relacionada con la virulencia y la inmunosupresión que inducen los Morbillivirus. En un reporte se realizó una modificación en los sitios N-glicosilación logrando niveles de expresión reducidos de esta proteína y conservó totalmente su funcionalidad, contribuyendo a la atenuación de la virulencia sin afectar la inmunosupresión⁵⁴.

La proteína Grande (L) está constituida por 6,555 pb, su gen es el último en transcribirse, en asociación con la NP y la P y el ARN genómico forman la nucleocapside, y es la proteína que tiene la actividad de la polimerasa de ARN.⁵⁵ **(Ver figura 2)**

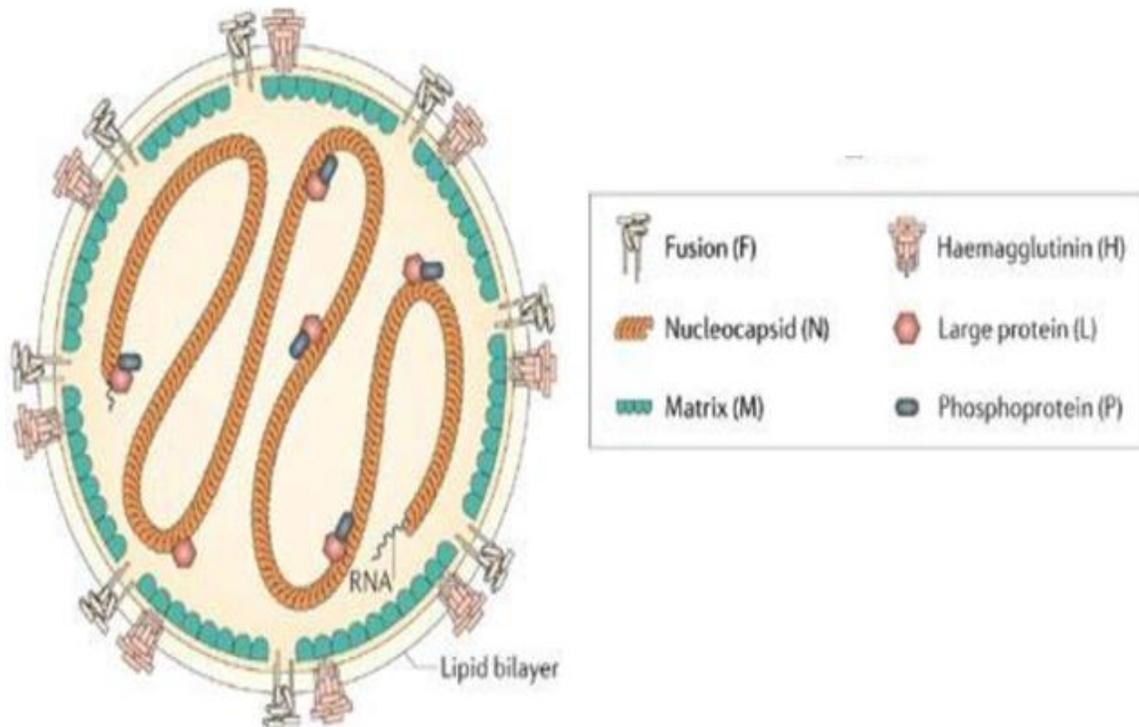


Figura 2. Esquematización de la estructura del VDC. Tomada y modificada de Nature Reviews Microbiology 2006

1.4 REPLICACIÓN

La replicación es a nivel citoplasmático, dependiente de la hemaglutinina (H) viral, glicoproteína de la envoltura lipídica que reconoce y se une al receptor linfocitario CD150/SLAM.²⁰ La unión de esta molécula podría explicar el linfotropismo e inmunosupresión natural de los Morbillivirus.

Inmediatamente después actúa la proteína de Fusión (F), generando la fusión del VDC con la membrana plasmática del huésped y libera el material genético viral al citoplasma. Estas dos proteínas son el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes sintetizados por el SI del hospedero⁵⁶

El material genético viral es liberado en el citoplasma de la célula donde se llevará a cabo la replicación, es en este punto donde se utiliza como hebra molde la

Nucleoproteína (NP). El ARN tiene sentido negativo y debe de ser transcrito a un ARNm de sentido positivo complementario antes de que las proteínas puedan ser sintetizadas, las cadenas recién sintetizadas pueden servir a su vez como plantillas para la duplicación del material genético, para la transcripción.

La proteína Grande (L) sirve como co-factor a la NP para ayudar a catalizar la síntesis del genoma, y en compañía de la Fosfoproteína forman el complejo de la polimerasa. La secuencia guía 3' del ARN, provee el punto de entrada para la ARN polimerasa dependiente de ARN, dando como resultado un ARN monocistrónico unido al extremo 5' y con el extremo 3' poliadenilado por el complejo de la polimerasa. Posteriormente se detiene la polimerasa y se reinicia la síntesis de ARNm de cada gen hasta completar la longitud del genoma. Las subsecuentes síntesis de cadenas de sentido negativo y positivo dependerán de la disponibilidad de la NP. Además, la traducción de los transcritos primarios, permite la acumulación de las proteínas virales y funciona como interruptor de la transcripción.⁴⁹

Posteriormente se da el ensamblaje viral, interviniendo la NP y la proteína de Matriz, proteína asociada a la envoltura, y por su característica hidrofóbica, se encuentra en la superficie interna de la membrana del virión. Se conoce que la expresión restringida o nula de las proteínas M y F puede ocasionar bajos niveles de antígeno viral, lo que le facilita la persistencia del VDC, siendo la panencefalitis esclerosante subaguda una infección persistente ocasionada por este virus.^{57, 58,}

⁵⁹ **(Ver figura 3)**

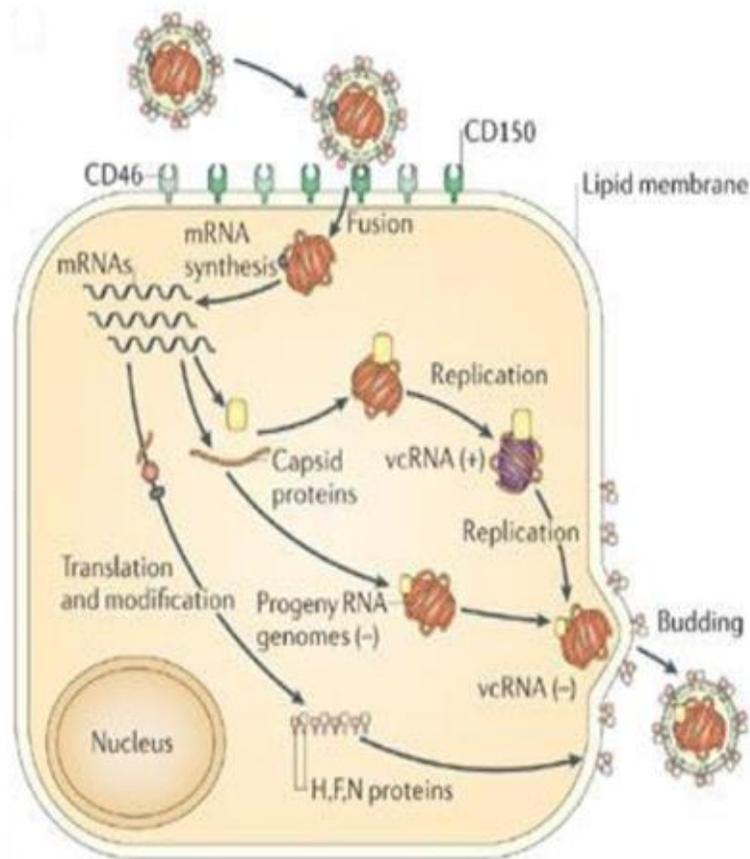


Figura 3. Esquemización del ciclo de replicación. Tomada de Nature Reviews Microbiology 2006.

1.5 PATOGENIA E INTERACCIONES TEMPRANAS CON EL SISTEMA INMUNE

El periodo de incubación es de 7 a 14 días, las vías de ingreso del virus son: la aerógena, la ocular-respiratoria y la oral. Se transmite a través de aerosoles y fomites por medio de los cuales alcanza superficies mucosas, estableciendo la primera interacción con el sistema inmune del hospedero mediante la infección temprana de linfocitos mononucleares CD150+. En el transcurso de las siguientes 24 horas postinfección (PI) el virus se multiplica en los macrófagos tisulares y se disemina en estas células a través de los linfocitos locales a las amígdalas y los linfonodos bronquiales. La infección es dependiente de la H viral, glicoproteína de

la envoltura lipídica que reconoce y se une al receptor linfocitario CD/150 SLAM,^{53,}
⁶⁰ presente en distintas poblaciones celulares. La amplia distribución de este receptor en poblaciones linfocitarias activas explica el linfotropismo del virus y la relevancia de la H en la virulencia y citopatogenicidad del VDC.

En este punto el virus despliega una serie de mecanismos rápidos que permiten neutralizar y evadir la respuesta inmune antiviral innata y adaptativa⁶¹. Éstos se describen a continuación:

Al infectar las células inmunes, el virus asegura por un lado: la síntesis del ARNm y una replicación intracitoplásmica efectiva formando un complejo ribonucleico que evita el reconocimiento de intermediarios de ARN de doble hebra por parte de TLR-3 (Toll Like Receptor- 3) y de esta forma inhibe las vías de activación del factor de transcripción NF-KB (Nuclear Factor- Kappa B) responsable de activar la expresión de citocinas proinflamatorias, quimiocinas, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos⁶². Por otro lado, la utilización de células del sistema inmune como vehículo de transporte a los nódulos linfáticos regionales.

Alrededor de dos a cuatro días PI, aumenta el número de virus en amígdalas y linfonodos retro faríngeos y bronquiales, pero en otros órganos linfáticos se encuentran cifras bajas de células mononucleadas infectadas con VDC⁶³. Es en este momento que se establece la viremia primaria.

Hacia los días cuatro a seis PI ocurre la multiplicación del virus dentro de folículos linfoides del bazo, lámina propia del estómago, intestino delgado, linfonodos mesentéricos y las células de Kupffer del hígado.⁶⁴ Es a partir de este momento que pueden presentarse signos gastrointestinales y respiratorios como tos,

diarrea, vómitos, anorexia, deshidratación y pérdida de peso, siendo las infecciones secundarias las que a complican la enfermedad. El virus comienza a ser eliminado por todas las excreciones del cuerpo, incluso en perros con infección subclínica.

La proliferación amplia del virus en órganos linfoides produce el aumento inicial de la temperatura corporal y leucopenia; la elevación de la temperatura coincide con la aparición de interferón circulante. La patogenia es influenciada adicionalmente por dos productos del ciclo replicativo viral, que derivan del gen P: las proteínas V y C. La primera actúa inhibiendo las vías de señalización intracelulares involucradas en la síntesis de interferones tipo I ($\text{IFN}\alpha$ y β), citocinas proinflamatorias ($\text{TNF}\alpha$ e IL-6), expresión de proteínas antivirales y citocinas, así como en la síntesis de citocinas del perfil Th1 y Th2 (IL-2 e IL-4) siendo de esta manera un determinante de virulencia esencial en la invasión del hospedero.^{50, 65} De esta forma es posible explicar la inhibición de la secreción de ($\text{IFN}\gamma$) en linfocitos Th1 y células NK y consecuentemente la interferencia de la respuesta inmune antiviral.⁶⁶ La proteína C corresponde a un factor de infectividad que asegura el ensamble y liberación de partículas virales estables, sustentado fases tardías del cuadro multisistémico, mecanismo que ha sido mejor estudiado en el virus de sarampión.^{67,68, 69}

Mediante estos fenómenos el virus utiliza células inmunes para viajar a órganos linfáticos secundarios como pulpa blanca del bazo, nódulos linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas (tonsilas y placas de Peyer) sitios de replicación preferencial del virus antes del establecimiento de la viremia secundaria⁶¹. Es en

estos órganos donde el virus, a través de la unión a CD150, ejerce un agotamiento selectivo de linfocitos CD4+ Th1 mediante un proceso apoptótico,^{70,71} afectando también la actividad proliferativa de células B y T involucradas en la respuesta inmune (Th1) durante las primeras 72 horas PI.⁷²

Lo anterior explica la severa leucopenia descrita entre el primer y séptimo día PI, con una disminución de hasta el 80% de las células mononucleares periféricas y un alto porcentaje de linfocitos T y B infectados (40-60%).⁷³

Se ha mencionado que la infección de tonsilas y placas de Peyer es uno de los eventos claves en el compromiso de la respuesta inmune de mucosas mediada por IgA, facilitando el ingreso de patógenos oportunistas.⁶¹

La fiebre y la leucopenia casi siempre pasan inadvertidas, la rápida y masiva replicación viral en linfocitos prepara la invasión sistémica a través de la viremia secundaria asociada a células, que se caracteriza por altos títulos virales y el inicio del cuadro clínico. En este punto el sulfato de heparina⁷⁴ presente en la superficie de células epiteliales y no inmunes actúa como receptor para la hemaglutinina, sustentando de esta manera la diseminación epiteliopanátrópica propia de la fase más tardía de la infección,⁷⁵ donde el comportamiento de la enfermedad dependerá completamente de la respuesta inmunológica del individuo. Se describe que aproximadamente un 30% de los animales que desarrollan un cuadro multisistémico presentan algún grado de compromiso neurológico y que de ellos un 10% muere de encefalitis aguda⁷³.

La presentación de la enfermedad varía de individuo a individuo, y dependerá, tanto de la cepa viral como del nivel de respuesta inmune generado. La respuesta inmune suele desarrollarse a los 14 días PI y puede ser de tres formas:

- Existe un nivel adecuado de anticuerpos contra las glicoproteínas de la envoltura viral H y F,⁷⁶ y una adecuada citotoxicidad mediada por células. Lo anterior permite la eliminación del virus en la mayor parte de los tejidos y los animales no muestran signos clínicos.⁷⁷
- Si la respuesta inmunitaria es deficiente, es decir hay títulos bajos de anticuerpos y una pobre citotoxicidad celular, el virus se disemina hacia todos los tejidos, los signos son graves y el virus persiste en los tejidos hasta la muerte.⁶³
- En animales con una respuesta inmune intermedia, se puede desarrollar una enfermedad moderada o silenciosa, en la que el virus persiste en pulmones, tejido uveal, neuronas y cojinetes plantares.⁷⁸

Finalmente, se puede presentar la recuperación completa acompañada por un proceso de inmunidad prolongada y el cese de la excreción del virus. Sin embargo, pueden permanecer algunas secuelas neurológicas como temblores, mioclonos y ataxia, si la infección es persistente en el SNC.

Vías de entrada del virus al SNC, se explican dos teorías:⁷³

- Vía clásica o hematogena. Las células infectadas se detectan por primera vez en el plexo coroideo y en estrecha relación con los vasos sanguíneos cerebrales. Una vez que está en contacto con el líquido cerebroespinal puede invadir las membranas que rodean al SNC, el epéndimo y el

revestimiento superficial de la corteza cerebral, seguido por la infección de las neuronas y células de la glía.⁷⁹ Algo importante de mencionar es que, la llegada del virus al SNC a través de la barrera hematoencefálica ocurre en un escenario de severa inmunosupresión y aunado a la presencia de citocinas que aumentan la permeabilidad de dicha barrera, como lo son: IL-6, IL-1 β y TNF α .⁸⁰

- Vía anterógrada o por bulbo olfatorio. Algunas cepas durante la invasión masiva de la mucosa respiratoria y de sus células epiteliales infectan neuronas receptoras cercanas y mediante sinapsis neuronales alcanzan el bulbo olfatorio. Esto ocurre hacia el día 21 PI, lugar donde comienza el proceso patológico, diseminándose luego al resto del SNC.⁷³

Alrededor del día 28 PI, la enfermedad se acompaña con la presencia de virus libre en el fluido cerebroespinal, por lo cual se explican los grandes focos de desmielinización ubicados bajo la piamadre en capas subyacentes del cuarto ventrículo, la corteza cerebral y cerebelar. Las placas desmielinizantes aparecen alrededor de la tercera semana PI, algunos perros desarrollan una encefalomiелitis desmielinizante, caracterizada por un inicio gradual o abrupto de severos signos neurológicos incluyendo temblores, espasmos, paresia, parálisis y convulsiones. Estos signos pueden aparecer semanas o meses después de la recuperación de la enfermedad generalizada.

Se reconocen dos tipos de enfermedad crónica en perros adultos que se desarrollan sin ningún tipo de enfermedad clínica precedente en perros de edad y vacunados. Una descrita como encefalitis del perro viejo,^{81, 82} caracterizada por ser

un desorden progresivo que afecta usualmente a los perros mayores de 6 años, que 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 SNC produce una reacción inflamatoria, con una encefalitis crónica. Estos animales no transmiten la infección, pero su recuperación es muy difícil y por su similitud con la esclerosis múltiple en el humano, el perro ha sido modelo de estudio al inducirle las desmielinizaciones con cepas de VDC^{83, 84}. La otra manifestación se presenta a consecuencia de un proceso inmunomediado producida por una encefalitis multifocal que progresa lentamente y se menciona que el mayor daño ocasionado en el SNC se debe a citotoxicidad. Esta forma ocurre en perros de 4 a 8 años, se presenta con debilidad de los miembros posteriores, falta de respuesta a la amenaza, parálisis y temblores de la cabeza⁸⁵. **(Ver figura 4)**

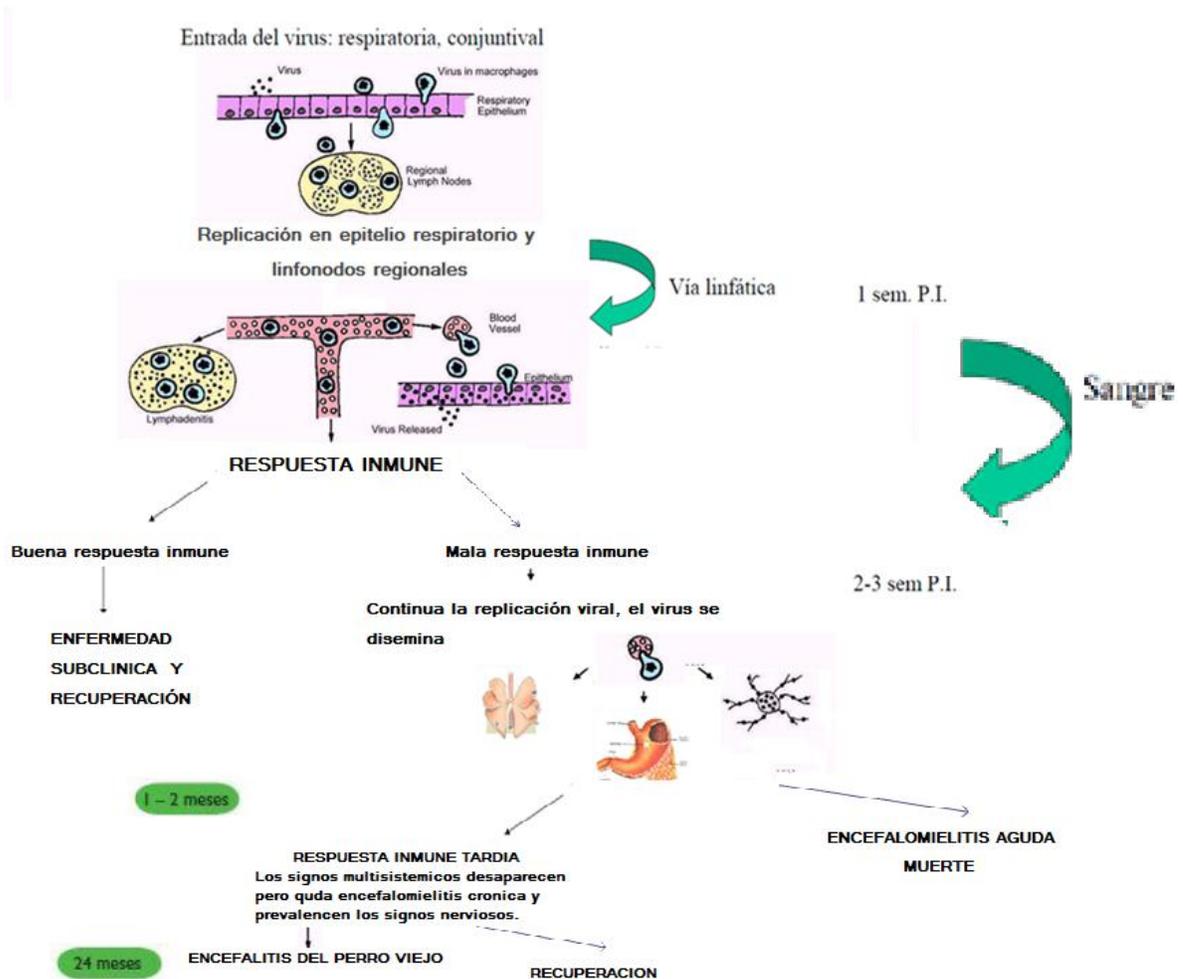


Figura 4. Esquema de la patogenia del Virus de Distemper Canino. Tomado y modificado de Céspedes et al 2010 y Berrios et al 2005.

1.6 SIGNOS CLINICOS

Los signos clínicos varían de acuerdo con la virulencia del virus, las condiciones ambientales, edad del receptor y estado inmunológico. La presentación de la enfermedad suele ser de manera multisistémica encontrando al examen físico: deshidratación, indiferencia, emaciación, aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, fiebre, vómito, diarrea en ocasiones con sangre y moco, tenesmo, rinitis mucopurulenta, tos seca que en poco tiempo se convierte en productiva, aumento de los sonidos respiratorios anormales, hiperqueratosis nasal y digital⁸⁶.

Si los fetos se infectan durante la gestación, en general desarrollan signos neurológicos durante las primeras 4 a 6 semanas de vida. Se pueden observar abortos, mortinatos y nacimientos de cachorros débiles, según el estado de infección durante la gestación. Los perros con infección prenatal o neonatal que sobreviven suelen sufrir inmunodeficiencias persistentes.⁶³

Los signos neurológicos con frecuencia se inician 1 a 3 semanas después de la recuperación de la enfermedad sistémica. Los perros maduros y parcialmente inmunes pueden desarrollar signos neurológicos sin antecedentes de enfermedad sistémica. Dentro de los signos neurológicos se encuentran: incoordinación mioclonos, sialorrea, ataxia, convulsiones, tetraparesis o tetraplejía y déficit de propiocepción, micción y defecación involuntaria.⁸⁷ Dependiendo de la severidad de la infección, todos o ninguno de los signos neurológicos pueden ser evidentes. Después de la recuperación del distemper agudo o de una presentación inaparente, los trastornos neurológicos pueden tardar en presentarse algunas semanas o hasta meses, o no presentarse.

1.7 LESIONES

Las lesiones sistémicas que suelen encontrarse son: infección de vías respiratorias altas, neumonía intersticial difusa, cardiomiopatía, osteodistrofia hipertrófica, atrofia del timo, artritis en perros adultos, cambios degenerativos en epitelio respiratorio, gastrointestinal, vejiga urinaria, hiperqueratosis nasal y digital, cuerpos de inclusión intranucleares e intracitoplasmáticos eosinofílicos.^{78, 88, 89, 90}

La distribución de las lesiones en SNC pueden ser focales, multifocales y difusas, presentándose: degeneración neuronal, leptomeningitis no supurativa,

desmielinización y cuerpos de inclusión principalmente en células de la glía; las lesiones se distribuyen en tallo cerebral, hemisferios cerebrales y médula espinal.^{91, 92}

También se ha asociado el VDC a las lesiones en la enfermedad de Paget al detectarse el ARN del VDC dentro de las células de los huesos de perros con osteopatía metafisaria.⁹³

1.8 DIAGNÓSTICO

Entre las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la enfermedad se encuentran:

- Aislamiento viral: Método de gran sensibilidad para algunos agentes virales, consiste en poner en contacto el material sospechoso con cultivos celulares susceptibles, para que el virus se multiplique y pueda detectarse su presencia por efecto citopático (ECP) u otros métodos (inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, hemoadsorción, etc.) Se considera como el diagnóstico definitivo. Además, es recomendable hacer la caracterización del virus y la cepa. El aislamiento se realiza mediante cultivo celular para lo cual se utilizan diversas líneas como la MDCK y VERO.^{94, 95, 96} En éstas se espera ver el efecto citopático (muerte celular, desprendimientos en placas y formación de sincitios).
- Histopatología: Esta prueba se realiza postmortem, lo cual impide su uso con fines de diagnóstico oportuno. Se deben analizar muestras de bazo, amígdalas, ganglios linfáticos, estómago, duodeno, vejiga y cerebro y las lesiones que se buscan son cuerpos de inclusión intranucleares e

intracitoplasmáticos eosinofílicos (cuerpos de Lenz), que indican sitios de replicación del virus^{97, 98}.

- ELISA: La detección de anticuerpos por sí misma, no es suficiente para el diagnóstico. Esta prueba se realiza mediante la detección de anticuerpos séricos IgM (contra las proteínas del núcleo viral NP y P) y las IgG (contra las proteínas capsulares H y F). La limitante de esta prueba es que no diferencia entre los anticuerpos maternos residuales, los anticuerpos vacunales y los anticuerpos por la infección. Además de que puede haber perros infectados de forma aguda que mueren sin seroconvertir.⁹⁹
- Inmunofluorescencia: esta prueba se realiza en perros con signología clínica, las muestras que comúnmente se utilizan son frotis citológicos de conjuntiva y frotis de sangre. Se usan anticuerpos antidistemper (policlonales o monoclonales marcados con fluoresceína). Es una prueba rápida de realizar y entre las desventajas que tiene es la intervención de un Técnico con experiencia para la interpretación de los resultados.
- Transcripción Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR): técnica molecular que permite identificar el ácido nucleico de las estructuras de los microorganismos, en este caso del VDC. Detecta porciones específicas de material genético del virus, tiene un alto grado de sensibilidad, cosa que depende del tipo y calidad de la muestra, el método de extracción y la elección de los iniciadores. Se utilizan una amplia variedad de muestras.^{100, 101}

1.9 TERAPÉUTICA

El DC es un virus ubicuo cuya infección es de elevada morbilidad y mortalidad. Debido a la inexistencia de protocolos estandarizados y antivirales específicos, es difícil lograr la sobrevida de los animales enfermos en ausencia de secuelas severas.

La terapia puede ser diversa y debe de ir enfocada a la presentación de los signos y características de cada individuo. Ésta se debe de dirigir principalmente a controlar las infecciones oportunistas. Es recomendable el uso de antibióticos de amplio espectro como ampicilina o amoxicilina de 20 mg/kg por vía oral o parenteral, cada 8 horas por 7 días. Además de utilizar expectorantes, nebulizaciones, antieméticos y terapia de líquidos según el estado de hidratación del animal. Para tratar las convulsiones, el tratamiento varía de acuerdo al paciente. Entre los medicamentos que se pueden utilizar se encuentran: fenobarbital, diacepam, bromuro de potasio.

Se deben de incluir antioxidantes, vitamina E, vitaminas del complejo B, vitamina A, probióticos, inhibidores de NF- κ B o bloqueantes de su unión a ADN como N-acetil-cisteína (NAC)¹⁰² en asociación a un antiviral (azatioprina o ribavirina); la azatioprina ha sido utilizada experimentalmente desde 2006 en el tratamiento de esta virosis logrando limitar el progreso del cuadro multisistémico, aumentar la sobrevida y disminuir la presentación del cuadro neurológico. Sin embargo, si se utiliza de manera inadecuada produce severas complicaciones como trombocitopenia (en dosis mayores de 1mg/kg al día), además de que su principal uso es como inmunosupresor y aun está limitado como antiviral para esta enfermedad. En un estudio realizado por Elia y colaboradores en 2008, se observó

una inhibición de la replicación viral en células VERO y obtuvieron como resultado que la ribavirina actúa sobre el VDC al utilizarla en muy bajas concentraciones.¹⁰³

El IFN- γ corresponde a una citocina con funciones esenciales en la restricción de la replicación y diseminación multisistémica de agentes virales, mientras coordina la actividad de linfocitos Th1 y citotóxicos.¹⁰⁴ Su uso debe restringirse a animales expuestos con riesgo de enfermar ya que sólo es efectivo durante etapas tempranas de la infección.

El uso de la vitamina C debe restringirse por su capacidad de promover daño inmunomediado al potenciar la respuesta Th1 durante la activación de células T,¹⁰⁵ a diferencia la vitamina A que fue capaz de disminuir la severidad del cuadro clínico y aumentar la sobrevivencia de hurones infectados experimentalmente.¹⁰⁶

1.10 VACUNAS

En México, varios laboratorios elaboran vacunas para la inmunización en perros; éstas son muy similares en formulación y presentación pero varían de acuerdo al número de antígenos que las componen. Los agentes contra los que se desea inmunizar pueden consistir en antígenos activos, atenuados o muertos, la elección entre antígenos vivos o muertos dependerá del tipo de respuesta que se ha de inducir,¹⁰⁷ antecedentes inmunológicos (presencia de anticuerpos maternos, vacunaciones anteriores) y edad del animal.

Comercialmente encontramos vacunas de tipo monovalente y polivalente, es decir que el número de antígenos que pueden contener las vacunas varía desde 2 hasta 8 antígenos. En el caso particular de inmunógenos contra DC, es importante mencionar que comercialmente no hay ninguna vacuna contra el VDC de tipo

monovalente y esto es un problema ya que el VDC por sí solo causa una inmunosupresión y una combinación de VDC con adenovirus tipo 1 y tipo 2 puede inducir una supresión del recuento del linfocitos en sangre.¹⁰⁸

Las vacunas vivas atenuadas se han utilizado por muchos años para el control de la enfermedad, pero éstas no están completamente libres de problemas. La producción de las vacunas para el VDC es de dos tipos: una se produce en células de aves (cepas Onderstepoort y Lederle) y la otra en células de riñón de perro (Rockborn).¹⁰⁹ Una de las desventajas de las vacunas es que no pueden ser utilizadas en todas las especies a las que afecta el VDC. Las vacunas producidas en células de aves causan enfermedad en el visón,¹¹⁰ mientras que la vacuna producida con células de riñón de perro causa la enfermedad en los hurones,¹¹¹ zorros y en el panda menor,¹¹² también es importante mencionar que la carga viral en vacunas múltiples es menor que en las vacunas simples por lo cual baja la potencia de acción de esta.

En México las vacunas para el VDC, son de virus activo modificado polivalentes, las cepas vacunales que se utilizan son la Onderstepoort, Lederle, Snnyder Hill, Rockborn; y algunos laboratorios no mencionan el tipo de cepa que utilizan (**Ver Cuadro 2**).

NOMBRE	COMPOSICION	CEPA DE VDC	LABORATORIO
ADENOVAC®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Moquillo canino, Hepatitis Infecciosa, Leptospira.	Lederle	Chinoín
BAYOBAC® PROTECT	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Parvovirus, Adenovirus, Parainfluenza, Lepstospira.	Desconocida	Bayer
CANIGEN®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Parvovirus, Adenovirus, Parainfluenza, Leptospira.	Lederle	Virbac Salud Animal
CANOMUNE®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Hepatitis, Parvovirus, Adenovirus, Parainfluenza.	Lederle Rockborn	Holland de México
PUPPY PET GUARD®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Parvovirus.	Buzzell	Pet-guard de México
DURAMUNE MAX®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Parvovirus, Hepatitis infecciosa, Adenovirus, Parainfluenza y leptospira.	Desconocida	Pfizer Salud Animal
VANGUARD ®	Vacuna múltiple activa modificada *Distemper, Adenovirus, Parainfluenza, Parvovirus, Leptospira.	Snyder Hill	
NOVIBAC®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Distemper, Parvovirus, Adenovirus, Parainfluenza y Leptospira.	Onderstepoort	Intervet Schering-Plough Animal Health
QUANTUM DOG®	Virus activo modificado *Distemper, Adenovirus tipo 1 y 2, Parainfluenza canina Bacterina *Leptospira	Desconocida	
POLIVAC CAN®	Vacuna múltiple de virus activo modificado *Hepatitis, Adenovirus, Coronavirus, Parvovirus, Distemper.	Snyder Hill	Laboratorios Pier
RECOMBITEK®	Vacuna múltiple con genes de: *Distemper, Adenovirus, Parvovirus, Coronavirus, leptospira	Distemper canino recombinante vector canarypox	Merial
VACUNA PUPPY FENCE®	Vacuna múltiple activa modificada *Parvovirus, Distemper, Adenovirus tipo 2, Hepatitis infecciosa, Lepstospira	Rockborn	BIOZOO

Cuadro 2. Vacunas fabricadas en México. Se muestra el nombre de la vacuna, su composición, cepa de VDC que contiene, y laboratorio fabricante. Tomado de Prontuario de Especialidades Veterinarias 2012

2. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que las vacunas contra el virus de moquillo canino pueden producir encefalitis cuando se realiza la vacunación a edad temprana en la camada, cuando se utiliza virus activo y son aplicadas en las tres primeras semanas de vida o cuando se vacuna a la madre durante la lactancia. En casos atípicos se llega a presentar moquillo por vacunación en animales seniles. Asimismo, puede ocurrir la infección natural en la hembra gestante o sus cachorros y causar la signología clínica. Además, existen reportes de animales vacunados^{113, 114, 115, 116}(principalmente fauna silvestre) que presentan el cuadro clínico de la enfermedad y es difícil determinar si éste se debe a una infección o al propio virus vacunal. El conocer si un animal se infectó con virus de campo o con virus vacunal ayudaría a hacer un diagnóstico mas certero de la enfermedad y a tener un conocimiento más amplio sobre su presentación, tanto en fauna silvestre como en perros domésticos, lo que daría una herramienta para la toma de decisiones sobre el tipo de vacuna que debe usarse y su correcta aplicación. Las pruebas diagnósticas convencionales no permiten diferenciar virus de campo y virus vacunal. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone la implementación de las pruebas de Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), junto con la secuenciación para poder identificar el origen del virus de moquillo canino a partir de muestras clínicas de animales con signología sugerente a la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

El uso de la RT-PCR y la secuenciación permitirá la identificación y diferenciación del virus vacunal y virus de campo en muestras clínicas de perros con un diagnóstico positivo a moquillo canino.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el ARN del VDC en muestras de perros con signología de la enfermedad y un diagnóstico positivo a moquillo, mediante la prueba de Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y posteriormente secuenciar y analizar los productos amplificados para determinar si el virus es de origen vacunal o de campo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar la técnica de RT-PCR, para amplificar un fragmento del gen de la nucleoproteína del VDC en muestras mediante la utilización de ARN viral con cepas vacunales de referencia, para utilizarlos como testigos positivos de la prueba.
2. Estandarizar la técnica de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la β -actina y usarlo como control interno de la prueba, empleando cultivos celulares sin infectar.
3. Utilizar la técnica de RT-PCR a partir del RNA obtenido directamente de muestras clínicas (aislamientos, sangre o tejidos) y de aislamientos de campo crecidos en células MDCK, para su posterior secuenciación.

4. Secuenciar los amplificadores obtenidos, tanto en las cepas vacunales de referencia como en los aislamientos de campo y muestras clínicas, para identificar las diferencias entre las cepas vacunales y de campo.

5. MATERIALES Y METODOS

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR

5.1 DISEÑO DE INICIADORES EN EL SOFTWARE VECTOR NTI ADVANCE 11.5

- **Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la β -actina de perro.**

Se diseñó un juego de iniciadores basados en el gen de la β - actina de perro, de acuerdo a la secuencia reportada de Canis familiaris beta actin, Genbank número de acceso U67202. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 170 pares de bases **Figura 5** y se muestran en el **Cuadro 3**:

SENTIDO	No. DE PARES DE BASES	SECUENCIA
FORWARD	20 pb	5'GTGTGACGTTGACATCCGCA 3'
REVERSE	20 pb	5'TCCACACAGAGTACTTGCGC 3'

Cuadro 3. Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la β -actina. Se muestran los dos iniciadores con sus respectivos números de pares de bases y secuencias.

1	CCATCATGAA	GTGTGACGTT	GACATCCGCA	AGGACCTCTA	TGCCAACACA	GTGCTGTCTG	GTGGAACCAC	CATGTACCCT	GGCATCGCTG	ACAGGATGCA
	GGTAGTACTT	CACACTGCAA	CTGTAGGCGT	TCTTGGAGAT	ACGGTTGTGT	CACGACAGAC	CACCTTGGTG	GTACATGGGA	CCGTAGCGAC	TGTCCTACGT
101	GAAGGAGATC	ACTGCCCTGG	CACCCAGCAC	AATGAAGATC	AAGATCATCG	CACCCCTGTA	GGCCTAAGTAC	TCTGTGTGGA	TT	
	CTTCCTCTAG	TGACGGGACC	GTGGGTCGTG	TTACTTCTAG	TTCTAGTAGC	GTTGGGGACT	CGCGTTCATG	AGACACACCT	AA	

Figura 5. Secuencia del gen de la β -actina de perro. Se señalan en los iniciadores diseñados, y en el fragmento del gen que amplifican.

- **Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la Nucleoproteína del VDC**

Se realizó el diseño de los iniciadores con el software Vector NTI Advanced basándose en las secuencias homólogas de la Nucleoproteína (NP) del VDC cepa Lederle (Genbank N° de acceso EF418783.1), VDC cepa Onderstepoort (Genbank N° de acceso AF305419.1), VDC cepa A75-17 Wild Type (Genbank N° de acceso AF164967.1). Estos iniciadores son pequeñas secuencias de ADN conservadas en el virus de Distemper canino y de los Morbillivirus. Dichos iniciadores se muestran en el **Cuadro 4** y amplifican un fragmento de 756 pb del gen de la Nucleoproteína. (**Figuras 6, 7 y 8**)

SENTIDO	NO. DE PARES DE BASES	SECUENCIA DEL INICIADOR
FORWARD	20 pb	5´ TTCAAGAGGACTCGGGACCA 3´
REVERSE	24 pb	5´ CACAATGTAGTTATCTATATCACA 3´

Cuadro 4. Iniciadores para amplificar un fragmento del gen de la Nucleoproteína. Se muestran los dos iniciadores con sus respectivos números de pares de bases y secuencias.

Secuencias del gen de la NP de los VDC. Se señalan los iniciadores diseñados para el virus  y el fragmento del gen que amplifica 

1	TTCAGACCTA	CCAATATGTC	TAGCCTTCTT	AAAAGCCTCA	CACTG	TTCAA	GAGGACTCGG	GACCA	ACCCC	CTCTTGCCIC	TGGCTCCGGG	GGAGCAATAA
101	GAGGAATAAA	GCAATGTCAT	ATAGTCTTAA	TCCCAGGTTGA	TTCAGCAGAT	GTACAGAGAT	CTCGACTATT	GGATAGACTT	GTAGGTTGG	TCGGTATCC		
201	AGAAATCAAC	GGCCCTAAAT	TAAGTGGGAT	CTTAATCAGT	ATCCCTCCTT	TGTTCTGTTGA	ATCCCTTGA	CAGTTGATCC	AGAGGATCAT	AGACGACCCCT		
301	GATGTAAGCA	TCAAGTTAGT	AGAGGTAATA	CCAAGCATCA	ACTCTGTTTG	CGGTCTTACA	TTTGCATCCA	GAGGAGCAAG	TCTGATTCT	GAGGCAGATG		
401	AGTTCCTCAA	AATTGTAGAC	GAAGGTCGA	AGCTCAAGG	GCAATTAGGC	TGGTTGGAGA	ATAAGGATAT	AGTAGACATA	GAAGTTGATG	ATGCTGAGCA		
501	ATTCAATATA	TACTAGCTT	CCATCTTGGC	TCAAATTGG	ATCCCTGCTAG	CTAAAGCGGT	GACTGCTCCT	GATACTGCAG	CCGACTCGGA	GATGAGAAGG		
601	TGGATTAAGT	ATACCCAGCA	AAGACGTGTG	GTCCGAGAAT	TTAGAATGAA	CAAAATCTGG	CTTGATATTG	TTAGAAACAG	GATTGCTGAG	GACCTATCTT		
701	TGAGGCGATT	CATGGTGGCA	CTCATTTTGG	ACATCAAAG	ATCCCCAGGG	AACAAGCCTA	GAATTGCTGA	AATGATT	TGT	GATATAGATA	ACTACATTGT	
801	TGAAGCTGGG	TTAGCTAGTT	TCATCTTAAC	TATCAAGTIT	GGCATTGAAA	CTATGATACC	GGCTCTTGGG	TTCCATGAGT	TTTCCGGAGA	ATTAACAAC		
901	ATTGAATCCC	TCATGATGCT	ATATCAACAG	ATGGGTGAAA	CAGCACCATA	CATGGTTATC	TTGAAAAC	TTCCATGAGT	TTTCCGGAGA	ATTAACAAC		
1001	ACCCATTGCT	CTGGAGTTAT	GCTATGGGGG	TTGGTGTGA	ACTTGAAAAC	TCATGGGAG	GATTAATAAT	CGGTGATCT	TACTTTGACC	CAGCCTACTT		
1101	CAGACTCGGG	CAAGAAATGG	TTAGACGATC	TGCCGGCAAA	GTAAGCTCCG	CACCTGTGTC	CGAGCTTGGC	ATCACCAGG	AGGAAGCTCA	GCTGGTGTCA		
1201	GAATAGCAT	CAAAGCAAC	AGAGGACCGG	ACGATTGAG	CTACTGGTCC	CAAGCAATCC	CAAATTACCT	TCTGCACTC	GGAAAGATCC	GAAGTCGTA		
1301	ATCAACAACC	CCGACCATC	AACAAGAGGT	CCGAAAACCA	GGGAGGAGAC	AGATACCCCA	TTCATTCAG	TGATGAAAGG	CCCTCAGGGC	ACACCCGATA		
1401	CGTCAACAGC	TCTGAACGGA	GTGAGCCAGC	CCACGACACC	CAAATTATCC	AAGATGATGG	AAATGATGAT	GACCGGAAAT	CGATGGAAGC	AATCGCCAAG		
1501	ATGAGGATGC	TACTAAGAT	GCTCAGTCAA	CCTGGGACCA	GTGAAGATAG	TTCTCCTGTT	TATAATGATA	GAGAGCTACT	CAATTAATA	TTCAGACCA		
1601	GTCCTGCATC	AGTCAACAAT	TATCATTCTA	AACCTATTAT	AAAAAACTA	GGACCCAGGT	CCAACAAACC	CGATCAACCA	TTCATCCGAC	CACCCGTCTT		
1701	ATCCCTA											

Figura 6. Secuencia del gen de la NP del VDC cepa Lederle (Genbank EF418783.1)

1	ATGGCTAGCC	TTCTTAAAG	CCTCACACTG	TTCAAGAGGA	CTCGGGACCA	ACCCCTCTT	GCCTCTGGCT	CCGGGGAGC	AATAAGAGGA	ATAAAGCATG		
101	TCATTATAGT	CCTAATCCCG	GGTATTCAA	GCATTGTAC	AAGATCTCGA	CTATTGGATA	GACTTGTAG	GTGGTTGGT	GATCCAAAA	TCAACGCCCC		
201	TAAATTAAC	GGATCTTAA	TCAGTATCCT	CTCCTTGT	GTGGAAATCC	CTGGACAGT	GATCCAGAGG	ATCATAGACG	ACCCTGATG	AAGCATCAAG		
301	TTAGTAGAGG	TAATACCAAG	CATCAACTCT	GCTTGGGTC	TTACATTTC	ATCCAGAGGA	GCAAGTCTGG	ATCTGAGGC	AGATGAGTTC	TTCAAAATTG		
401	TAGACGAAGG	GTGAAAAGCT	CAAGGCAAT	TAGGCTGTT	AGAGAAATAG	GATATAGTAG	ACATAGAAGT	TGATATGCT	GAGCAATTC	ATATATTGCT		
501	AGCTTCCATC	TTGGCTCAA	TTGGATCCT	GCTAGTAAA	CGGTGACTG	CTCCTGATG	TGCAGCCGAC	TCGGAGATGA	GAAGTGGAT	TAAGTATACC		
601	CAGCAAAGC	GTGGGTCGG	AGAATTAGA	ATGAACAAA	TCTGGCTGA	TATTGTAGA	AACAGGATTG	CTGAGGACCT	AICTTTGAGG	CGATTATGG		
701	TGGCGTCTAT	CTGGACATC	AAACGATCCC	CAGGGAACAA	GCCTAGAATT	GCTGAAATGA	TTGTGATAT	AGATAACTAC	ATTGTGGAAG	CTGGGTTAGC		
801	TAGTTTCATC	CTAATATCA	AGTTTGGCAT	TGAAACTATG	TATCCGGCTC	TTGGGTTGCA	TGAGTTTCC	GGAAATATA	CAACTATTGA	ATCCCTCATG		
901	ATGCTATATC	AACAGATGGG	TGAAACAGCA	CGTACATGG	TTAICTTGA	AAACTCTGT	CAAAACAAT	TTAGTGCAGG	GICCTACCCA	TTGCTCTGGA		
1001	GTTAIGCTAT	GGGGTGGT	GTTGAACITG	AAAACCTCAT	GGGAGGGTIA	AAITTCGGTC	GATCTTACTT	TGACCCAGCT	TACTTCAGAC	TCGGGCRAGA		
1101	AATGGTTAGG	AGATCTGCGG	GCAAAGTAA	CTCTGCACTT	GCCCGGAGC	TTGSCATCC	CAAGGAGGAA	GCTCAGTAGT	TGTCAGAAAT	AGCATCCAAG		
1201	ACAACAGAGG	ACCAGCAAT	TCGAGTACT	GGTCTAAGC	AATCCCAAT	CACITTTCTG	CACTCGGAAA	GATCCGAGT	CGCCATCAA	CAACCCCAA		
1301	CCATCAACAA	GAGTCCGAA	AACCAGGGAG	GAGACAAATA	CCCATCTAC	TTCAAGTACG	AAAGGCTTCC	AGGTATATCC	CCAGATGCA	ACAGTTCTGA		
1401	ATGGAGTGA	TCACGCTATG	ACACCCAAAT	TATCCAAGAT	GATGGAAATG	ACGATGATCG	GAATCGATG	GAAGCAATCG	CCAAGATGAG	GATGCTTACT		
1501	AAGATGCTCA	GTCAACCTGG	GACCAAGTGA	GATAATCTC	CTGTTTATA	TGATAAAGAG	CTACTCAATT	AA				

Figura 7. Secuencia del gen de la NP del VDC cepa Onderstepoort (Genbank AF305419.1)

1	AGGGTCAATG	ATCCTACTT	AGAGAACAAG	GTCAGGGTTC	AGACCTACCA	ATATGGCTAG	CCTTCTTAA	AGCCTACAT	TATTCAAAG	GACTCGGGAC		
101	CAACCCCCAC	TGGCTCGGG	CTCCGAGGA	GCAATCAGAG	GGATAAAGCA	TGTCATTATA	GTCTAATCC	CGGGTACTC	AAGCATTGTT	ACAAGATCTC		
201	GACTATTGGA	TAGACTTGT	AGATTGGTCG	GATATCCGGA	AATCAACGGG	CCTAAATTA	CTGGGATTT	AATCAGTATC	CTCTCCTTGT	TCGTGGAATC		
301	CCCTGGACAG	TTGATCCAGA	GGATCATAGA	CGACCCGTAT	ATAAGCATCA	AGTTAGTAGA	GGTAATCCCA	AGCATCAACT	CTGTTGCGG	TCTTACATT		
401	GCATCCAGAG	GAGCAAGTTT	GGATTCTGAG	GCAGATGAGT	TCTTCAAAT	TGTAGACGAA	GGTCCGAAAG	CTCAAGGACA	ATTAGGCTGG	TTGGAGAATA		
501	AGGATATTGT	AGACATAGAA	GTTGATGATG	CTGAGCAATT	CAATATATTG	CTAGCTTCCA	TCTTGGCCCA	AATTGGATC	CTGCTCGCTA	AAGCAGTGAC		
601	TGCTCCTGAT	ACTGACCGG	ACTCGGAGAT	GAGAAGGTGG	ATTAAGTATA	CCCAACAGAG	ACGTGTGGTC	GGGAATTCA	GAATGAACAA	AATATGGCTT		
701	GATATTGTTA	GAAACAGAA	TGCTGAGGAC	TTATCTTTGA	GGCGGTTTAT	GGTGGCACTC	ATCTTGGATA	TCAAACGATC	CCGAGGGAAC	AAGCCTAGAA		
801	TTGCTGAAAT	GATTGTGAT	ATAGATAACT	ACATTGTGGA	AGCTGGATTA	GCTAGTTTCA	TCTTAACTAT	CAAAITTTGGC	ATTGAAACTA	TGTATCCGGC		
901	TCTTGGGTTG	CATGAGTTTT	CCGGAGAGTT	AACAACATTT	GAATCCCTTA	TGATGCTATA	TCAACAGATG	GGTGAACAG	CACCGTACAT	GGTATTCTG		
1001	GAAAATTCTG	TTGAGAACAA	ATTAGTGTCA	GGATCCCTACC	CATTGTCTCG	GAGTTATGCT	ATGGGAGTTG	GTGTGAACT	TGAAAACCTC	ATGGGAGGGT		
1101	TAAATTTCCG	TAGATCTTAC	TTTATCCAG	CTTATTTCCAG	GCTCGGGCAA	GAAATGGTTA	GAAGATCTGC	CGGCAAGTA	AGCTCTGCAC	TTGCCGCCGA		
1201	GCTTGGCATC	ACCAAGGAAG	AGGCTCAACT	AGTGTCAAG	ATAGCATCCA	AGACAACGGA	GGACCGGACG	ATTCGCGCTG	CTGGTCCCAA	GCAATCTCAA		
1301	ATCACTTTTC	TGCACTCAGA	AAGATCCGAA	GTCACTAATC	AACAACCCCC	AACCATCAAC	ARGAGGTCGG	AAAACCAAGG	AGGAGACAAA	TACCCATCC		
1401	ACTTCAGTGA	TGAACGGTTT	CCAGGGTATA	CCCAGATGT	CAACAGTCC	GAATGGAGTG	AATCAGGCTA	TGATACCCAA	ACTATTCAAG	ATGATGAAAA		
1501	CGACGATGAC	CGAAATCGA	TGGAAAGCAAT	CGCCAAGATG	AGAATGCTTA	CTAAGATGCT	CAGTCAACCT	GGACCCAGTG	AAGAGAGTTC	TCCTGTCTAT		
1601	AATGATAGAG	AGTACTCAAA	TAAATATTTC	AAGACCAAGT	TTACATCAGT	CAACAATTTCT	CCTTCTAAAC	TCATTATAAA	AAA			

Figura 8. Secuencia del gen de la NP del VDC Cepa A75-17 Wild Type (Genbank AF164967.1)

5.2 MUESTRAS PARA ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR.

Cepas de referencia del virus de Distemper canino.

Se utilizaron como referencia del VDC dos cepas vacunales Lederle y una Onderstepoort propagadas en la línea celular MDCK^a, para la obtención del ARN viral de cada una de ellas. Además, se utilizó la vacuna Nobivac DH Parvo-C^b (sin propagar en cultivo celular) que contiene virus de VDC cepa Onderstepoort, adenovirus canino tipo 2 cepa Manhattan LPV3 y parvovirus canino cepa 154.

Para corroborar que las cepas de referencia correspondían a al virus de DC se utilizó un juego de iniciadores que ya habían sido diseñados y utilizados previamente,¹¹⁷ que amplifican la región de la fosfoproteína, pero al ser esta una proteína más conservada no permite diferenciar entre cepas vacunales y de campo. Todas las cepas probadas con estos iniciadores amplificaron la región esperada. Posteriormente se procedió a la estandarización de los iniciadores diseñados en este trabajo.

5.3 PREPARACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Se utilizó la línea celular MDCK,¹¹⁸ las células fueron cultivadas en botellas de poliestireno^c con área de cultivo de 25cm². El manejo de los cultivos celulares se realizó en campana de flujo laminar^d.

Se utilizó MEM^e al 8 % de Suero Fetal Bovino (SFB) calificado^f, adicionado con Hidrolizado de Lactoalbumina^g al 0.5% y Glutamina^h al 1%.

^a Holland de México S.A de C.V

^b Intervet

^c Jet Biofil ®

^d Nuaire® Tipo II A/B3

Las células se mantuvieron a -70°C en ultracongelador hasta su utilización.

Para descongelar las células se calentó agua en un pequeño recipiente a 37°C en un horno de microondasⁱ, se procuró que la descongelación fuera lo más rápido posible para evitar la formación de cristales que maltrataran las células. Se centrifugaron^j a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C, para retirar el MEM con Dimetilsulfoxido^k (DMSO) que se utiliza como crio protector.

Se decantó y retiró el excedente de MEM, se agregó 0.5mL de SFB al vial para reconstituir la pastilla celular, y se transfirieron a la botella de cultivo. Se agregaron 10 mL de MEM suplementado y se colocó en la incubadora^l a 37°C por alrededor de 3 días hasta que se alcanzara un 90% de confluencia de cultivo celular. Posteriormente, pasados 3 días se procedió a dar pase a las células.

Se decantó y retiró el excedente de MEM, y se realizó un lavado con 1mL de PBS, se eliminó el contenido y agregaron 2 mL de tripsina^m al 0.05% con EDTA. Se colocó en la incubadora por un tiempo de 3 a 5 min, para desprender las células. Se procedió a colocar 1mL en tubos eppendorf de 1.5 mL y centrifugar a 2000 rpm por 10 min a 4°C.

Se decantó el contenido de los tubos centrifugados y se agregó 1 mL de MEM a cada tubo; se transfirieron 0.5 mL por botella (4 botellas en total).

^e Gibco Invitrogen®

^f Gibco Invitrogen®

^g SIGMA Cell Culture®

^h Gibco Invitrogen

ⁱ Goldstar

^j Eppendorf® Mod. 5416

^k J.T. Baker

^l Sanyo Scientific

^m Invitrogen®

Se agregaron 9.5 mL de MEM suplementado por botella y se pusieron a incubar a 37°C. Posteriormente los cultivos fueron utilizados para la extracción de ARN.

Una vez que las células alcanzaron su máxima confluencia, se les realizó la extracción de ARN para usarlo como control de β -actina y control negativo a VDC.

Para obtener los controles positivos se utilizaron células MDCK cultivadas de la misma manera descrita anteriormente, salvo que se realizó una infección en suspensión al momento de dar el pase celular, de la siguiente manera:

Se decantó y retiró el exceso de MEM, posteriormente se realizó un lavado con 2 mL de PBS, se decantó y se agregaron 2 mL de tripsina al 3%. Se incubó de 3 a 5 minutos a 37 °C dentro de la incubadora, para desprender las células. Se procedió a colocar el contenido de la botella de cultivo en un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó a 2000 rpm 10 minutos a 4°C.

Se decantó el contenido del tubo y se agregó 1 mL de MEM para re suspender la pastilla de células y se colocaron 0.5 mL por botella (2 botellas en total).

A cada botella se le agregaron 8.5 mL de MEM, se homogeneizaron y se agregó 1 mL de la cepa de referencia Lederle u Onderspeoort por botella. Se colocaron en la incubadora a 37°C. Se revisaron diariamente al microscopioⁿ hasta observar el efecto citopático, momento en el que se realizó la extracción del ARN.

5.4 MUESTRAS CLÍNICAS.

El material biológico utilizado para los experimentos fue: 29 muestras de sangre, 2 de encéfalo y 2 linfonodos mandibulares positivos a Moquillo mediante la prueba

ⁿ Olympus IX71

de IF directa. Estas fueron procesadas en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ-UNAM. Las muestras de sangre que llegaron para el diagnóstico venían en tubos con anticoagulante ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Una vez obtenido el resultado positivo a la IF, se procedió a recolectar las muestras y se mantuvieron en congelación a -70°C en ultracongelador^o hasta realizarse la extracción de ARN.

Las muestras de encéfalo que se obtuvieron provenían: una de un perro Maltes de aproximadamente 2 meses de edad, vacunado, con signos nerviosos, respiratorios, diarrea, e hiperqueratosis nasal y digital, y la otra de un perro Pastor Belga Mallinois, macho adulto que presentaba convulsiones y signos nerviosos. Ambas se procesaron directamente, como se describe más adelante en la sección: extracción de ARN.

Además, se utilizaron dos aislamientos de campo de perros que presentaron signología clínica de la enfermedad. Éstos se obtuvieron a partir de linfonodos mandibulares, de la siguiente forma:

Se utilizaron trozos de linfonodo de 2x2 cm aproximadamente, se cortaron en trozos pequeños y se molieron en mortero estéril. El macerado se suspendió 1/10 en MEM con antibióticos (100X) y se centrifugó a 3000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se agregó a las cajas de cultivo celular y se observaron diariamente, se hicieron 3 pases ciegos y fue hasta el último en el cual fue observado el efecto citopático. Se le realizó la prueba de IF y resultaron positivos por lo que se les mantuvo a -70°C hasta su posterior uso.

^o So- Low Ultra Low Freezer

5.5 EXTRACCIÓN DE ARN

Todas las extracciones de ARN se realizaron en campana de flujo laminar.

- **Preparación de las muestras.**
 - **Cultivo celular.** Se decantó el MEM y se agregaron 2.0 mL de Trizol^p por cada 25cm².
 - **Muestra de Encéfalo.** Se colocaron 100 mg de tejido en un tubo eppendorf y se le agregó 1 mL de Trizol, se mezcló en el homogenizador^q a alta velocidad por tiempo de 1 min.
 - **Muestras Sanguíneas.** Se colocó 1 mL de sangre en el tubo y se agregó 1 mL de agua destilada estéril fría, se agitó en el homogenizador por 1min, posteriormente la muestra se centrifugó en refrigeración a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Se decantó el tubo y se repitió este paso, al final de la centrifugación se agregaron 0.5 mL de Trizol.
- Posteriormente se procedió a la separación de las muestras agregando 200 µl de cloroformo, mezclando vigorosamente en el homogenizador, dejando incubar 5 min en hielo y procediendo a Centrifugar a 12 000 G, 20 min a 4°C.
- Terminada la Centrifugación se pasaron los sobrenadantes a tubos nuevos agregando 500 µl de Isopropanol mezclándose por inversión 7 veces. Se dejaron las muestras durante toda la noche a -20 °C, posteriormente se centrifugaron a 12,000 G por 20 minutos a 4°C.

^p Sigma ®

^q VM-1000 Vortex mixer

- Se decantaron los sobrenadantes y se agregó 1 mL de etanol al 75% con agua DEPC a cada muestra, se procedió a centrifugar las muestras 10 000 G por 15 minutos a 4°C.
- Las muestras se decantaron y se pusieron a secar las pastillas por alrededor de 10 minutos, para finalmente suspender las muestras deARN con 10 µl de agua DEPC, incubándose en baño María^r a 55- 60 °C por 10 min para una mejor solubilización.

5.6 CUANTIFICACIÓN DE ARN

La cuantificación del ARN fue realizada por espectrofotometría con el equipo Nano Drop^s, con la finalidad de determinar las concentraciones de ARN adecuadas para los ensayos.

^r Select Bio-Products®

^s Thermo Scientific®

5.7 RT- PCR

Se realizo en 2 pasos:

5.7.1 TRANSCRIPTASA REVERSA

Una vez cuantificado el ARN, se procedió a realizar la transcripción reversa para obtener ADNc. Los ensayos fueron realizados con una cantidad de 1µg de ARN por cada muestra clínica; una parte para la amplificación de un fragmento del gen de la β-actina y la otra para la amplificación de un fragmento del gen de la nucleoproteína del VDC.

Las muestras transcritas fueron: ARN de células MDCK infectadas (testigo positivo), y ARN de células sin infectar (testigo negativo) cuyo ADNc fue utilizado en los ensayos de PCR para la amplificación de productos de un fragmento del gen de la nucleoproteína del VDC, y del gen de la β-actina. Las mezclas de los reactivos fueron preparadas en campana de flujo laminar y su composición se encuentra especificada en el **Cuadro 5**.

Para la mezcla de reacción de la Transcriptasa Reversa de la hebra molde del gen de la Nucleoproteína se utilizó el iniciador Antisentido nombrado Oligo NP3´; y para la transcriptasa reversa del gen de la βeta Actina se utilizó Oligo DT^t

REACTIVO	LABORATORIO	CONCENTRACIÓN FINAL	µL
Buffer 10X	Omniscript RT Kit Qiagen®	1X	2
dNTP´s	Omniscript RT Kit Qiagen®	0.5mM	2
➤ Oligo NP3´	Invitrogen®	1µM	2

^t Qiagen®

➤ Oligo DT	Qiagen®		
Inhibidor de Rnasas	Invitrogen®	1 unidad	1
Transcriptasa Reversa	Omniscript RT Kit Qiagen®	4 unidades	1
ARN		1µg	1-10
Agua estéril		Cbp 20µl	

Cuadro 5. Mezcla de reactivos para la Transcripción Reversa. Se muestran los reactivos, laboratorios, concentraciones y cantidades utilizadas.

Una vez preparadas las reacciones se incubaron en el termociclador, donde se llevaron a cabo los ciclos necesarios para la transcripción de la hebra molde. El ciclo que se siguió fue el especificado en el **Cuadro 6**.

NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (min)	NÚMERO DE CICLOS
Transcriptasa reversa	37°C	60	1
Extensión final	65°C	10	1

Cuadro 6. Ciclo de la Transcriptasa Reversa. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

5.7.2 PCR PARA AMPLIFICAR UN FRAGMENTO DEL GEN DE LA β -ACTINA

Los iniciadores utilizados para amplificar el gen de la β -actina amplifican un fragmento de 170 pb y se muestra su secuencia específica en el **Cuadro 3**. Los ensayos se realizaron a partir de ADNc obtenido de la Transcriptasa Reversa (RT) de células MDCK (testigo positivo), ADNc de las muestras experimentales y se incluyó una reacción con agua como testigo negativo. Las mezclas fueron preparadas en una campana de flujo laminar y su composición se encuentra especificada en el **Cuadro 7**.

COMPONENTE	INICIAL	FINAL	μL	LABORATORIO
Amortiguador para PCR	10X	1X	2	Invitrogen®
MgCL ₂	50mM	2μM	0.8	Invitrogen®
dNTP's			0.4	Invitrogen®
Iniciador sentido	20μM	0.4μM	0.4	Invitrogen®
Iniciador antisentido	20μM	0.4μM	0.4	Invitrogen®
Taq polimerasa	5U	1U	0.2	Platinum Taq polimerasa Invitrogen®
ADNc			2	
Agua estéril cbp 20μl			13.8	

Cuadro 7. Mezcla de reactivos para amplificar un fragmento del gen de la β-actina mediante PCR. Se muestran los reactivos, concentraciones, cantidades utilizadas y laboratorio.

Una vez realizadas las mezclas de reacción, se colocaron en un termociclador^u. Los ciclos de amplificación fueron determinados con base en las temperaturas estimadas en el programa Vector NTI Advance y los parámetros de función de la enzima Taq polimerasa recombinante para su amplificación. Éstos se especifican en el **Cuadro 8** y son esquematizados en la **Figura 9**.

NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (min)	NUMERO DE CICLOS
Desnaturalización Inicial	94°C	1	1
Desnaturalización	94°C	1	35 ciclos
Alineamiento	53°C	1	
Extensión	72°C	1	
Extensión Final	72 °C	5	1

Cuadro 8. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento del gen de la β-actina. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

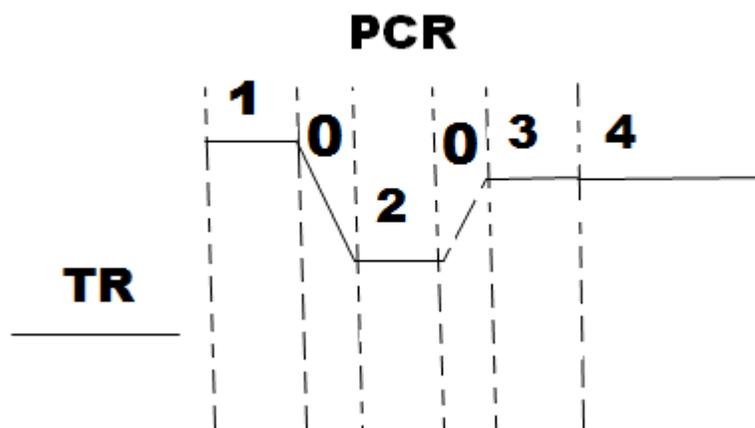


Figura 9. Esquematación de los ciclos de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la β -actina de perro. Donde TR representa a la transcripción reversa, PCR es la reacción en cadena de la polimerasa; 0 son las variaciones de temperatura, 1 es la desnaturalización inicial, 2 alineamiento, 3 extensión inicial y 4 extensión. Los pasos 1, 2 y 3 se repiten 35 ciclos.

Se amplificó un fragmento del gen de la NP del VDC, constituido por 756 pb, con base en regiones conservadas entre las distintas cepas del VDC¹¹⁹. Los iniciadores se muestran en el **Cuadro 4**. Los ensayos para la amplificar un fragmento del gen de la NP del VDC se realizaron a partir de ADNc de células MDCK infectadas con las cepas vacunales Lederle y Onderstepoort (testigos positivos), ANDc de las muestras experimentales y ADNc de células MDCK sin infectar (testigo negativo); dichas muestras se mezclaron con los reactivos necesarios, tal como se presenta en el **Cuadro 9**.

COMPONENTE	INICIAL	FINAL	μ L	LABORATORIO
Amortiguador para PCR	10X	1X	2	Invitrogen®
MgCL ₂	50mM	2 μ M	0.8	Invitrogen®
dNTP's			0.4	Invitrogen®
Iniciador sentido	20 μ M	0.4 μ M	0.4	Invitrogen®

Iniciador antisentido	20µM	0.4µM	0.4	Invitrogen®
Taq polimerasa	5U	1U	0.2	Platinum Taq polimerasa Invitrogen®
ADNc			2	
Agua estéril cbp 20µl			13.8	

Cuadro 9. Mezcla de reactivos para amplificar un fragmento del gen de la nucleoproteína mediante PCR. Se muestran los reactivos, concentraciones, cantidades utilizadas y laboratorio.

Las reacciones se colocaron en el termociclador. Los ciclos de amplificación fueron determinados con base en las temperaturas estimadas en el programa Vector NTI Advance, los cuales se muestran en el **Cuadro 10** y son esquematizados en la **Figura 10**.

NOMBRE DEL CICLO	TEMPERATURA	TIEMPO (min)	NUMERO DE CICLOS
Desnaturalización Inicial	94°C	1	1
Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C 48°C 72°C	1 1 1	35
Extensión Final	72 °C	5	1

Cuadro 10. Ciclos de la PCR para amplificar un fragmento de 756 pb del gen de la nucleoproteína del VDC. Se muestra el nombre del ciclo, la temperatura, el tiempo y el número de ciclos.

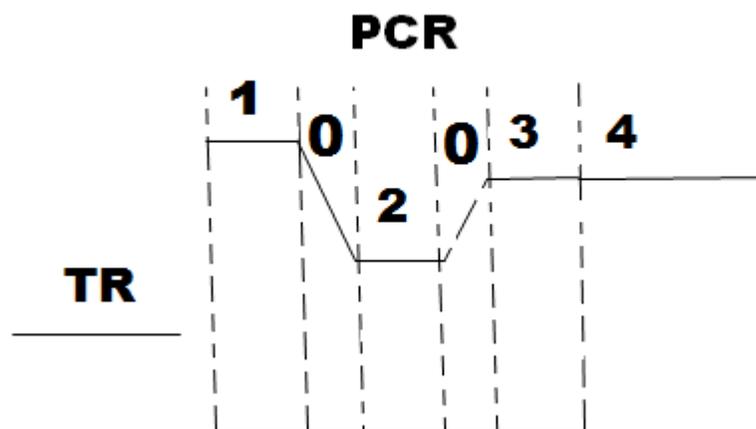


Figura 10. Esquemática de los ciclos de RT-PCR para amplificar un fragmento del gen de la Nucleoproteína del VDC. Donde TR representa a la transcripción inversa, PCR es la reacción en cadena de la polimerasa; 0 son las variaciones de temperatura, 1 es la desnaturalización inicial, 2 alineamiento, 3 extensión inicial y 4 extensión. Los pasos 1, 2 y 3 se repiten 35 ciclos.

5.8 VISUALIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS MEDIANTE RT-PCR.

La visualización de los productos de RT-PCR se llevó a cabo mediante electroforesis, para lo cual se utilizaron geles de agarosa al 1% en TAE. Las muestras se colocaron en el gel y se les aplicaron 70 Volts por 1 H con la fuente de poder. Posteriormente se tiñeron en una solución de Gel Red® Nucleic Acid Gel Stain^v a la 1X en agua destilada y se sumergieron por alrededor de 30 min. Una vez finalizada la tinción se utilizó la foto documentadora para obtener las imágenes de los geles.

^v Biotium

5.9 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

Para la secuenciación se utilizó el servicio ofrecido en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Las muestras se purificaron con un Kit comercial^w empleando las especificaciones del comerciante.

El análisis de la secuencias se llevó a cabo mediante el sistema BLAST del NCBI.¹¹⁹

^w QIAquick Gel Extraction Kit

6. RESULTADOS

6.1 INFORMACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se trabajaron un total de 33 muestras de las cuales 29 (88%) eran de sangre, 2 (6%) de encéfalo y 2 (6%) de linfonodos; de las cuales 12 fueron positivas al VDC por la RT-PCR y de éstas 9 (75%) fueron de sangre, 1 (8%) de encéfalo y 2 (17%) de Linfonodo. (Ver figura 11)

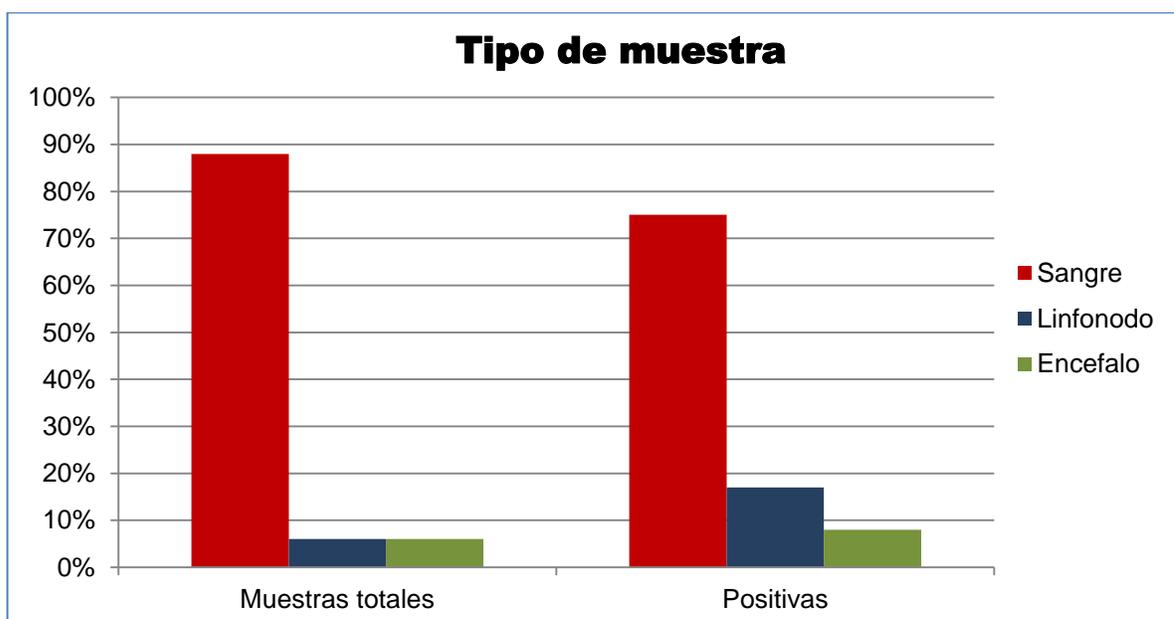


Figura 11. Tipo de muestras que se utilizaron totales y positivas por la RT-PCR

De las 33 muestras analizadas 19 (58%) eran machos y 14 (42%) eran hembras; y de las 12 muestras positivas 8 (67%) eran machos y 4 (33%) eran hembras. (Ver figura 12)

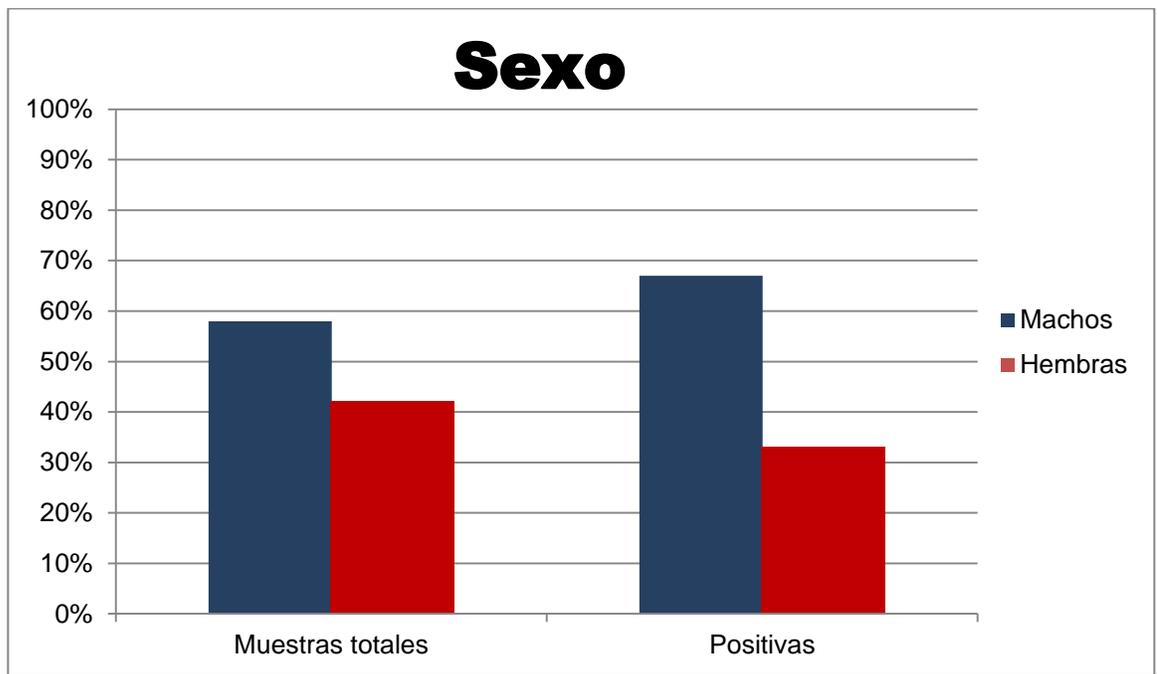


Figura 12. Relación machos y hembras

El rango de edad vario desde 1 mes hasta 7 años de edad con una edad promedio de 7 meses y medio. Se agruparon por edades en cachorros de 0 a 12 meses, adultos de 13 a 84 meses y un hubo otro grupo de animales en los que no proporcionaban este dato. **(Ver figura 19)**

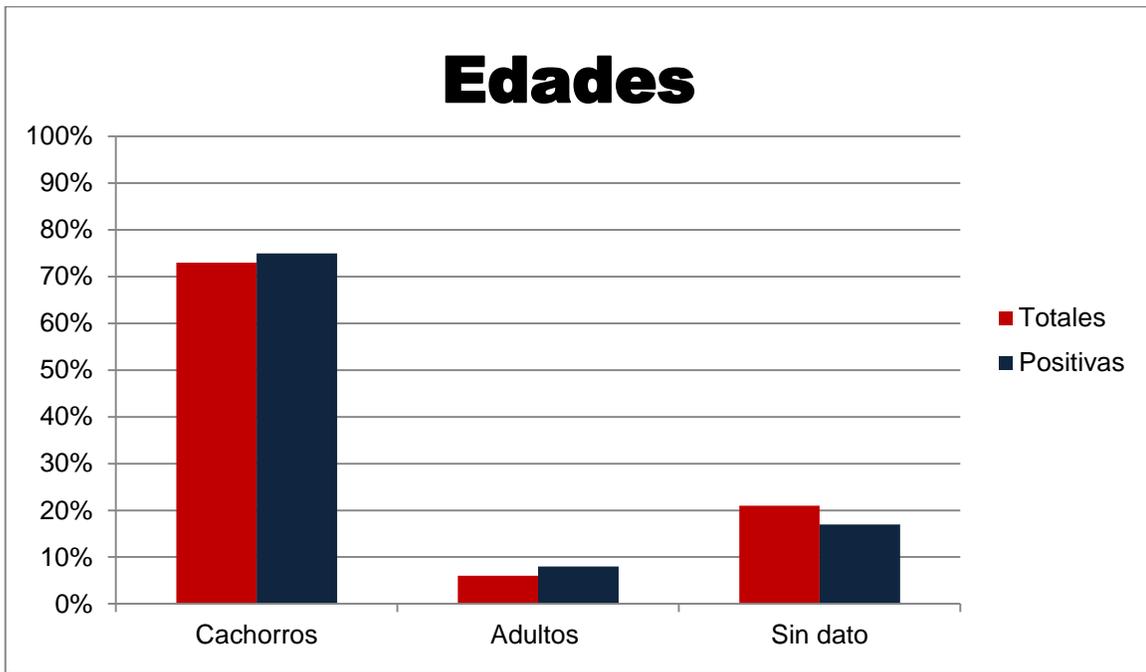


Figura 13. Distribución según la edad.

Solo en el 46% de las muestras el animal había sido vacunado, 27% no había sido vacunado y el 27% restante no proporcionó este dato, como se muestra en la **Figura 14.**



Figura 14. Estado de la vacunación.

De las 12 muestras positivas para la RT-PCR el estado de vacunación fue 50% animales vacunados, 33% no vacunados, 17% sin datos. Como se muestra en la figura 15.

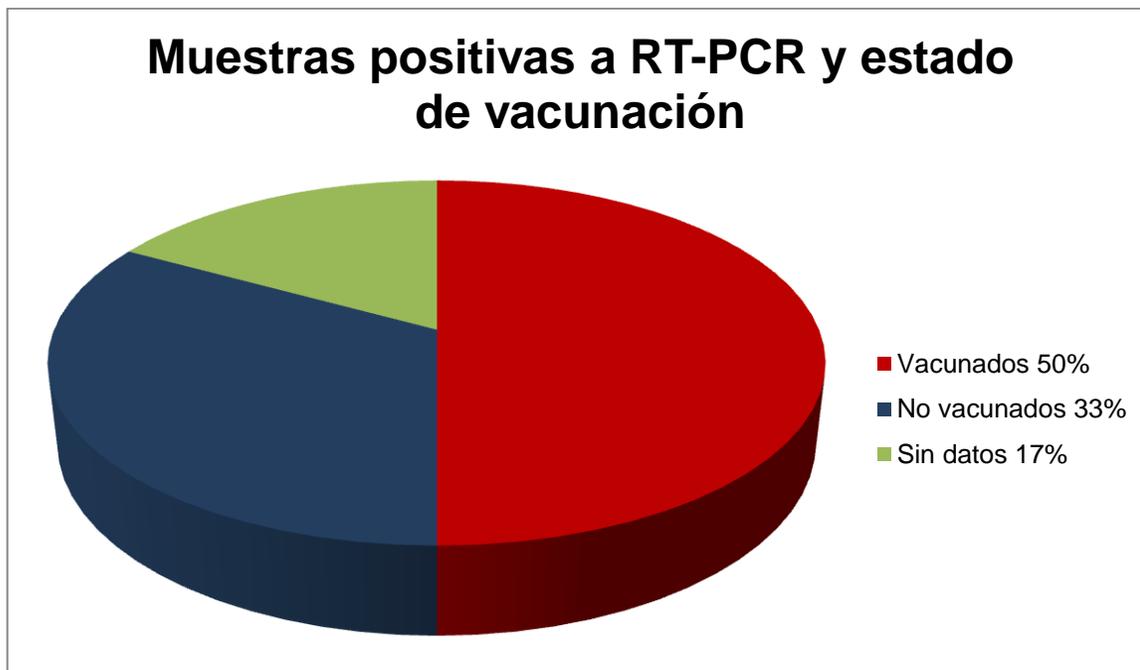


Figura 15. Estado de vacunación de acuerdo a las muestras positivas por la RT-PCR

Los signos clínicos reportados en las hojas de trabajo se clasificaron según el o los sistemas afectados como sigue: **(Ver figura 16)**

- Digestivos: vómito, diarrea.
- Respiratorio: Secreción nasal, tos, disnea.
- Neurológico: Incoordinación, convulsiones, paresis.
- Inespecífico: Anorexia, depresión fiebre, debilidad.

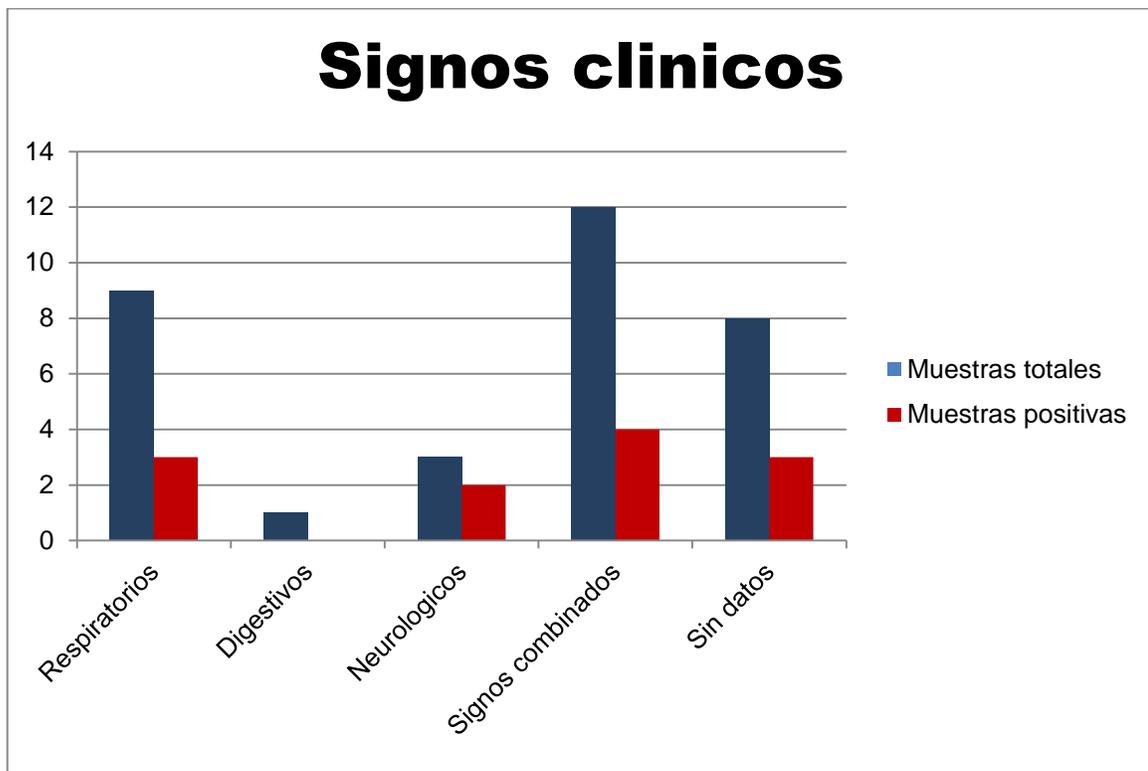


Figura 16. Signos clínicos reportados para las muestras totales y para las muestras positivas para la RT-PCR.

6.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR.

- **Preparación de cultivos celulares**

Se realizó el cultivo celular de las tres cepas de referencia y en todas se observó el efecto citopático. En la figura 11 se muestra un cultivo infectado con la cepa Lederle y otro con la Onderstepoort (**Figura 17**)

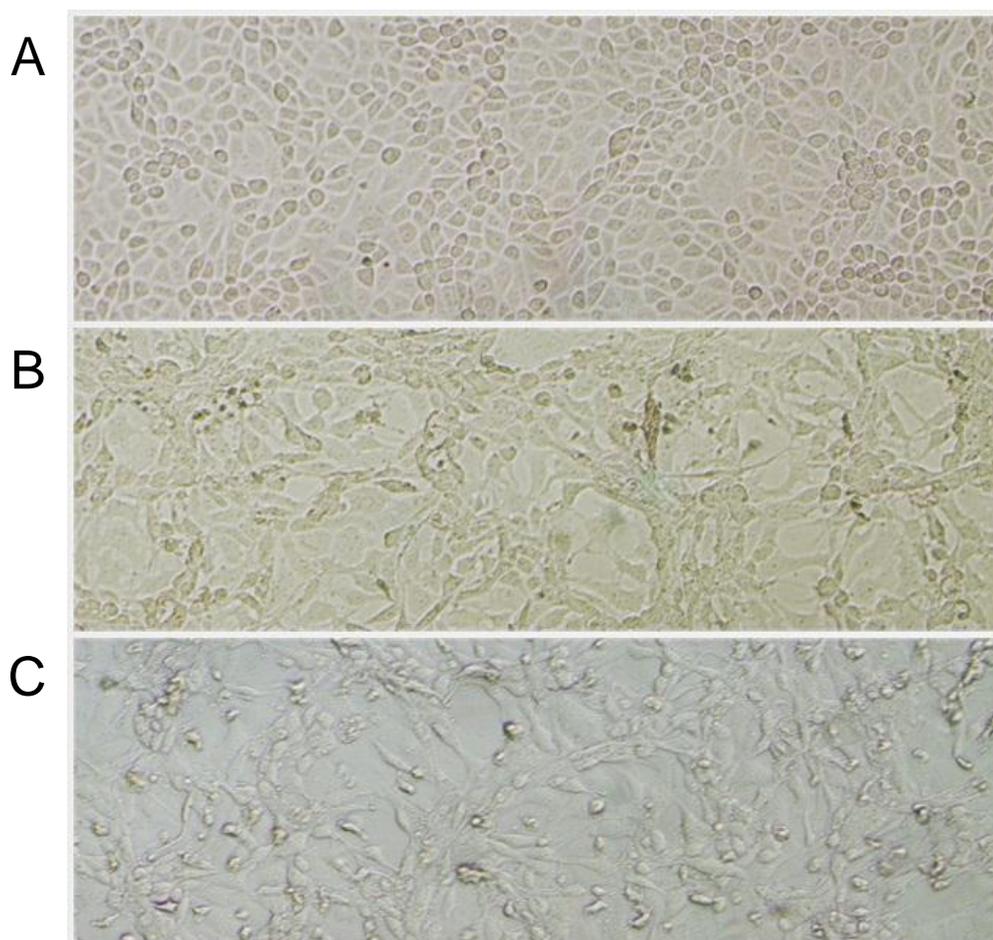


Figura 17. Cultivo de células MDCK. (A) Células MDCK testigo sin infectar. (B) Células MDCK infectadas con Virus de Distemper canino cepa Lederle 48 horas post Infección. (C) Células MDCK infectadas con Virus de Distemper canino cepa Onderstepoort 72 horas post infección. En las fotografía con las letras B y C puede observarse el efecto citopático (muerte celular y desprendimiento en placas). Objetivo 20X.

- RT-PCR

Del RNA obtenido a partir de los cultivos celulares con las cepas de referencia y el cultivo celular sin infectar se pudieron amplificar las secuencias correspondientes a la región de B-actina y a la nucleoproteína del VDC **Figura 18**.

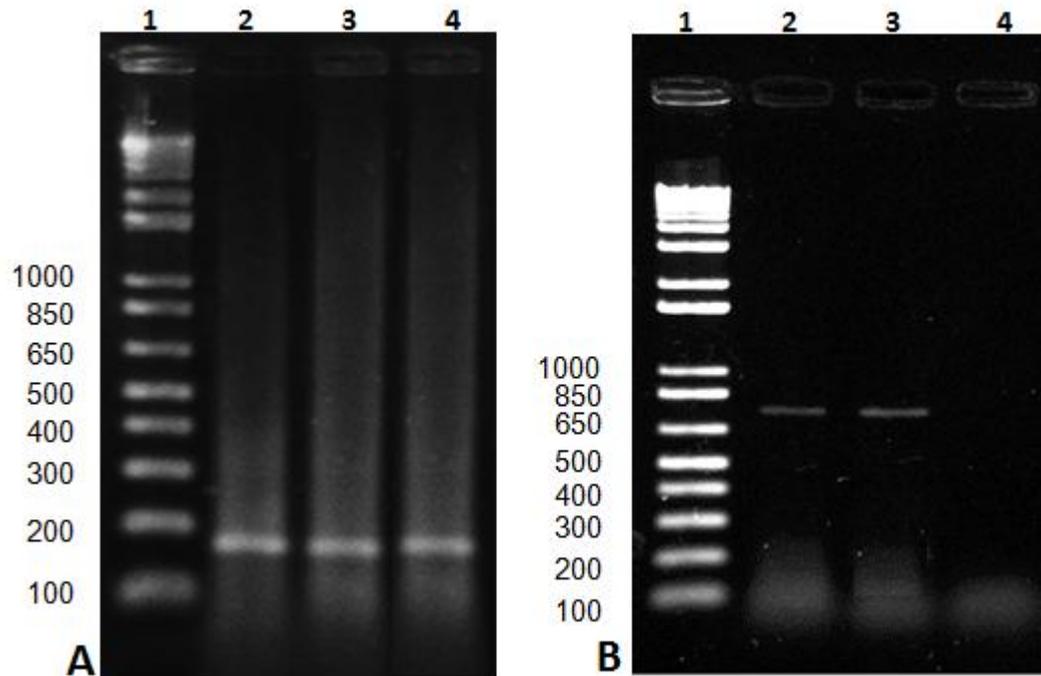


Figura 18. Estandarización de la RT-PCR; Letra A productos de 170 pb del gen de la β -actina. Letra B productos de 756 pb de gen la Nucleoproteína del VDC. (A) Gel de agarosa al 1% en TAE. En el carril 1 se observa el marcador 1 kb plus DNA Ladder, carril 2 VDC cepa Lederle (laboratorio 1), carril 3 VDC cepa Onderstepoort, carril 4 células sin infectar. (B) Gel de agarosa al 1% en TAE. En carril 1 se observa el marcador 1 kb plus DNA Ladder, carril 2 VDC cepa Lederle, carril 3 VDC cepa Onderstepoort, carril 4 células sin infectar.

6.3 AMPLIFICACION DE UN FRAGMENTO DEL GEN DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO Y DE β -ACTINA DE PERRO A PARTIR DE LAS MUESTRAS CLÍNICAS

En total se procesaron 33 muestras. Todas fueron positivas a β -actina y de éstas solo 12 resultaron positivas por RT-PCR para el fragmento del gen de la nucleoproteína del VDC. Los productos amplificados mediante ensayos de RT-PCR se presentan en las **Figuras 19, 20, 21 y 22**. En la figura 19 se muestra un amplificado de 1000pb que se obtuvo de la cepa vacunal Lederle (laboratorio 2). Cabe señalar que de esta cepa también se obtuvo el producto de PCR del peso esperado (756 pb).

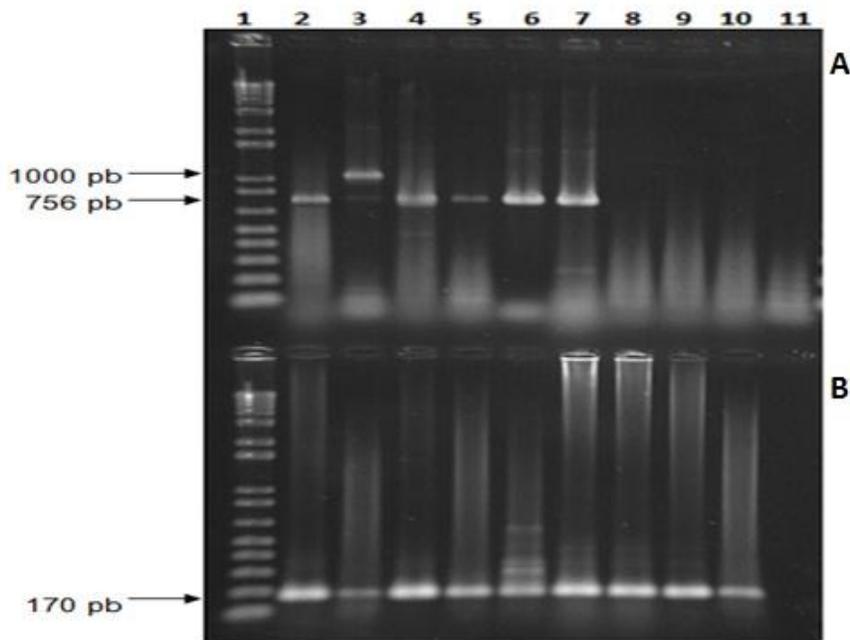


Figura 19. Productos de 756 pb del gen de la nucleoproteína del VDC amplificados mediante RT-PCR y de 170 pb para el gen de la β -actina de perro. Gel de agarosa al 1% en TAE. Gel A. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb plus DNA Ladder. De los carriles 2 al 7 se observan productos amplificados de diversas muestras: carril 2 VDC cepa Lederle (lab 1); carril 3 VDC cepa Lederle (lab 2) en esta muestra se observan dos bandas una de 756 pb y una 1000pb; carril 4 VDC cepa Onderstepoort; carril 5 VDC cepa Rockborn; carril 6 Vacuna; carril 7 encéfalo Maltes; carril 8 células sin infectar (control Negativo). Gel B. Amplificados de B-actina correspondientes a las muestras de los carriles de arriba.

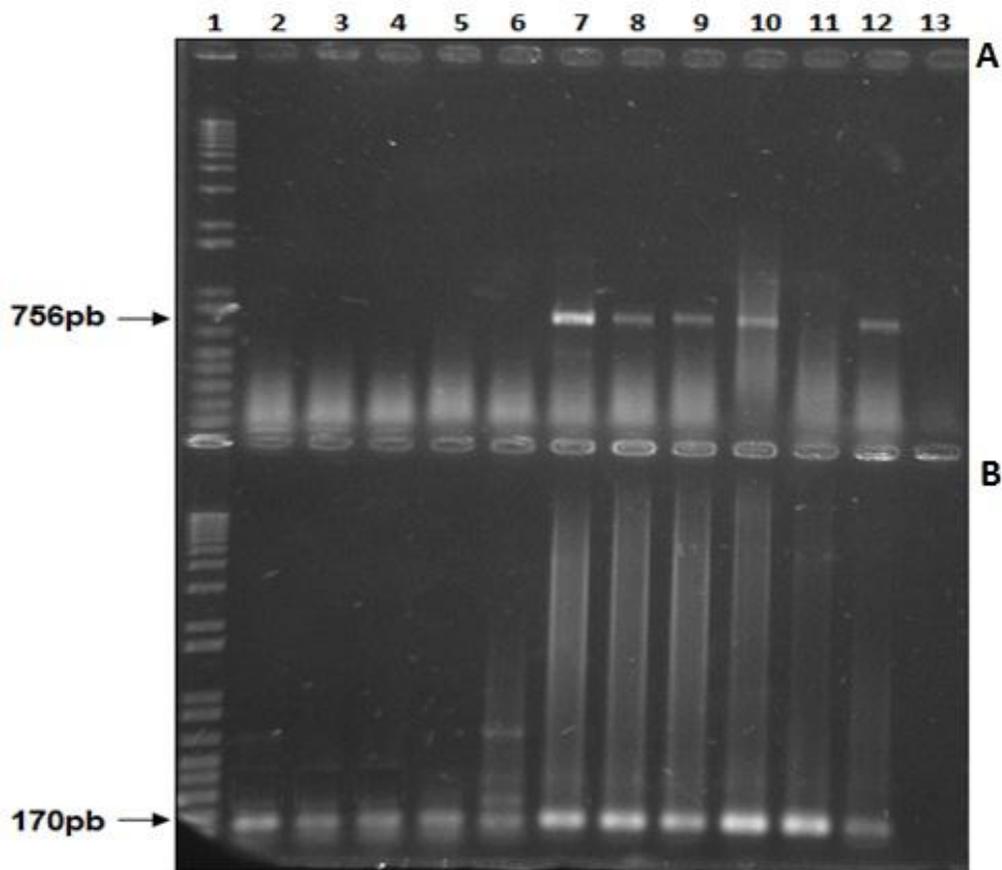


Figura 20. Productos de 756 pb del gen de la nucleoproteína del VDC amplificados mediante RT-PCR y de 170 pb para el gen de la β -actina de perro. Gel de agarosa al 1% en TAE. Gel A. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb plus DNA Ladder. De los carriles 2 al 11 se encuentran reacciones de PCR de muestras sanguíneas de pacientes con VDC; siendo los carriles 7,8,9,10 donde se observa un producto amplificado; Carril 7 M2568; carril 8 M2583; carril 9 M2584; carril 10 M133; carril 12 control positivo; carril 13 células sin infectar (control Negativo). Gel B. Amplificados de B-actina correspondientes a las muestras de los carriles de arriba.

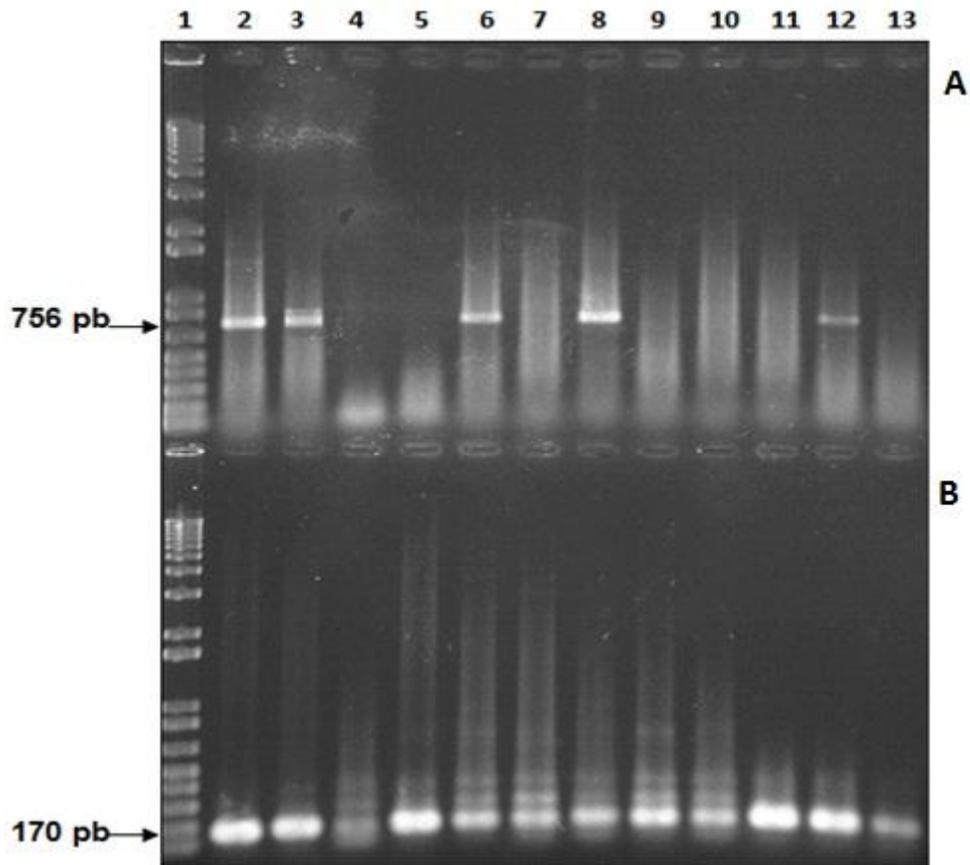


Figura 21. Productos de 756 pb del gen de la nucleoproteína del VDC amplificados mediante RT-PCR y de 170 pb para el gen de la β -actina de perro. Gel de agarosa al 1% en TAE. Gel A. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb plus DNA Ladder. De los carriles 2 al 11 se encuentran reacciones de PCR de muestras sanguíneas de pacientes con VDC; siendo los carriles 2, 3, 6, 8 donde se observa un producto amplificado; Carril 2 Mallinoa sangre; carril 3 PS sangre; carril 6 M160; carril 8 M182; carril 12 control positivo; carril 13 células sin infectar (control Negativo). Gel B. Amplificados de β -actina correspondientes a las muestras de los carriles de arriba.

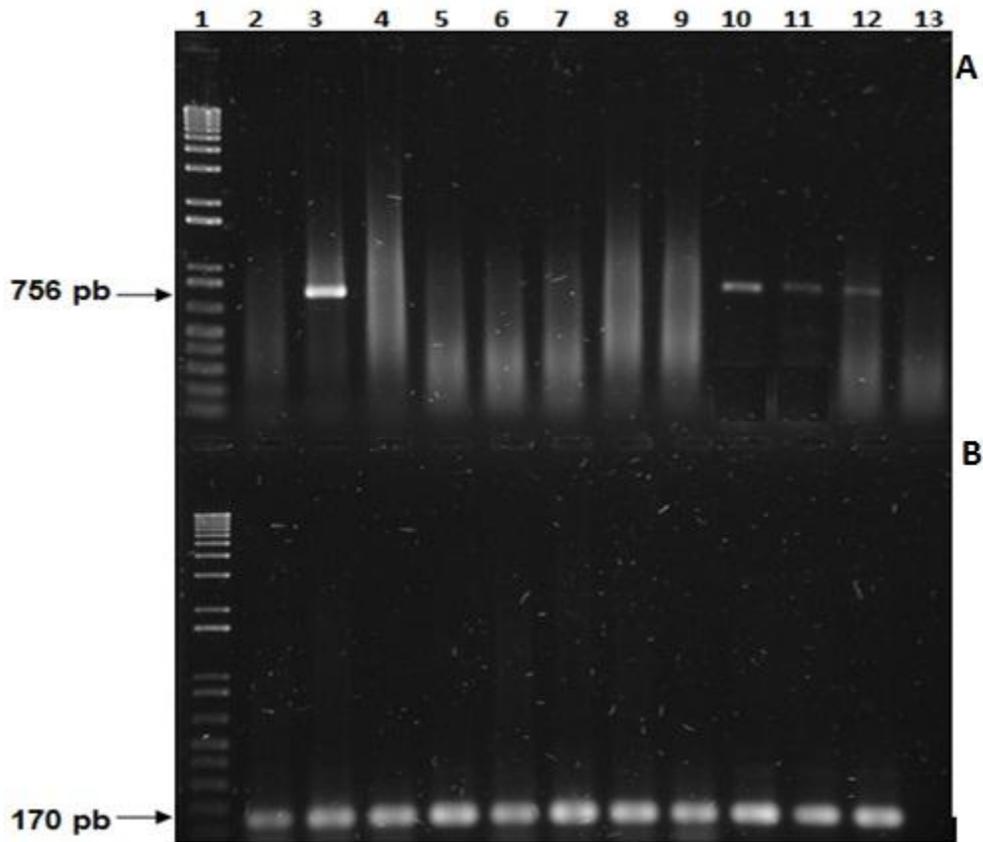


Figura 22. Productos de 756 pb del gen de la nucleoproteína del VDC amplificados mediante RT-PCR y de 170 pb para el gen de la β -actina de perro. Gel de agarosa al 1% en TAE. Gel A. En el carril 1 se muestra el marcador 1 kb plus DNA Ladder. De los carriles 2 al 11 se encuentran reacciones de PCR de muestras sanguíneas de pacientes con VDC; siendo los carriles 3, 10, 11 donde se observa un producto amplificado; Carril 3 M1455; carril 10 Adulto aislamiento; carril 11 cachorro aislamiento; carril 12 control positivo; carril 13 células sin infectar (control Negativo). Gel B. Amplificados de β -actina correspondientes a las muestras de los carriles de arriba.

6.4 SECUENCIACIÓN.

De las 12 muestras clínicas que se lograron amplificar para el VDC, solo se pudieron obtener 8 secuenciaciones, a las cuales se les realizó un análisis mediante el sistema BLAST. De éstas, cuatro presentaron homología con aislados mexicanos, dos con aislados reportados en China, una con un aislado de Estados Unidos de Norteamérica, una de Kasakstán. Estos resultados se muestra en el **Cuadro 11.**

MUESTRA	ANALISIS (BLAST)	PORCENTAJE DE HOMOLOGIA	NUMERO DE ACCESO	PAIS
Encéfalo	CDV Aislado GS0812-5 NP	97%	(HQ850149.1)	China
M133	CDV SHUSKIY CG	90%	(HM063009.1)	Republica de Kazakstán
M160	CDV AISLADO GDL-1 NP	100%	(HM771708.1)	México
M182	CDV AISLADO EdoMex7	98%	(FJ490191.1)	México
M1455	CDV AISLADO CC 14-09 NP	92%	(FJ710186.1)	Estados Unidos de Norteamérica
M2583	CDV SDWD06-M2 NP	97%	(EU715246.1)	China
M2568	CDV AISLADO EdoMex11 NP	100%	(HM771707.1)	México
AISLADO ADULTO	CDV AISLADO GDL-1 NP	100%	(HM771708.1)	México

Cuadro 11. Análisis de las muestras clínicas secuenciadas. Se muestra la identificación de la muestra, análisis mediante sistema BLAST del NCBI, porcentaje de homología, número de acceso y país al que pertenece.

También se enviaron a secuenciar los amplificadores obtenidos de las 3 cepas de referencia crecidas en cultivo celular. Dos de ellos corresponden al producto esperado de 756 pb y uno corresponde al producto de 1000 pb obtenido a partir

de la cepa Lederle (laboratorio 2). En el **Cuadro 12** se muestran las cepas y el análisis de éstas.

MUESTRA	ANÁLISIS (BLAST)	% DE HOMOLOGIA	NÚMERO DE ACCESO	PAIS
VDC LEDERLE LAB 1	CDV LED NP GEN	95%	(EF418783.1)	CHINA
VDC LEDERLE LAB 2 (756 PB)	CDV LED NP GEN	97%	(EF418783.1)	CHINA
VDC LEDERLE LAB 2 (1000 PB)	<i>Mycoplasma Arginini</i>	99%	(HM179556.1)	ESTADOS UNIDOS
VDC ONDERSTEPOORT	CDV Onderstepoort NP GEN	99%	(AF378705.1)	ESTADOS UNIDOS

Cuadro 12. Análisis de las cepas de referencia utilizadas como testigos. Se presenta la identificación de la muestra, el análisis mediante el sistema BLAST del porcentaje de homología, el número de acceso y el país al que pertenece.

7. DISCUSIÓN

En este trabajo se identificó el ARN del VDC en muestras clínicas de perros con un diagnóstico positivo a moquillo y se pudo definir a cual cepa de campo correspondió. Lo anterior se logró mediante la amplificación de un fragmento de 756 pb de la región de la nucleoproteína del VDC por RT-PCR a partir del ARN obtenido de muestras de sangre, encéfalo o linfonodos de perros con signología positiva, para posteriormente secuenciar y analizar los productos amplificados.

Si bien existen otros estudios en los que se han identificado y secuenciado virus de distemper canino en México (Simon-Martinez *et al* 2008), éste es el primer trabajo cuyo objetivo es diferenciar vacunales de los procedentes de casos clínicos. Para ello, se incluyeron cepas vacunales y se analizaron un mayor número de muestras de perros con signos clínicos, en contraste con lo reportado en el trabajo antes mencionado, con lo cual se demostró que los iniciadores diseñados amplifican una región que permite distinguir entre ambos tipos de cepas.

De las secuencias analizadas, como se describió en materiales y métodos, en cuatro de ellas se encontró un 98% a 100% de similitud con cepas circulantes en México previamente, reportadas por Simon-Martinez *et al* 2008¹²⁰ y Gamiz *et al* 2011¹²¹ y en una secuencia se encontró un 92% de similitud con una cepa de Estados de Unidos de Norteamérica (Cunningham *et al* 2009,¹²² lo cual es factible debido a la cercanía con este país. Sin embargo, llama la atención que los otros tres aislamientos secuenciados presentaran homología con cepas reportadas en China (Wang XR *et al* 2011 y Wang FX *et al* 2009)¹²³ y Kazakstán (Zholdybayeva

et al 2010).¹²⁴ Es pertinente hacer un estudio con un mayor número de muestras, para determinar cuáles son las variantes virales que predominan en el país.

Con el análisis de los resultados obtenidos de la secuenciación se muestra que los virus de campo circulantes en México son distantes a los de las cepas vacunales y se asemejan a los reportados en el trabajo de Gámiz *et al* 2011; quienes realizaron un sondeo epidemiológico con diversas cepas colectadas de 2007 a 2010 y donde encontraron que las cepas circulantes presentaban variaciones genéticas con respecto a las cepas vacunales reportadas a nivel mundial; y a lo obtenido por Lan *et al* 2006,¹²⁵ en un estudio realizado en Japón, quienes mostraron que una cepa que infectó a los perros con signología clínica de Distemper tenía una relación genética lejana a la vacunal y por lo tanto no mostró evidencia de que el virus de la vacuna hubiera revertido a una forma virulenta.

Con el análisis de la secuenciación de las cepas vacunales comerciales del presente trabajo, se encontró una homología entre el 90 y 100%, lo cual indica que los iniciadores desarrollados para este trabajo, permiten determinar que la región amplificada corresponde a una cepa vacunal. Lo anterior es importante, ya que podría ofrecerse un diagnóstico mas completo que ayudaría a detectar aquellos casos de encefalitis u otros signos causados por la vacunación, tal y como ocurre en fauna silvestre, animales seniles o perros vacunados a edad temprana. Por otra parte, la amplificación y secuenciación de esta región podría ser empleada para la constatación y control de calidad de vacunas que contengan a este virus.

La prueba de RT-PCR mostró resultados satisfactorios al utilizar muestras de ARN obtenidas de sangre, encéfalo y cultivo celular, esto coincide con los trabajos

reportados por Shin Y. *et al*(1995),¹²⁶ Frisk AL *et al* (1999), Saito TB *et al* 2006, Amude AM *et al* 2006, Kim D *et al* 2006,^{127, 128, 129} quienes utilizaron el mismo tipo de muestras para amplificar diferentes regiones del virus de Distemper.

La selección de muestras incluyó a la IF como prueba tamiz, para posteriormente procesarlas mediante de RT-PCR. En este proceso se observaron variaciones importantes en los resultados, ya que hubo una concordancia del 100% cuando las muestras provenían de cultivo celular o encéfalo, mientras que, solamente se obtuvo el 35% con las muestras de sangre. Si bien, en este estudio se observó que la técnica de RT-PCR puede ser utilizada en muestras de sangre sin necesidad de optimizar la extracción de ARN o de la PCR, sería recomendable probar lo anterior para determinar si mejorando estos aspectos aumentaría el número de muestras positivas en sangre, ya que ésta resulta ser la más fácil de obtener y por ende la más comúnmente enviada para las pruebas de diagnóstico.

Es importante señalar que se determinó la pureza del ARN de manera cuantitativa obteniendo una relación A_{260}/A_{280} , que osciló entre 1.8 y 2.0, la cual se considera apropiada, respecto a los parámetros reportados.¹³⁰ Este dato nos indica que los procedimientos se realizaron con ARN adecuado. Aunque, esto se confirmó posteriormente con la amplificación del control de β -actina (fragmento que se pudo amplificar en todas las muestras experimentales, con un peso de 170 pb), se debe señalar que la cantidad de ARN viral obtenido, pudo no haber sido suficiente, se pudo haber degradado o perdido durante el manejo, según ha sido reportado en otros trabajos¹³¹.

El análisis de las muestras positivas mostró que todas son causadas por virus de campo, lo que concuerda con lo reportado por Simon-Martinez *et al* (2008),¹¹⁵ quienes en un estudio realizado en México encontraron que los aislamientos obtenidos correspondían a virus de campo. El 75% de las muestras positivas correspondió a animales de menos de 1 año de edad (cachorros) y esto coincide con la literatura en relación a que esta es una enfermedad, principalmente, de animales jóvenes.¹³² Finalmente, las signos clínicos asociados a moquillo canino que se reportaron con mayor frecuencia en los sujetos de este estudio, fueron los respiratorios y en segundo lugar los neurológicos, lo cual coincide con lo dicho por Pandher *et al* (2006)¹³³, Blixenkrome-Moller *et al* (1993); **Error! Marcador no definido.** quienes reportaron que los respiratorios como predominantes; y difiere con Koutinas AF. *et al* 2002,¹³⁴ quienes observaron signos neurológicos con ausencia de respiratorios.

Los resultados mostraron que 6 casos positivos en fueron de animales vacunados, esto concuerda con los trabajos de *Blixenkrome-Moller et al* 1993, *Ek-Kommonen et al* 1997, *Panzera et al* 2012, *Gemma et al* 1996, *Simon-Martinez et al* 2008, *Gamiz et al* 2011, *Gallo et al* 2007, en los que se reporta la enfermedad a pesar de la vacunación,^{115, 116,121, 135, 136, 137} Estos resultados no son indicativos de que la enfermedad haya sido causada por el biológico.

De las cepas vacunales empleadas como testigo en este estudio, una de las correspondientes a la cepa Lederle (B), mostró dos bandas (**Ver figura 19**). Ambas se mandaron secuenciar, una de ellas, de 756 pb correspondió a la secuencia esperada, mientras que la otra, de 1000 pb, mostró una homología del

99% con la unidad ribosomal 18S de *Mycoplasma arginini*, y que es uno de los contaminantes más frecuentes de líneas celulares en laboratorios industriales y de investigación.^{138, 139} Lo anterior abre la posibilidad de futuros estudios para determinar el uso potencial de estos iniciadores como una herramienta que permita demostrar la presencia de Mycoplasmas contaminantes en las vacunas elaboradas en cultivo celular y así proponerlo para algunas pruebas de pureza en la constatación y en el control de calidad de productos biológicos.

8. CONCLUSIONES

1. Se estandarizó una técnica de RT-PCR para detectar al VDC a partir de muestras de sangre, encéfalo y aislados virales, con la amplificación paralela de un fragmento del gen de la β -actina como control de extracción del ARN.
2. Se amplificó, mediante RT-PCR, el fragmento esperado para la nucleoproteína del VDC en 12 muestras. El análisis por secuenciación de estos productos mostró que ninguno coincide con las cepas vacunales reportadas.
3. Cuatro muestras secuenciadas concuerdan con cepas circulantes en México previamente reportadas. Dos con aislados reportados en China, una de Kazakstán y una en los Estados Unidos de Norteamérica.
4. Los iniciadores diseñados amplifican una región de la nucleoproteína del VDC que permite distinguir entre cepas vacunales y de campo; esto facilitaría hacer un diagnóstico rápido y efectivo de la enfermedad mediante el empleo de ensayos de restricción enzimática.

9. PROSPECTIVA

- Al hacer el análisis de todas las secuencias obtenidas, utilizando el programa Vector NTI Advance se vio que sería factible obtener patrones de corte que distinguirían entre cepas vacunales y de campo si se empleara la enzima *Alu* I, obteniendo 4 cortes para las cepas vacunales (388, 251, 84, 33) y 3 cortes para las cepas de campo (388, 284, 84). Por lo anterior, en un futuro podría utilizarse para el diagnóstico, sin necesidad de la secuenciación.
- Evaluar los iniciadores diseñados en este trabajo con diversas cepas de *Mycoplasma spp*, para corroborar su utilidad en las pruebas de pureza.

10. REFERENCIAS

-
- 1 Astete TJM. Patogenia del virus de moquillo canino. Sistema de revisiones en investigación veterinaria de san marcos. 2010; 1:11.
 - 2 Vito Martella DVM, Gabrielle EDVM, Canio Buonavoglia DVM. Canine Distemper Virus. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Emerging and Reemerging Viruses in Dogs and Cats, 2008; 38, (4):787-797
 - 3 Appel M. and Summer B. Canine Distemper: current Status. In recent Advances in Canine Infectious Disease, L.E. Charmichael. 1999.
 - 4 Tizard I. Risks associated with the use of live vaccines. JAVMA. 1990; 196(11): 1851-1858.
 - 5 De Ulloa Antonio, Don Jorge Juan, Merino Navarro José Patricio, Rodríguez San Vicente Miguel M. Relación histórica del viaje a la América Meridional. Páginas Madrid, 1748 ; 2,(4): 423 páginas.
 - 6 Jenner E. Observations on the Distemper in dogs. Transactions of the Medico-chirurgical Society of London, 1809; 1: 265-270.
 - 7 Laidlaw PP, Dunkin GW. Studies in dog distemper III. The nature of the virus. J. Comp. Path and Therap. 1926; 39: 222.
 - 8 Laidlaw PP, Dunkin GW. Studies in dog distemper. Immunization of dogs. J. Comp. Path and Therap, 1928; 41: 209.
 - 9 McMichan BA. The Laidlaw – Dunkin Method of prophylaxis against dog distemper. The Australian Veterinary Journal. December 1930: 155-158.
 - 10 Rima BK, Collin AM, Early JA. Completion of the sequences of a cetacean Morbillivirus and comparative analyses of the complete genome sequences of four Morbillivirus. Virus Genes. 2005; 30(1): 113-9.
 - 11 Rojas A. Morbillivirus de los cetáceos. Boletín GEAS (Grupo de Estudios de Animales Silvestres). 2004; 4(3): 18-21.
 - 12 Philip Earle JA, Melia MM, Nadine V. Doherty, Ole Nielsen, and S. Louise Cosby. Phocine Distemper Virus in Seals, East Coast, United States, 2006. Emerging virus disease, 2011; 17(2): 215-220
 - 13 Seibel H, Baumgärtner W, Müller G, Wohlsein P, Siebert U. Retrospective analyses of two phocine distemper epidemics in the North and Baltic seas in 1998 and 2002. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 2007; 114(8): 284-93.
 - 14 Blixenkrone-Møller M. Biological properties of phocine distemper virus and canine distemper virus. APMIS Suppl. 1993; 36:1-51
 - 15 Harris CM, Travis JMJ, Harwood J. Evaluating the Influence of Epidemiological Parameters and Host Ecology on the Spread of Phocine Distemper Virus through Populations of Harbour Seals. Plos One Phocine Distemper Models, 2008; 3(7): 1-8.

-
- 16 Bazarghani TT, Charkhkar S, Doroudi J, Bani Hassan E. A Review on Peste des Petits Ruminants (PPR) with Special Reference to PPR in Iran. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2006 ;53 (1) :17-28.
- 17 Ezeibe MC, Okoroafor ON, Ngene AA, Eze JI, Eze IC, Ugonabo JA. Persistent detection of peste de petits ruminants antigen in the faeces of recovered goats. *Trop Anim Health Prod*. 2008 ;40 (7):517-9.
- 18 Wambura PN, Mollel JO, Moshy DW, Mbise AN, Taylor WP. Rinderpest antibody detected in sheep and goats before an outbreak of rinderpest reported in cattle in northern tanzania. *Trop Anim Health Prod*, 1999; 31(1): 9-14.
- 19 Bastiaensen P, Planté Caroline, Knopf Lea, Njeumi F, Kock R, Mtei B, Vallat B. Global eradication of Rinderpest: The final act. OIE- FAO - London Zoological Society 2011. Disponible en URL: <http://www.oie.int/doc/ged/D10956.PDF>
- 20 Von Messling V, Zimmer G, Herrier G, Haas L, Cattaneo R. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *J Virol* 2001; 75 (14): 6418-6427.
- 21 Guo A, Lu C. Canine Distemper virus causes apoptosis of Vero Cells. *J Vet Med B*, 2000; 47: 183-190.
- 22 Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, Takeda M, Tashiro M. Wild type measles virus induced large syncytium formation of primary human small airway epithelial cells by SLAM (CD150)- independent mechanism. 2003, 94: 11-16.
- 23 Rozenblatt S, Eizenberg O, Ben-Levy R, Lavie V, Bellini WJ. Sequence homology within the morbilliviruses. 1985;53(2): 684-690.
- 24 Monne I, Fusaro A, Valastro V, Citterio C, Dalla PM, Obber F, Trevisiol K, Covia M, De Benedictis P, Bregoli M, Capúa I, Cattoli G. A distinct CDV genotype causing a major epidemic in alpine wild life. *Veterinary Microbiology*. 2011; 150 (1-2): 63-69.
- 25 Nikoli VM, Wibbelt G, Michler FuF, Wolf P, East ML. Susceptibility of carnivores host to satrisn of canine distemper virus from distinct genetics lineages. 2012; 156(1-2): 45-53.
- 26 Harder TC, Osterhaus ADME. Canine distemper virus- in search of new host?. *Trends in microbiology*. 1997, 5 (3): 120-124.
- 27 Chen CC, Pei KJC, Liao MH, Mortenson JA. Canine distemper virus in wild ferrets-badgers of Taiwan. *Journal of Wild life disease*. 2008; 44(2): 440-445.
- 28 Williams ES, Thorne ET, Appel MJG, Belitsky DW. Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela Nigripes*) from Wyoming. 1988; 24(3): 385-398.
- 29 Evermann JF, Leathers CW, Gorham JR, Mckeirnan AJ, Appel MJG. Pathogenesis of two strains of lion (*Panthera leo*) Morbillivirus in ferrets (*mustela putorius furo*). 2001; 38: 311-316.

-
- 30 Qin Q, Li D, Hou R, Zhang Z, Zhang C, Zhang J, Wei F. Serosurvey of selected viruses in captive giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*) in china. *Vet Microbiol.* 2010; 142(3-2): 199-204.
- 31 Marsilio F, Tiscar PG, Gentile L, Roth HU, Boscagli G, Tempesta M, Gatti A. Serologic survey for selected viral pathogens in brown bears from Italy. *Journal of wild life disease.* 1997; 33(2): 304-307.
- 32 Cattet MRL, Duignan PJ, House CA, St Aubin DJ. Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from Canadian Arctic. *Journal of Wild Life disease.* 2004; 40(2): 338-442.
- 33 Follmann EH, Garner GW, Evermann JF, McKeirnan AJ. Serological evidence of Morbillivirus infections in polar bears (*Ursus maritimus*) from Alaska and Russia. 1996; 138: 615-518.
- 34 Daoust PY, Mc Burney SR, Godson DL, Van de Bildt MWG, Osterhaus ADME. Canine Distemper virus associated encephalitis in free-living lynx (*Lynx Canadensis*) and bobcats (*Lynx rufus*) of eastern Canada. *Journal of Wild life disease.* 2009; 45(3): 611-624.
- 35 Meli ML, Simmler P, Cattori V, Martinez F, Vargas A, Palomares F, Lopez-Bao JV, Simon MA, Lopez G, León-Vizcaino L, Hofmann-Lehmann R, Lutz H. Importance of canine distemper virus (CDV) infection in free-ranging Iberian Lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary microbiology.* 2010; 146: 132-137.
- 36 Guiserix M, Bahi-Jaber N, Fouchet D, Sauvage F, Pontier D. The canine distemper epidemic in Serengeti: are lions victims of a new highly virulent canine distemper virus strains, or is pathogens circulation stochasticity to blame. *Journal of the royal society interface.* 2007; 4:1127-1134.
- 37 Myers DL, Zurbriggen A, Lutz H, Pospischil A. Distemper: not a new disease in lions and tigers. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 1997; 4(2): 180-184.
- 38 Appel MJG, Yates RA, Foley GL, Bernstein JJ, Santinelli S, Spelman LH, Miller LD, Lawrence HA, Anderson M, Barr M, Pearce-Kelling S, Summers BA. Canine distemper epizootic in lions, tigers and leopards in North América. *J Vet Diagn Invest.* 1994; 6: 277-288.
- 39 Carpenter MA, Appel MJG, Roelker-Parker ME, Munson L, Hofer H, East M, O'Brian SJ. Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Veterinary Immunology and immunopathology.* 1998; 65: 255-266.
- 40 Kennedy S, Kuiken Thijs, Jepson PD, Deaville R, Forsyth M, Barrtes T, Van de Bildt MWG, Osterhaus ADME, Eybatov T, Duck Callan, Kydyrmanov Aidyn, Mitrofanov I, Wilson S. Mass Die-off of caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerging infectious diseases.* 2000; 6(6): 637-639.
- 41 Saliki JT, Cooper EJ, Gustavson JP. Emerging Morbillivirus infection of marine mammals: development of diagnostics approaches. *Journal of Wild life disease.* 2002: 51-59.

-
- 42 Butina TV, Denikina NN, Belikov SI. Canine distemper virus diversity in Lake Baikal seal (*phoca sibirica*) population. *Veterinary Microbiology*. 2010; 144:192-197.
- 43 Hass L, Hofer H, East M, Wohlsein P, Liess B, Barret T. Canine distemper virus infection in Serengeti spotted hyaenas. *Veterinary Microbiology*. 1996; 49: 147-152.
- 44 Yoshikawa Y, Ochikubo F, Matsubara Y, Tsuruoka H, Ishii M, Shirota K, Nomura Y, Sugiyama M, Yamanouchi K. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology*. 1989; 20: 193-205.
- 45 Sun Z, Li A, Ye H, Shi Y, Hu Z, Lin Z. Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. *Veterinary Microbiology*. 2010; 141:374-378.
- 46 Han GZ, Liu XP, Li SS. Cross-species recombination in the haemagglutinin gene of canine distemper virus. *Virus Res*. 2008; 17: 19-53.
- 47 Demeter Z, Palade EA, Hornyák Á, Rusvai M. Controversial results of the genetic analysis of canine distemper vaccine strain. *Veterinary Microbiology*. 2010; 142: 420-426.
- 48 Sidhu MS., Husar W, Cook SD, Dowling PC, Udem SA, Sidhu MS, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. *Virology*, 1993; 193(1): 66-72
- 49 Collier L, Balows A, Sussman M. *Microbiology and Microbial Infections. Paramyxoviruses*. *Virology Vol 1*, 1998.
- 50 Von Messling V, Svitek N, Cattaneo R. Receptor (SLAMF7 [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *J. Virol*. 2009, 80; 6084-6092.
- 51 Bellini WJ, Englund G, Richardson CD, Rozenblatt S, Lazzarini RA. Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences and deduced amino acid sequences. *Journal of virology*. 1986; 58 (2): 408-416.
- 52 Cherpillod P, Beck K, Zurbriggen A, Wittek R. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus Wild Type strain A75/17. *Journal of Virology*. 1999; 73(3): 2263-2269.
- 53 Haas L, Liermann H, Harder TC, Barrett T, Löchelt M, Von Messling V, Baumgärtner W, Greiser-Wilke I. 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. *Veterinary Microbiology*. 1999 ; 69 :15-18.
- 54 Sawatsky B, Von Messling V. Canine distemper viruses expressing a Hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. *Journal Virology*. 2010; 84(6): 2753- 2761.
- 55 Diallo A. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Veterinary Microbiology*. 1990; 23: 155-163.

-
- 56 Summers A, Appel MJ. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1994; 20: 525 - 534.
- 57 Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandeveld M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Veterinary Microbiology.* 1997; 57: 83-93.
- 58 Danielle E, Messling A and V. Region between the Canine Distemper Virus M and F genes modulates virulence by controlling Fusion protein expression. *Journal of Virology.* 2008. 82(21); 10510- 10518.
- 59 Amaro LME. Identificación del virus de moquillo canino en muestras sanguíneas en pacientes con esclerosis múltiple. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. 2007.
- 60 Tatsuo H, Ono N, Yamagi Y. Morbillivirus use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J. Virology.* 2001; 75: 5842-5850.
- 61 Von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal Morbillivirus through the host immune system. *P Natl Acad Sci.* 2004; 101: 14216-14221.
- 62 Curran J, Kolakofsky D. Replication of paramyxoviruses. *Adv Virus Res.* 2000; 54: 403-422.
- 63 Ettinger SJ, Feldman EC. Tratado de medicina interna veterinaria. 6ª edición Madrid:Elsevier España S.A. 2006: 1991 pag.
- 64 Craig EG. Enfermedades infecciosas en perros y gatos. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A de C.V. México. 2000; 1014 pag.
- 65 Röthlisberger A, Wiener D, Schweizer M, Peterhans E, Zurbriggen A, Plattet P. Two domains of the V protein of virulent canine distemper virus selectively inhibit STAT1 and STAT2 nuclear import. *Journal of virology.* 2010 ;84(13):6328-6343.
- 66 Sidorenko SP, Clark EA. The dual function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol.* 2003, 4; 19-24.
- 67 Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA. The protein C of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology.* 2003; 315: 389-397.
- 68 Lesiton P, Difflumeri C, Brielius DJ. Protein interactions entered into by the measles virus P, V and C proteins. *Virus research.* 1995; 38: 241-259.
- 69 Takayama I, sato H, Watanabe A, Omi-Furutani M, Sugai A, Kanki K. The nucleocapsid protein of measles virus blocks host interferon response. *Virology.* 2012; 424: 45-55.
- 70 Schobesberger M, Summerfield A, Doherr MG, Zurbriggen A, Griot C. Canine distemper virus- induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Vet Immunol Immunopathology.* 2005, 104: 33-44.
- 71 Pillet S, Von Messling V. Canine distemper virus selectively inhibits apoptosis progression in infected immune cells. *J Virology.* 2009, 127: 155-162.

-
- 72 Sidorenko SP, Clark EA. The dual function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol.* 2003, 4: 19-24.
- 73 Rudd P, Cattaneo R, Von Messling V. Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal Virology.* 2006; 80: 9361-9370.
- 74 Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, Muto Y, Endo Y, Tsukiyama-Kohara K, Kai C. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: involvement of heparin-like molecules in CDV infection. *Virology.* 2007; 359: 324-335.
- 75 Zhao J, Yan X, Wu W. Genetic variations and cellular receptors of canine distemper virus- a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 2008; 48: 986-991.
- 76 Plattet P, Cherpillod P, Wiener D, Zipperle L, Vandeveldel M, Wittek R, Zurbriggen A. Signal peptide and helical bundle domains of virulent canine distemper virus fusion protein restrict fusogenicity. *Journal of virology.* 2007; 81(20):11413-11425.
- 77 Greene CE. *Enfermedades infecciosas en perros y gatos.* 2ª ed México: McGraw-Hill Interamericana. 2000.
- 78 Gröne A, Engerhardt P, Zurbriggen A. Canine distemper virus infection: Proliferation of canine footpad keratinocytes. *Vet Pathol.* 2003; 40: 574-578.
- 79 Summers BA, Greisen HA, Appel MJ. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 1979, 46: 1-10.
- 80 Krakowka S. Canine Distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *Journal of neuroimmunology.* 1989; 21: 75 -80.
- 81 Imawaga DT, Howard EB, Van Pelt LF, Ryan CP, Buy DH, Shapshak P. Isolation of canine distemper virus from dog with chronic neurological disease. *Proc Soc. Exp Biol. Med.* 1980; 164: 335-362.
- 82 Vandeveldel M, Kristensen B, Braund KG, Swango LJ, Hoerlein BF. Chronic canine distemper encephalitis in mature dogs. *Vet Pathol.* 1980; 17(1): 17-28.
- 83 Koestner A. Animal model of human disease: subacute sclerosing panencephalitis, multiple sclerosis; animal model: distemper associated demyelinating encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 1975; 78(2):361-364.
- 84 Adams JM, Brown WJ, Snow HD, Lincoln SD, Sears AW Jr, Barenfus M, Holliday TA, Cremer NE, Lennette EH. Old dog encephalitis and demyelinating disease in man. *Vet Pathol.* 1975; 12(3): 220-6.
- 85 Zurbriggen A, Graber HU, Wagner A, Vandeveldel M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *Journal of Virology.* 1995; 69(3): 1678-1686.

-
- 86 Pandher K, Podell B, Gould DH, Johnson BJ, Thompson S. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J Vet Diagn Invest.* 2006;18: 201-204.
- 87 Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos V. Relation of clinical cases of canine distemper encephalomyelitis. *J Comp Pathol.* 2002; 126: 47-56.
- 88 Higgins RJ, Krakowka S, Metzler AE, Koestner A. Canine distemper virus associated cardiac necrosis in the dog. *Vet Pathol.* 1981; 18: 472- 486.
- 89 Okita M, Yanai T, Ochikubo F, Gemma T, Mori T, Maseki T, Yamanouchi K, Mikami T, Kai C. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J Comp Pathol.* 1997; 116: 403-408.
- 90 Kubo T, Kawaga Y, Taniyama H, Hasegawa A. Distribution of inclusion bodies in tissues from 100 dogs infected with canine distemper virus. *J Vet. Med. Sci.* 2007; 69(5): 527-529.
- 91 Nessler A, Baumgartner W, Zurbriggen A, Örvell C. Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body poliomyelitis. *Veterinary Microbiology.* 1999; 69: 23-28.
- 92 Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *J Comp Pathol.* 2002; 126 :47-56.
- 93 Mee AP, Gordon MT, May C, Bennett D, Anderson DC, Sharpe PT. Canine distemper virus transcripts detected in the bone cells of dogs with metaphyseal osteopathy. *Bone.* 1993;14(1): 59-67.
- 94 Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungeford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CM. 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.* 2004; 118:147-157.
- 95 Amude AM, Carvalho GSA, Alfieri AA, Alfieri AF. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2007; 38: 354-356.
- 96 Kajita M, Katayama H, Murata T, Kai C, Hori M, Ozaki H. Canine distemper virus induces apoptosis through caspase 3 and 8 activation in VERO cells. *J Vet Med.* 2006; 53: 273-277.
- 97 Wheeler JT. El moquillo canino ¿tiene cura?. *REDVET Revista electrónica.* 2007; 8 (7). <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070707.html>
- 98 Castro EA, Heuschele WP, *Veterinary diagnostic virology. A practitioners guide.* EUA: Mosby Year Book, 1992.

-
- 99 Blixenkroner-Møller M, Pedersen IR, Appel MJ, Griot C. Detection of IgM against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet Diagn Invest.* 1991; 3: 3-9.
- 100 Shin YJ, Choko, Cho HS, Kang SK, Kim HJ, Kim YJ, Park HS and Park NY. Comparison of one-step RT-PCR and nested PCR for the detection of canine distemper virus in clinical samples. *Australian Veterinary Journal.* 2004; 82: 83-86.
- 101 Scarpelli EM, Scarpelli KC, Amude AM, Alfieri AA, Cintra ML. RT-PCR: Diagnosis value in dogs with spontaneous acute-, subacute-, and chronic demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009;128: 211-218.
- 102 Lappas M, Permezel M, Rice GE. N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and Nuclear Factor κ B deoxyribonucleic acid binding activity in human fetal membranes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88: 1733-1729.
- 103 Elia G, Belloni C, Cirone F, Lucente Ms, Caruso M, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C, Ormas P. In vitro efficacy of ribavirin against canine Distemper virus. *Antiviral Res.* 2008; 77: 108-113.
- 104 Placek K, Coffre M, Maiella S, Bianchi E, Rogge L. Genetic and epigenetic networks controlling T helper 1 cell differentiation. *Immunology.* 2009; 127: 155-162.
- 105 Noh K, Lim H, Moon SK, Kang JS, Lee WJ, Hwang YI. Mega-dose vitamin C modulates T cell functions in Balb/c mice only when administered during T cell activation. *Immunol Lett.* 2005; 98: 63-72.
- 106 Rodeheffer C, Von Messling V, Milot S, Lepine F, Manges AR, Ward BJ. Disease manifestations of canine distemper virus infection in ferrets are modulated by vitamin A status. *J Nutriology.* 2007; 137:1916-1922.
- 107 Patel JR, Heldens JGM. Review of companion animal viral disease and immunophylaxis. *Vaccine.* 2009; 27: 491-504.
- 108 Phillips TR, Jensen JL, Rubino MJ, Yang WC, Schultz RD. Effects of vaccines on the canine distemper immune system. *Can J Vet Res.* 1989; 53: 154-160.
- 109 Martella V, Blixenkroner-Møller M, Elia G, Lucente MS, Cirone F, Decaro N, Nielsen L, Bányai K, Carmichael LE, Buonavoglia C. Lights and shades on an historical vaccine canine Distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine.* 2011; 29: 1222-1227.
- 110 Sutherland-Smith MR, Rideout BA, Mikolon AB, Appel MJ, Morris PJ, Shima AL, Janssen DJ. Vaccine induced canine distemper in European mink *Mustela lutreola*. *J Zoo Wildl Med.* 1997 Sep; 28(3):312-8.
- 111 Carpenter JW, Appel MJ, Erickson RC, Novilla MN. Fatal vaccine-induced canine distemper virus infection in black-footed ferrets. *J Am Vet Med Assoc.* 1976; 169(9): 961-964.

-
- 112 Bush M, Montali RJ, Brownstein D, James AE Jr, Appel MJ. Vaccine – induce canine distemper virus in a lesser panda. *J Am Vet Med Assoc.* 1976 Nov 1; 169(9):959-60.
- 113 Harder TC, Kenter M, Appel MJG, Roelke-Parker ME, Barrett T, Osterhaus ADME. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine*, 1995, 6: 521-523
- 114 Martella V, Elia G, Lucente MS, Decaro N, Lorusso E, Banyai K, Blixenkrone-Moller M, Lan NT, Yamaguchi R, Cirone F, Carmichael LE, Buonavoglia C. Genotyping canine Distemper virus (CDV) by hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology*, 2007;122: 32-42.
- 115 Blixenkrone-Moller M, Svansson V, Have P, Örvell C, Appel M, Pedersen IR, Dietz HH, Henriksen P. Studies of manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. 1993; 3: 163-173.
- 116 Ek-kommonen C, Sihvonen L, Pekkanen K, Rikula U, Nuotio L. Outbreaks of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record.* 1997; 141: 380-383.
- 117 Coria GE. Utilización de RT-PCR, ELISA y cultivo celular para detectar la presencia del virus de Distemper en lobos marinos de California en Sonora (tesis de licenciatura). México D.F: FMVZ-UNAM, 2005.
- 118 Lednicky JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrack C, Houde CM. Effective primary isolation of wild type of 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 phosphor protein genes. *Journal of Virologicals methods*, 2004; 118: 147-157.
- 119 National Center for Biotechnology Information. Genbank. Disponible en URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
- 120 Simon-Martinez J, Ulloa-Arvizu R, Soriano VE, Fajardo R. Identification of a genetic variant of canine Distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in México. *The Veterinary Journal.* 2008; 175: 423-426.
- 121 Gamiz C, Martella V, Ulloa R, Fajardo R, Quijano-Hernandez I, Martinez S. Identification of new genotype of canine Distemper virus circulating in América. *Vet Res Commun.* 2011; 35(6): 381-390.
- 122 Cunningham MW, Shindle DB, Allison AB, Terrell SP, Mead DG, Owen M. Canine distemper in everglades mink. 2009. Unpublished
- 123 Wang XR, Wang XH. Direct submission NCBI accession number HQ850149. 2010.
- 124 Zholdybayeva EV, Momynaliev KT, Sandybayev NT, Orynbayev MB, Mamadaliyev SS, Ramanculov EM. Direct submission NCBI accession number HM63009.1
- 125 Lan NT, Yamaguchi R, Inomata A, Furuya Y, Uchida K, Sugano S, Tateyama S. Comparative analyses of canine Distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology.* 2006; 115: 32-42.

-
- 126 Shin Y, Mori T, Okita M, Gemma T, Kai C, Mikami T. Detection of canine distemper virus nucleoprotein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J Vet Med Sci.* 1995; 57(3): 439-445.
- 127 Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negrão FJ, Morais HAS, Alfieri AF. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase- polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science.* 2006;80:116-119.
- 128 Amude AM, Alfieri AA, Alfieri AF. Antemorten diagnosis of CDV infection by RT-PCR in Distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. *Veterinary Research Communications.* 2006;30: 679-687.
- 129 Kim D, Jeoung SY, Ahn SJ, Lee JH, Pak SI, Kwon HM. Comparison of tissue and fluid samples for the Early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J Vet Med Sci.* 2006;68(8): 877-879.
- 130 Farell RE, RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization. 2a ed EUA: Academic Press, 1998.
- 131 Eguiarte LE, Souza V, Aguirre Xitlali. *Ecología molecular.* Instituto Nacional de Ecología UNAM. 2007. Primera edición. 517-540
- 132 Beineke A, Puff C, Seehusen F, Baumgärtne W. Pathogenesis of immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2009; 127: 1-18.
- 133 Pandher K, Podell B, Gould DH, Johnson BJ, Thompson S. Interstitial pneumonia in neonatal canine pups with evidence of canine distemper virus infection. *J Vet Diagn Invest.* 2006; 18: 201–204.
- 134 Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Baumgaertner W, Lekkas S, Kontos V. Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of Canine Distemper Encephalomyelitis. *J.Comp. Path.* 2002; 126: 47-56.
- 135 Panzera Y, Gallo CM, Sarute N, Guasco S, Cardeillac A, Bonilla B, Hernández M, Francia L, Bedó G, La Torre J, Pérez R. Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research.* 2012; 163: 401-404.
- 136 Gemma T, Watari T, Akiyama K, Miyashita N, Shin YS, Iwatsuki K, Kai C, Mikami T. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J. Vet Med Sci.* 1996; 58(6): 547-550.
- 137 Gallo CM, Remorini P, Periolo O, Iglesias Marcela, Mattion N, La Torre J. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine Distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology.* 2007; 125: 341-349.
- 138 Peredeltchouk M, David SA, Battacharya B, Volokhov DV, Chizhikov V. Detection of mycoplasma contamination in cell substrates using reverse transcription –PCR assays. *J Appl Microbiol.* 2011; 110(1): 54-60.

139 Volokhov D, Kong H, George J, Anderson C, Chizhikov VE. Biological enrichment of Mycoplasma agents by cocultivation with permissive cell cultures. Applied and environmental microbiology. 2008; 74(17): 5383-5391.

11. ANEXO DE PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

AGUA CON DEPC

Disolver 100µl de DEPC en 100 mL de agua miliQ, para tener una concentración de 0.1%.

Incubar 12 horas en baño María a 37°C.

Inactivar la solución con DEPC en autoclave 15 minutos, 20 libras.

AMORTIGUADOR DE CARGA

1mM EDTA pH 8.0

0.25% azul de bromofenol

0.25% de xileno cianol

50% glicerol

ETANOL AL 75%

Disolver 75mL de etanol en 25mL de agua con DEPC.

GELRED® 1X

Disolver 30µl de GelRed a la 10,000X en 970µl de agua destilada.

HIDROLIZADO DE LACTOALBUMINA 5% (10x)

Disolver 5g de hidrolizado de lactoalbumina en 100mL de agua miliQ.

Esterilizar por Autoclave.

Utilizar al 0.5%

MEM.

Solubilizar 9.5 g de MEM en polvo en 1L de agua MQ.

Modificar el pH con una solución de bicarbonato de sodio al 10% hasta llegar a un pH 7.2.

Esterilizar por filtración con membrana de 0.2 micras.

Hacer alícuotas de 500 mL.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) pH 7.2

Disolver en 900 mL de agua tridestilada.

Cloruro de sodio (NaCl): 8.5 g

Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4): 1.1 g

Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4): 0.32 g

Ajustar el pH a 7.2.

Aforar a 1L.

Esterilizar en autoclave.

TAE 50X (Tris acetato EDTA) 242 g de Tris

57.1 mL de ácido acético glacial

100 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0

TAE 1X

Disolver una parte de TAE 50X en 49 partes de agua.