

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**“DETECCIÓN DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO POR  
MÉTODOS MOLECULARES”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
PRESENTA**

**JORGE GREGORIO LOZANO OROZCO**

**ASESOR**

**Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate**

**COASESOR**

**Dr. Carlos Gerardo García Tovar**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# *DEDICATORIAS*

*A MI FAMILIA:*

*MIS PADRES IRMA Y JOSE TOMAS*

*MIS HERMANOS CELIA, ENRIQUE, YULI, SAID E IRAIS*

*MIS TÍAS PACHÉCO: TERESA (MADRINA), SOLEDAD,  
EUGENIA Y FELÍCITAS*

*QUE ME HAN, APOYADO, IMPULSADO, GUIADO,  
ETC. EN TODA MI VIDA*

*GRACIAS!!*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A LU UNAM POR HABERME ALBERGADO Y FORMADO HASTA EL MOMENTO.*

*A MIS ASESORES: CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE Y GERARDO GARCÍA TOVAR POR HABERME ENCAMINADO Y AYUDADO EN LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.*

*A LOS PROFESORES QUE ME BRINDARON LOS CONOCIMIENTOS PARA LOGRAR ESTA META*

*A LA DRA. CEDILLO Y COMPAÑEROS DEL CINVESTAV QUE ME INICIARON EN EL INTERÉS POR LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.*

*A NOCHUAHQUEH MOB-CCT-MAH QUE FUERON PARTE FUNDAMENTAL EN MI DESARROLLO Y CRECIMIENTO DENTRO DE LA FES.*

*A TODOS MIS AMIGOS DE LA FES Y/O DE PARRANDAS, QUE FUERON LA PARTE COMPLEMENTARIA DE MIS ESTUDIOS.*

*A LOS PACIENTES QUE HE TENIDO A LO LARGO DE LA CARRERA QUE SIN ELLOS NO HUBIESE APRENDIDO LA PARTE PRÁCTICA.*

*ESTE TRABAJO SE REALIZÓ CON EL APOYO DE: PROYECTO PAPIIT IN202301 Y CÁTEDRA DE INVESTIGACIÓN EN "MORFOLOGÍA VETERINARIA Y BIOLOGÍA CELULAR" (IN1-30). SECCIÓN DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS AGROPECUARIAS, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTTLAN, UNAM.*

## INDICE

Lista de Abreviaturas .....	2
Resumen .....	3
Introducción .....	4
Justificación .....	10
Hipótesis .....	10
Objetivos .....	11
Material y Métodos .....	12
Resultados .....	17
Discusión .....	21
Conclusiones .....	24
Bibliografía .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **CSMP:** Células Sanguíneas Mononucleares Periféricas
- **DC:** Distemper Canino
- **DEPC:** Dietil-pirocarbonato
- **ELISA:** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a una Enzima
- **MMLV:** (Moloney Murine Leukemia Virus) Virus de Leucemia Murina  
Moloney
- **NP:** Nucleocápside
- **PCR:** (Polimerase Chain Reaction) Reacción en Cadena de la Polimerasa
- **RPMI 1640:** Medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute
- **RT:** (Reverse Transcriptasa) Transcriptasa Reversa

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia del virus de Distemper Canino (DC) en muestras de sangre completa obtenida de cachorros de 3 a 6 meses de edad con signos clínicos sugestivos de esta enfermedad utilizando las pruebas de RT-PCR y RT-PCR+PCR anidada. También se propuso determinar la sensibilidad de estas pruebas por medio de la cuantificación del ARN total para determinar el rango de diluciones en el que era posible obtener el amplificado esperado. Las 10 muestras utilizadas provenían de diferentes casos clínicos de la zona de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Los cuatro oligonucleótidos utilizados limitan la amplificación de una secuencia del gen de la nucleocápside (NP) de la cepa Onderstepoort del virus del DC (Yong Hwang, 2001). Con el fin de complementar este estudio, y poder correlacionar los resultados obtenidos en las pruebas moleculares, a los mismos animales se les realizó el diagnóstico de DC por medio de ELISA indirecta. De las 10 muestras procesadas; en ninguna se obtuvo el amplificado esperado después de la aplicación de la RT-PCR, por el contrario utilizando las pruebas asociadas de RT-PCR+PCR anidada se pudo obtener el amplificado esperado en seis muestras, las cuales también fueron positivas en la prueba de ELISA indirecta. Sólo en dos muestras se obtuvieron resultados distintos, ya que resultaron positivas en ELISA indirecta y negativas en la RT-PCR+PCR anidada. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede señalar; que estas pruebas son adecuadas para realizar el diagnóstico molecular del DC, que hay un aumento importante en la sensibilidad al utilizar la RT-PCR+PCR anidada con respecto al uso aislado de la RT-PCR y que se pudieron obtener resultados positivos a partir de una concentración mínima de 240 ng de ARN total.

## INTRODUCCIÓN

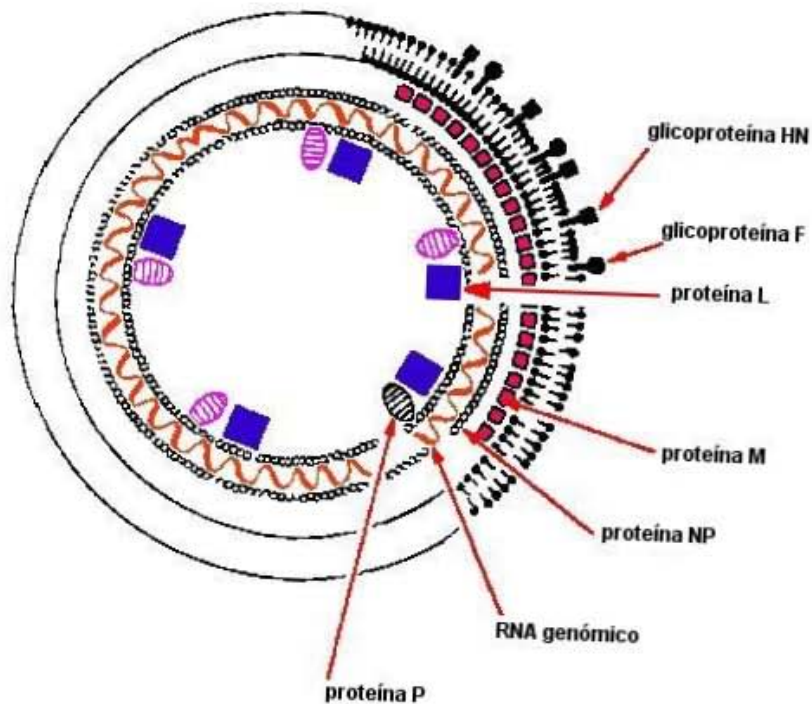
El Distemper Canino (DC) es una enfermedad viral multisistémica grave de los perros y otros carnívoros (Birchard y col., 2002), tiene un periodo de incubación de 3-7 días, es altamente contagiosa en perros jóvenes (3-6 meses de edad) y presenta alta morbilidad y mortalidad. Esta enfermedad se caracteriza por presentar, inicialmente, una fiebre difásica y rinitis aguda, y posteriormente, bronquitis, neumonía catarral, gastroenteritis severa y signos nerviosos (Yong Hwan y col., 2001; Frisk 1999).

### Características del virus

El virus del DC pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, la subfamilia *Paramyxovirinae* y al género *Morbillivirus* (Murphy y col., 1999). Es un virus relativamente grande (150-250 nm) con ARN de filamento único enrollado en simetría helicoidal, está rodeado por una envoltura de lipoproteína derivada de glucoproteínas del virus incorporadas en la membrana celular (Greene 2000, Vandeveld 1995, Chung 1999, Rzezutka y Mizak 2003). El virus es susceptible a la luz ultravioleta, a la resequedad y a temperaturas que van de 50-60° C y los procedimientos de desinfección con fenoles, cuaternarios de amonio, jabones, etc., lo destruyen eficazmente (Schaer 2003), generalmente sólo sobrevive unas cuantas horas y no más de unos pocos días fuera del huésped (Birchard y col., 2002). El virus del DC está muy relacionado con el virus del sarampión (VS), el virus de la peste bovina, virus de la peste de los pequeños rumiantes, virus del Distemper de la foca y virus del Distemper del delfín. Todos son clasificados como *Morbillivirus* dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Estos virus poseen envoltura y contienen una cadena simple de ARN de polaridad negativa y ARN polimerasa. La lipoproteína de la envoltura es fácilmente destruida por los solventes lipídicos y de este modo el virus pierde su capacidad infectiva. Las glicoproteínas H y F inducen la producción de anticuerpos neutralizantes (Appel y Summers 1999) (Fig. 1).



## Morfología



**Figura 1. Representación esquemática del virus de DC.** HN: actividad de hemoaglutinina y neuraminidasa. F: consiste de dos subunidades (F1 + F2) ligadas por enlaces disulfuro, es responsable de la fusión de la célula y tiene función hemolítica. M (**matriz**): proteína de envoltura. NP: nucleoproteína. L y P: actividad de polimerasa (Mahy 2001).

## Generalidades del Distemper Canino (DC)

Durante la primera mitad del siglo XX, el DC fue la enfermedad fatal en caninos más común en todo el mundo. Las vacunas inactivadas del virus del DC que estuvieron disponibles desde la década de los 40's, no controlaron la enfermedad. Un cambio drástico se observó en los años 60's, en su control, cuando aparecieron las vacunas de virus vivo modificado (VVM) (Appel y Summers 1999).

Esta enfermedad es enzoótica en todo el mundo y tiene un amplio rango de hospedadores. La mayoría de los carnívoros terrestres son susceptibles a la infección natural por el virus del DC. Todos los animales de la familia *Canidae* (perro, perro salvaje australiano, zorro, coyote, lobo, chacal), la familia *Mustelidae* (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armiño, marta y nutria), y la familia *Procionidae* (kinkajou, coatí, bassariscus, mapache,

panda rojo) pueden morir de la infección por DC. Recientemente se ha encontrado que los grandes felinos son también susceptibles a la infección y enfermedad por DC (leones, leopardos y tigres en California en 1992 y leones en Tanzania en 1994). Además, el virus del DC fue aislado de cerebros de pecaríes con signos clínicos de encefalitis (Birchard y col., 2002; Appel y Summers 1999; Chung y Maclachlan, 2004). En los últimos años ha afectado a otras especies como; la foca del Baikal, foca del Caspio, de la cual murieron más de 10,000 en el año 2000. También ha afectado al perro salvaje de África. Igualmente provocó la muerte de un tercio de los leones del Serengeti en 1994. Asimismo se ha visto que ha afectado a gatos, en donde aún no es clara la patogenia (Lednicky et al., 2004).

Los animales infectados eliminan el virus por todas las secreciones y excreciones corporales y la fuente primaria de exposición son los aerosoles. Normalmente, la eliminación viral cesa 1-2 semanas después de la recuperación, por tanto, la transmisión en la "fase de portador" no es un gran problema. La virulencia viral puede determinar la gravedad y el tipo de enfermedad clínica desarrollada, además del estado inmune del huésped, los perros no inmunes a la enfermedad de cualquier edad son susceptibles, pero la enfermedad es más común en cachorros de 3 a 6 meses de edad sin vacunar (Nelson 2000). Ciertos aislados, como las cepas Snyder Hill, A75/17 y R/252, son altamente virulentos y neurotrópicos (Greene 2000).

### **Patogenia**

Durante el primer día, se produce la infección de los macrófagos tisulares de las vías respiratorias altas; del día 2-4, la infección se extiende a los tejidos linfoides de las tonsilas palatinas y de los nodos linfáticos retrofaríngeos y traqueobronquiales; del 4-6, se extiende a los tejidos linfoides sistémicos y al hígado, bazo, nodos linfáticos de la cavidad abdominal y a la lámina propia del tracto gastrointestinal. Esto se corresponde con un pico de fiebre transitoria y el inicio de una leucopenia producida por el daño que el virus está ocasionando a los linfocitos T y B. Entre los días 6-9 se produce la viremia; del 8 al 9, el virus se disemina a los tejidos epiteliales (epiteliotropismo) y al sistema nervioso central (neurotropismo); del día 9-14, la evolución varía dependiendo de la respuesta inmunológica del huésped, y puede incluir recuperación, enfermedad clínica multisistémica grave o localización en el sistema nervioso central (SNC). Si la respuesta inmunológica es rápida y

eficaz, la infección es subclínica con una recuperación completa y la eliminación del virus sin enfermedad clínica (en el día 14 después de la infección). Se estima que más del 50% de las infecciones son subclínicas. Si el desarrollo de la respuesta inmunológica falla de los días 9-14, el resultado es una diseminación rápida y generalizada del virus a los tejidos epiteliales, al tracto respiratorio, al tracto gastrointestinal y al SNC que produce signos multisistémicos, un segundo pico de fiebre y un porcentaje de mortalidad elevado. Si la respuesta inmunológica es tardía o débil, se evitan los signos multisistémicos, pero la localización en el SNC puede originar encefalomiелitis crónica con retraso en la aparición de los signos neurológicos (Birchard y col., 2002).

### **Signos**

Los signos clínicos del Distemper Canino van de leves a severos, dependiendo de la cepa viral, factores ambientales y la respuesta del paciente a la infección. Los cachorros no vacunados son más susceptibles a los signos sistémicos, presentando neumonía, diarrea, deshidratación y anorexia. El vómito es común en los primeros estados de la infección (Schaer 2003). También es común observar formas leves de la enfermedad clínica y los signos incluyen apatía, pérdida de apetito, fiebre e infección de las vías respiratorias superiores. El exudado oculonasal seroso bilateral puede tornarse mucopurulento y ser acompañado por tos y disnea. Muchos perros con infección leve presentan signos comunes e indistinguibles de otros padecimientos como la “tos de las perreras” (Greene 2000). Los signos del SNC pueden aparecer simultáneamente con otros signos multisistémicos o pueden retrasar su aparición hasta la tercera semana, después de una aparente recuperación de la enfermedad sistémica. En algunos casos, las alteraciones al SNC pueden ser la única manifestación aparente de la infección (Birchard y col., 2002). Los signos neurológicos varían según el área del SNC afectada; es posible encontrar hiperestesia y rigidez cervical como resultado de inflamación meníngea, aunque suelen predominar signos en órganos parenquimatosos más que meníngeos. Son comunes las convulsiones, signos cerebelosos y vestibulares, paraparesia o tetraparesia con ataxia sensorial y mioclono. También podemos encontrar signos como hipoplasia del esmalte de los dientes que puede producirse cuando la infección sucede antes de la erupción de los dientes permanentes, así como, hiperqueratosis de las almohadillas plantares y dermatitis pustulosa abdominal (Birchard y col., 2002).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico del DC se basa principalmente en la sospecha clínica, apoyada por el antecedente característico de un cachorro de 3-6 meses de edad no vacunado o con vacunación inadecuada y posiblemente expuesto al virus. Los perros con afección grave casi siempre tienen signos clínicos característicos que permiten establecer el diagnóstico presuntivo (Greene, 2000; Yong Hwang, 2001; Birchard y col., 2002). En los casos sospechosos, suele ser útil el hemograma completo para evaluar la respuesta de los leucocitos. La linfopenia y trombocitopenia son anormalidades constantes (Nelson 2000). La presencia de anticuerpos específicos contra el virus del DC en líquido cerebroespinal (LCE) sirve para hacer el diagnóstico pero no siempre están presentes en todos los casos. En ocasiones pueden detectarse cuerpos de inclusión virales en linfocitos y células epiteliales. También se puede identificar el antígeno viral por inmunofluorescencia en las células sanguíneas, LCE, muestras citológicas y muestras congeladas de tejido. El aislamiento del virus, se realiza mejor en tejidos *postmortem* (Birchard y col., 2002). Se ha utilizado la prueba de ELISA para detectar anticuerpos IgG e IgM séricos contra el virus. La detección de IgG tiene poco valor, ya que no distingue la infección actual de la vacunación o una exposición previa, en tanto que la detección de anticuerpos IgM sugieren una infección reciente o vacunación (Birchard y col., 2002; Schaer 2003; Greene, 2000). Recientemente se han utilizado las pruebas moleculares como RT-PCR obteniendo una mayor sensibilidad y especificidad que las pruebas de detección de antígeno viral o anticuerpos (Ettinger y Feldman, 2005), aunque se han obtenido mejores resultados realizándola en combinación con una PCR anidada (Yong Hwang, 2001; Rzezutka y Mizak, 2002).

## **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Este término se aplica al proceso bioquímico realizado *in vitro*, mediante el cual las cadenas individuales del ADN blanco son duplicadas por una enzima (ADN polimerasa) en cada uno de los ciclos que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales, las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una producción exponencial de copias del gen o segmento del ADN sometido al proceso, esta reacción fue descrita y nombrada así por Mullis *et al* en 1987 (Barrera y col., 1993; Voet y Voet, 1995; Lo, 1998; Erlich, 1992).

La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores que limitan la región del ADN que se va a amplificar, es la responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN blanco. Al ser éste uno de los parámetros más importantes que determinan la especificidad de la PCR, su elección y diseño deben ser cuidadosos.

La enzima utilizada en esta reacción es la *Taq* polimerasa, la cual es una enzima termoestable con actividad de ADN-polimerasa y de exonucleasa. La mayoría de los protocolos recomiendan el uso de 1-2.5 unidades (U) de la enzima por cada reacción (Metzler, 1998; Morel y Raccurt, 2001). Para establecer la cantidad mínima de enzima requerida para una amplificación exitosa y generar cantidades óptimas del producto, deben realizarse titulaciones en rangos que van desde 0.5 a 5 U por reacción (Barrera y col., 1993). La versatilidad de esta técnica la ha convertido en uno de los métodos más ampliamente usados en diagnóstico molecular.

### **Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (RT-PCR)**

El nombre RT-PCR, indica que se trata de la amplificación de una secuencia de ARN a través de la síntesis de su ADN complementario (ADNc), que después es amplificado por PCR. Es decir no se obtienen copias de ARN de partida, sino de ADN, aunque mantiene la secuencia original del ARN. El proceso comienza con la síntesis de ADNc por la acción de la transcriptasa reversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, permaneciendo el ADNc unido al molde como dúplex ARN:ADNc. En una segunda etapa se desnaturaliza el dúplex y comienza la amplificación según el mecanismo de una PCR normal, la hebra de ADNc liberada actúa como molde para una segunda hebra de ADN y luego el dúplex se amplifica en ciclos sucesivos (Luque 2001; Morel y Raccurt, 2001; Lo, 1998; Metzler, 1998).

### **PCR Anidada**

En esta técnica, el producto obtenido de una PCR es reamplificado usando un segundo par de oligonucleótidos que corresponden con una secuencia que se localiza dentro del amplificado ya obtenido. La utilización de esta técnica aumenta de manera importante la sensibilidad de estas pruebas moleculares (Morel y Raccurt, 2001; Lo, 1998; Metzler, 1998).

## **JUSTIFICACIÓN**

El diagnóstico del Distemper Canino se hace generalmente en base a la historia y los signos clínicos, así como con pruebas de laboratorio, aunque en su forma aguda o subaguda es difícil diferenciarla de otras enfermedades como la "tos de las perreras" (Yong Hwang, 2001; Rzezutka y Mizak, 2002). Las pruebas de laboratorio son una herramienta útil en el diagnóstico de esta enfermedad, aunque con las que se cuenta (ELISA indirecta, Inmunofluorescencia) no son lo suficientemente sensibles y confiables (Yong Hwang, 2001; Rzezutka y Mizak, 2002). Por ello es importante desarrollar nuevas pruebas que nos brinden un diagnóstico rápido y confiable que permita proporcionar un tratamiento oportuno y eficaz a los animales afectados, entre las pruebas se destacan aquellas basadas en métodos moleculares, las cuales tienen una alta sensibilidad y especificidad, por lo que se hace necesario realizar trabajos destinados a conocer los elementos básicos para realizar estas pruebas (RT-PCR y PCR anidada).

## **HIPÓTESIS**

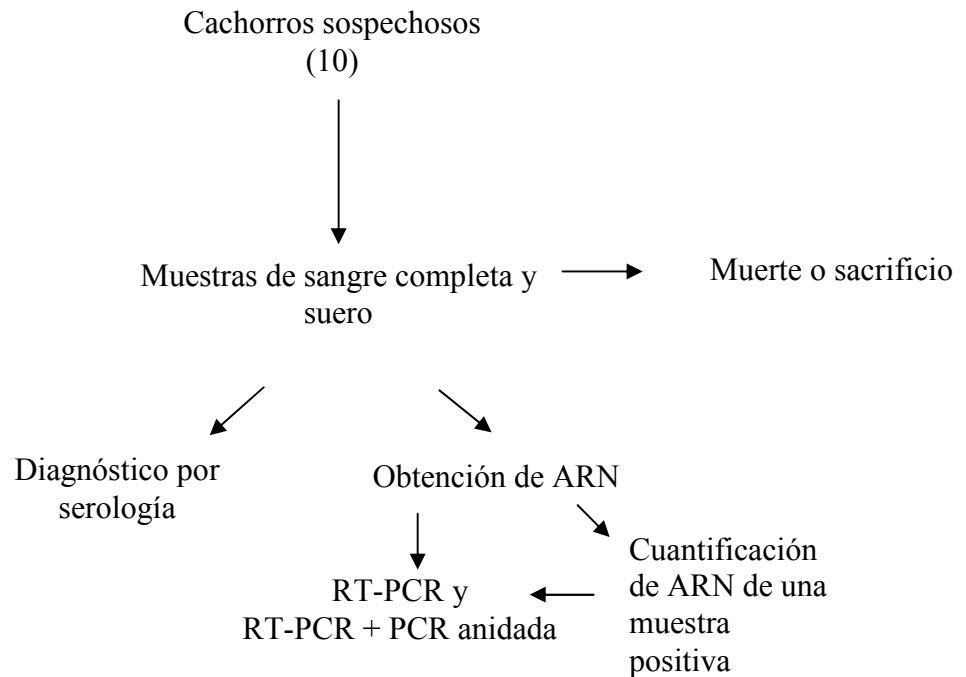
La estandarización de la RT-PCR y su uso combinado con PCR anidada como métodos para detectar la presencia del virus de Distemper Canino en muestras de sangre completa de animales infectados, permitirá contar con una herramienta que podría ser útil para el desarrollo de una prueba de diagnóstico más rápida, sensible y específica que las usadas en la actualidad.

## **OBJETIVOS**

- a. Estandarizar y desarrollar las reacciones de RT-PCR, combinándola con la PCR anidada con el fin de detectar la presencia del virus de Distemper Canino en muestras de sangre completa de animales infectados.
  
- b. Determinar la diferencia en sensibilidad al aplicar estas metodologías para la detección del virus de manera aislada (RT-PCR) y combinada (RT-PCR + PCR anidada).
  
- c. Cuantificar el ARN para determinar el rango de concentraciones en el que es posible obtener el amplificado esperado en la RT-PCR y con la PCR anidada.

## MATERIAL Y METODOS

### Diseño experimental



#### a. Muestras

Se utilizaron muestras de sangre completa con anticoagulante (EDTA al 2%) y sangre sin anticoagulante (para la obtención de suero) de cachorros que mostraban signos clínicos sugestivos de Distemper Canino. Estas muestras fueron obtenidas de 10 perros de 3 a 6 meses de edad, sin antecedentes de vacunación, con signos clínicos de la enfermedad aguda de Distemper Canino, los cuales provenían de casos clínicos detectados por médicos de la zona de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Como control negativo se utilizaron muestras de sangre con y sin anticoagulante proveniente de un animal clínicamente sano sin antecedentes de vacunación y como control testigo se tomaron células Vero infectadas con el virus de Distemper Canino, el cual fue donado por el Dr. Guillermo Valdivia Anda (FES-Cuautitlán, UNAM).



## **b. Preparación de las muestras**

Primero se mezclaron 5 ml de sangre completa con 7.5 ml de medio RPMI (Gibco). Posteriormente en un tubo Falcon de 50 ml se agregaron 7.5 ml de Ficoll y por encima de él y con mucho cuidado para evitar que se mezclaran, se añadió la mezcla de la sangre con el RPMI. Se centrifugó a 2,000 rpm (Centrífuga Hermle, rotor 220.87 V03/4) durante 20 minutos y retiró la fase intermedia (células sanguíneas mononucleares periféricas-CSMP-) con pipeta pasteur. Después se transfirieron las CSMP a un nuevo tubo Falcon de 15 ml y se agregó un volumen igual de RPMI (3-4 ml). Se centrifugó a 1,300 rpm durante 10 minutos. Finalmente se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 2 ml de RPMI.

El cultivo de células Vero fue infectado con el aislado viral y mostraron efecto citopático a los 30 días postinfección (Lednicky y cols. 2004), después fue cosechado el virus y mantenido a -20°C para su uso posterior.

Las muestras de suero se remitieron al laboratorio Diagnostico Integral Veterinario (DIVET) con el fin de realizar el diagnóstico de Distemper Canino por ELISA indirecta.

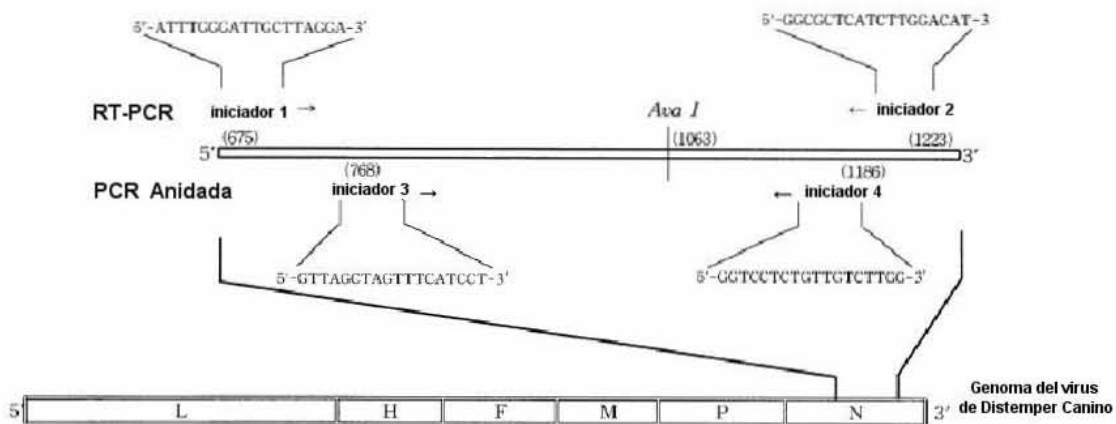
## **c. Obtención del ARN**

Con el fin de obtener el ARN total se agregaron 500 µl de las muestras de CSMP a tubos Ependorf de 1.5 ml identificados o 500 µl del virus obtenido del cultivo de células Vero. Se agregó 1 ml de TRIzol (Invitrogen, Cat. 15596-026) y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitaron los tubos por inversión manual durante 15 minutos y se incubaron por 2 a 3 minutos a TA. Consecutivamente, se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a TA (al finalizar este paso encontramos en la fase acuosa el ARN, en la fase intermedia el ADN y en la fase orgánica los restos celulares), se transfirió la fase acuosa a un tubo Ependorf nuevo y se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico, después se agregó 1 µl de glicógeno libre de ARNsas (Gibco, 20 mg/ml) y se incubó por 10 minutos a TA. Se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm por 15 minutos a TA y se eliminó el sobrenadante. Se levantó el pelet de ARN que quedó en el fondo del tubo con 1 ml de Etanol al 75 % frío y entonces la muestra fue lavada con vórtex vigoroso. En este paso se puede almacenar el ARN a 4° C por una semana o a -20° C hasta por un año. Si se va a utilizar inmediatamente continuar con los siguientes pasos.

Se centrifugó la muestra a 10,000 rpm por 5 minutos a TA, se eliminó el sobrenadante y se permitió que el etanol se evaporara completamente. No se debe tocar el pelet de ARN. Finalmente, el pelet de ARN fue disuelto en 10 µl de agua destilada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC). Estas muestras fueron utilizadas en la reacción de transcriptasa reversa en los 10 días subsiguientes sin ningún problema.

#### d. Amplificación del gen de la Nucleocápside del virus de Distemper Canino

Para los ensayos de RT, PCR y PCR anidada se utilizaron dos pares de oligonucleótidos (figura 2) que limitan una secuencia específica del gen de la nucleocápside (NP) de la cepa Onderstepoort del virus de Distemper Canino (Yong-Hwan y col. 2001), en el caso de los iniciadores 1 y 2 limitan la amplificación de un fragmento de 549 pb, mientras que el fragmento limitado por los iniciadores 3 y 4 es de 419 pb. Para la realización de este trabajo los oligonucleótidos mencionados se mandaron sintetizar a una compañía comercial (Accesolab).



**Figura 2. Oligonucleótidos empleados como iniciadores en las reacciones de RT, PCR y PCR anidada.**

En la reacción de RT se utilizó el iniciador 2 y la enzima transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen, cat. 28025-013), la síntesis de ADNc se realizó mediante incubación a 37°C por 50 minutos y, posteriormente, la enzima fue desnaturalizada a 72°C por 15 minutos.

Todas las reacciones fueron realizadas en un termociclador TechGene (mod. FT Gene 2D) y las concentraciones y condiciones de amplificación para la RT, PCR Y PCR anidada se muestran en las tablas 1-3.

Reactivos	Solución Stock	Concentración final	Volumen
Amortiguador	5x	1x	4 µl
Deoxinucleótidos	2 mM c/u	0.5 mM c/u	5 µl
Iniciador 4	50 pM	2.5 pM	1 µl
Enzima RT	200 U/µl	200 U	1 µl
ARN (aprox.)	60 ng/µl	1.5ng/µl	5 µl
Agua (cbp)	--	--	20 µl

**Tabla 1. Concentración de los reactivos utilizados en la prueba de transcriptasa reversa (RT).**

Reactivos	Solución Stock	Concentración final	Volumen
Amortiguador	10x	1x	5 µl
Cloruro de Magnesio	50 mM	1.5 mM	1.5 µl
Deoxinucleótidos	2 mM c/u	0.25 mM c/u	6.3 µl
Iniciador 3*	50 pM	1 pM	1 µl
Iniciador 4*	50 pM	1 pM	1 µl
Iniciador 1	50 pM	1 pM	1 µl
Iniciador 2	50 pM	1 pM	1 µl
Taq polimerasa ♦	5 U/µl	2.5 U	0.5 µl
ADNc	ND	ND	5 µl
Agua (cbp)	--	--	50 µl

\*Iniciadores para la PCR anidada. ND: no determinado.

♦ Invitrogen, cat. 11615-010.

**Tabla 2. Concentración de los reactivos utilizados en las pruebas de PCR y PCR anidada.**

Etapas	No. de ciclos	Condiciones
Desnaturalización inicial	1	94°C por 3 minutos
Desnaturalización	30	94°C por 30 segundos
Alineamiento	30	54°C por 30 segundos
Amplificación	30	72°C por 1 minuto
Amplificación final	1	72°C por 10 minutos

(Yong Hwan y cols. 2001)

**Tabla 3. Condiciones empleadas en las reacciones de PCR y PCR anidada.**

#### **e. Cuantificación de ARN**

Con el fin de determinar la sensibilidad de estas prueba se cuantificó el ARN total procedente de una de las muestras positivas (muestra No.1) en un espectrofotómetro (marca Jenway) y se realizaron las diluciones necesarias para tener las siguientes cantidades totales de ARN: 240, 120 y 60 ng, a partir de las cuales se realizaron las pruebas moleculares.

#### **f. Visualización de los amplificados**

Todos los amplificados obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio, finalmente fueron visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. La detección del virus se basó en la obtención de un amplificado que corresponde con el número de pares de bases esperado (549 pb en RT-PCR y 419 pb en RT-PCR + PCR anidada).

## RESULTADOS

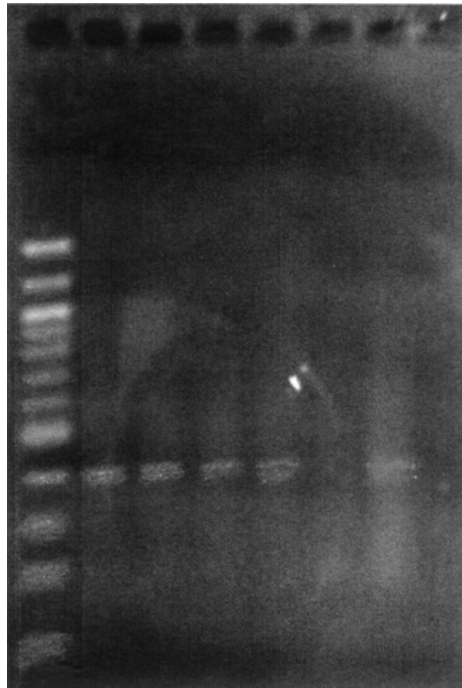
### a. Resultados de la RT-PCR

Con el fin de conocer si la aplicación de las pruebas moleculares de RT-PCR son capaces de detectar eficientemente la presencia del virus de DC en muestras de sangre desarrollamos las pruebas de RT-PCR en las diez muestras analizadas en este estudio. De las muestras procesadas en ninguna se obtuvo el amplificado buscado, sólo en la muestra positiva. Por lo que se decidió realizar la PCR anidada.

### b. Resultados de la PCR anidada.

Para realizar la PCR anidada se tomaron 5 µl del resultado de la reacción de RT-PCR y se preparó la reacción de PCR anidada con las mismas concentraciones usadas previamente, con la diferencia de que en esta reacción se utilizaron un par de iniciadores que se localizan dentro de la región amplificada en la RT-PCR. De las diez muestras se obtuvieron seis resultados positivos (figura 3 y 4).

Pares  
de  
bases  
(pb)



**Figura 3. Detección del gen NP del virus del DC por RT-PCR + PCR anidada.**  
Carriles 1-5 muestras de animales sospechosos; P, control testigo; N, control negativo.  
M<sup>1</sup>: marcador Biolabs 100 (No. catálogo N3231S).

(pb)



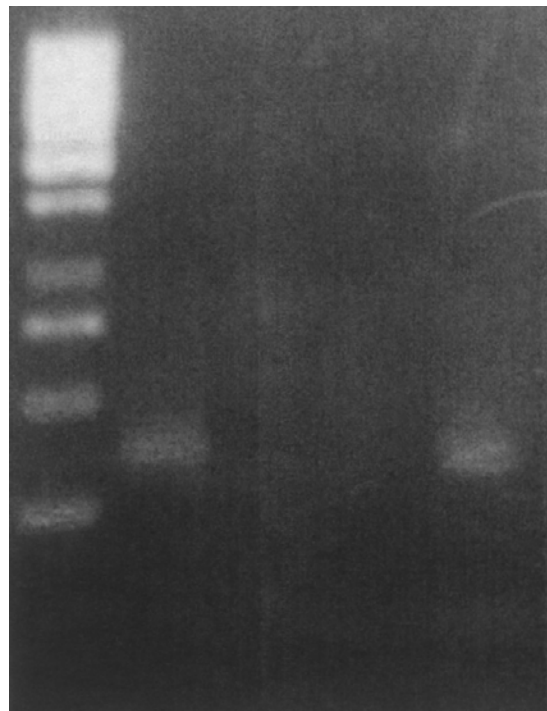
**Figura 4. Detección del gen NP del virus del DC por RT-PCR + PCR anidada.**  
Carriles 6-10 muestras de animales sospechosos; P, control testigo; N, control negativo.  
M<sup>1</sup>: marcador Biolabs 100 (No. catálogo N3231S).

#### **c. Determinación de la sensibilidad.**

Con el fin de determinar la sensibilidad de estas pruebas moleculares se decidió cuantificar el ARN obtenido y realizar tres diluciones (240, 120 y 60 ng) a partir de las cuales se desarrollaron las pruebas moleculares de RT-PCR y PCR anidada bajo las mismas

condiciones que se utilizaron anteriormente en este trabajo. Al desarrollar las reacciones de RT-PCR las tres diluciones utilizadas dieron resultados negativos y en la PCR anidada sólo se pudo obtener el amplificado esperado en la dilución que contenía 240 ng de ARN (Figura 5).

(pb)



**Figura 5. Detección del gen NP del virus del DC por RT-PCR + PCR anidada a partir de cantidades conocidas de ARN. Carril 1, 240 ng; carril 2, 120 ng; carril 3, 60 ng; N, control negativo; P, control testigo. M<sup>2</sup>: Marcador Fermentas (No. catálogo sm0313).**

#### **d. Resultados de Serología**

Dentro de los objetivos iniciales de este trabajo se planteó corroborar por otras pruebas la certeza de los hallazgos, así es que junto con la sangre completa, también se obtuvieron muestras de suero, dichas muestras fueron enviadas al laboratorio DIVET con el fin de que se desarrollara la prueba de Elisa Indirecta para detectar la presencia de anticuerpos contra el virus de DC. Como resultado de esta prueba se determinaron 8 muestras positivas de las 10 muestras trabajadas.

<b>Muestras</b>												
<b>Pruebas</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>Testigo</b>	<b>Negativo</b>
<b>RT-PCR</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>PCR anidada</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-
<b>ELISA Indirecta</b>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	*ND	-

\* No Determinado.

**Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos en las pruebas moleculares y en la ELISA indirecta.**



## DISCUSIÓN

El diagnóstico de DC se hace generalmente en base a la historia y a los signos observados y en la actualidad se suele apoyar normalmente este diagnóstico clínico con la prueba de ELISA indirecta. Sin embargo, las pruebas moleculares brindan la posibilidad de efectuar un diagnóstico más confiable y rápido, además de ser tan sensibles que permiten el diagnóstico a partir de muestras como; secreciones oculares y/o nasales, sangre, orina, etc. (Frisk et al, 1999; Yong Hwang, 2001).

En todo trabajo experimental es fundamental elegir adecuadamente las muestras a estudiar y disponer de controles adecuados, por este motivo se decidió hacer este trabajo con muestras de sangre provenientes de perros sospechosos de DC de entre 3 y 6 meses de edad, es necesario aclarar que ninguno de los individuos mostraba signos inequívocos de DC. En cuanto a los controles; se utilizó como control testigo un cultivo de células Vero infectado con una cepa silvestre del virus de Distemper Canino y como control negativo la sangre de un animal clínicamente sano.

Es necesario señalar que para desarrollar las pruebas moleculares utilizadas en este trabajo (RT-PCR y PCR anidada) es fundamental obtener una cantidad adecuada de ARN ya que de no contar con el mínimo necesario no es posible obtener ningún tipo de amplificado, por este motivo se decidió obtener el ARN a partir de células sanguíneas mononucleares periféricas. Adicionalmente a la cantidad, es necesario considerar la integridad del ARN ya que como se sabe es un ácido nucleico que se degrada fácilmente por lo que es necesario obtener el ARN siguiendo estrictas medidas de manejo y seguridad. Con el fin de lograr resultados consistentes nos aseguramos de seguir el mismo procedimiento en todas las muestras de sangre procesadas y con las células Vero infectadas (control testigo).

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede señalar que se logró la amplificación de una porción específica del gen NP en las células infectadas con el virus (RT-PCR), las condiciones empleadas fueron utilizadas con las muestras provenientes de los animales sospechosos y con dichas muestras no se consiguió ningún tipo de amplificado, esto se puede atribuir a la escasa cantidad de ARN que se tenía, ya que al asociar a la RT-PCR con la PCR anidada se logró obtener el amplificado de 419 pb en seis muestras.

La hipótesis de la poca cantidad de ARN se pudo comprobar al hacer los ensayos para determinar la sensibilidad de estas pruebas ya que se repitieron los mismos resultados; esto es, sólo se obtuvo amplificado con la asociación de la RT-PCR + PCR anidada y únicamente en la muestra que contenía la mayor cantidad de ARN.

Para conocer la cantidad de ARN total a partir de la cual fue posible obtener un amplificado, se realizaron tres diluciones y sólo se encontró un amplificado a partir de la solución que contenía 240 ng de ARN, cabe mencionar que esta cantidad corresponde al ARN total y que no se sabe que porción corresponde al ARN viral. Realizar la diferenciación del ARN viral implica una serie de pasos adicionales que retardarían el desarrollo y la implementación de estas pruebas por lo que se decidió considerar la cantidad total de ARN y dar a conocer las condiciones y cantidades bajo las cuales se realizaron estas pruebas que de acuerdo con los resultados obtenidos se infiere que son adecuadas para ser utilizadas en el diagnóstico molecular de DC.

Adicionalmente a lo anterior, también pudimos tener ADN en la muestra de ARN, lo cual implica que la lectura obtenida está sobrevalorada, esto se puede solucionar tratando nuestra solución con ADNasa, solo que al momento de realizar estos experimentos no pudimos disponer de esta enzima. Se sugiere que en futuros estudios realizar extracciones de ARN de un cultivo de células vero infectadas con el virus de DC y de otro cultivo sin infectar, cuantificar el ARN (tratado previamente con ADNasa) y por diferencia obtener el ARN viral y posteriormente realizar las diluciones, esto con el fin de determinar el ARN viral y conocer la concentración necesaria para conseguir el amplificado.

Para entender la aparente disparidad encontrada, en un par de muestras, entre los resultados obtenidos en este trabajo y los reportados por el laboratorio DIVET, se debe considerar que la prueba de ELISA Indirecta detecta la presencia de anticuerpos y no la del virus por lo que se debe interpretar que los perros reportados positivos presentan un alto nivel de anticuerpos lo cual no necesariamente se relaciona con la presencia del virus en sangre o con la infección (Crowther, 2001; Birchard y col., 2002; Schaer 2003; Greene, 2000). Por otra parte la ausencia de amplificado en esas mismas muestras se puede achacar a que no se obtuvo una cantidad adecuada de ARN como ya se discutió previamente o a que en un momento dado dicho ARN pudiera haberse degradado por lo cual no permitió la

amplificación (Morel y Raccurt, 2001; Ausubel, 1999). Es necesario señalar que para la extracción de ARN sólo se utilizaron los linfocitos, por lo que con el fin de obtener una mayor cantidad de ARN viral se recomienda usar la capa flogística dado que el virus de DC también se encuentra en monocitos, macrófagos y neutrófilos.

Para el desarrollo de la RT-PCR y PCR anidada se utilizaron dos pares de oligonucleótidos que limitan una secuencia específica del gen de la nucleocápside (NP) de la cepa Onderstepoort del virus de Distemper Canino. Estos oligonucleótidos fueron usados originalmente por Yong Hwan y col. (2001), a pesar de lo cual existían dudas acerca de su utilidad en el sentido de que hay estudios que demuestran la variabilidad antigénica y patógena del virus (Lednicky y col., 2004), además de la presencia de diferentes cepas y variantes del virus de DC distribuidas en el mundo. Al obtener el amplificado esperado con los oligonucleótidos diseñados por Yong Hwan y cols. (2001) nos permite comprobar que las cepas utilizadas en dicho estudio son genéticamente análogas a las estudiadas en esta tesis, aunque esto no indica que no existan otras cepas del virus en el país, ya que sólo se utilizaron muestras de la zona de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. No hay datos reportados acerca de la prevalencia de las diferentes cepas del virus del DC en nuestro país, puede ser que no estén identificadas o bien que no se haya hecho este estudio que sin embargo será importante abordar en futuros estudios.

El hacer posible la amplificación de regiones genéticas específicas del virus de DC posibilita la realización de ensayos que generen conocimientos sobre la epidemiología molecular de este virus que permitirán identificar las cepas específicas de este virus prevalentes en nuestro país.

## CONCLUSIONES

- ✓ La aplicación aislada de la RT-PCR no fue capaz de detectar la presencia del virus de DC en ninguna de las muestras trabajadas.
- ✓ La estandarización de estas pruebas y el uso exitoso de los oligonucleótidos reportados por Yong Hwan y cols. (2001) posibilita su uso como método de diagnóstico para la enfermedad de Distemper Canino.
- ✓ Al determinar la sensibilidad de estas pruebas pudimos comprobar que es importante obtener una mayor cantidad de ARN con el fin de desarrollar adecuadamente las pruebas moleculares.
- ✓ Determinamos que 240 ng de ARN total es la cantidad mínima necesaria a partir de la cual es posible la amplificación de un fragmento de 419 pb del gen NP del virus de DC con la aplicación de la RT-PCR + PCR anidada.

## BIBLIOGRAFÍA

- Appel M., Summers B. Distemper Canino: Present State. Publisher: International Veterinary Information Service. In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, Carmichael L (editor) USA. 1999.
- Ausubel FM., Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl E. Short protocols in molecular biology. Wiley.USA. 1999. Chapter 4. pp1-3
- Barrera SHA, Ortiz LR, Rojas MA, Reséndez PD. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Ciencia y Desarrollo. 1993. pp50-61.
- Birchard S, Sharding R. Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. McGraw-Hill Interamericana, 2da. Ed. Vol. 1. 2002. pp123-126.
- Chung YZ, Maclachlan N. Paramyxoviridae, Filoviridae and Bornaviridae. In: Dwight CH y Chung YZ (editors). Veterinary Microbiology. Blackwell Science Inc. USA. 2004. pp369-375.
- Crowther. ELISA. Theory and Practice. Humana Press. USA. 2001. pp89-95.
- Erlich H. PCR Technology. Oxford University Press. USA. 1992. pp1-5.
- Ettinger S, Feldman E. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Elsevier Saunders. 6<sup>th</sup> edition. Vol. 1. USA. 2005. 649-650.
- Frisk AL, König M, Moritz A, Baumgartner W. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein ARN by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. J Clin Microbiol. 1999. (37) 11:3634-3643.
- Greene C. Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. McGraw-Hill Interamericana. 2da. Ed. 2000. pp11-23.
- Lednick JA, Dubach J, Kinsel MJ, Meehan TP, Boccheta M, Hungerford LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid M, Pedrak K, Houde C. Genetically Distant American Canine Distemper Virus Lineages Have Recently Caused Epizootics with Somewhat Different Characteristics in Raccoons Living Around a Large Suburban Zoo in the USA. J Virol. 2004. 1:2.
- Lednick JA, Meehan TP, Kinsel MJ, Dubach J, Hungerfor LL, Sarich NA, Witecki KE, Braid MD, Pedrak C, Houde CH. 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. J. Virol Methods. 2004. 118:147-157.
- Lo D. Clinical Application of PCR. Humana Press. USA. 1998. 3-9, pp101-102.

- Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Harcourt. España. 2001. pp187-196.
- Mahy B. A Dictionary of Virology. Academic Press. 3rd. edition, USA. 2001. pp293-294.
- Morel G, Raccurt M. PCR/RT-PCR in Situ Light and Electron Microscopy. CRC Press. USA. 2001. pp5-10.
- Murphy F. Veterinary Virology. Academic Press, 3rd. edition, USA. 1999. pp411-416.
- Nelson R. Medicina Interna de Animales Pequeños. Intermédica. 2da. Ed. Argentina. 2000. pp1373-1376.
- Rzesutka A, Mizak B. Application of N-PCR for Diagnosis of Distemper in Dogs and Fur Animals. Vet. Microbiol. 2002. 88:95-113.
- Rzesutka A, Mizak B. Sequence analysis of the fragment of the phosphoprotein gene of Polish distemper virus isolates. Arch Virol. 2003. 148: 1623-1631.
- Schaer M. Clinical Medicine of the Dog and Cat. Iowa State Press. 2003, pp80-81.
- Vandevelde M, Zubriggen A. The Neurobiology of Canine Distemper Infection. Vet. Microbiol. 1995. 44:271-280.
- Voet D, Voet J. Biochemistry. John Wiley and Sons. 2<sup>nd</sup> edition. USA 1995. pp896,pp904-906.
- Yong-Hwan K, Kyu-Woan C, Hwa-Young, Han S, Hong RH. Detection of Canine Distemper Virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. J. Vet. Sci. 2001. (2) 1:59-63.