

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA PARA  
EL DIAGNÓSTICO DE DISTEMPER CANINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**CINDY FERNANDA LÓPEZ HUERTA**

Asesores:

Dra. Laura Cobos Marín

MVZ. Raymundo Iturbe Ramírez

México, D.F.

2009



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.

Al Alfa y Omega

## **APRENDI.**

Aprendí que los paradigmas están ahí por la ausencia de nuevas formas...

Entendí que la ignorancia nos vuelve temerarios...

Aprendí que la voz del sentido común puede ser una compañera silenciosa...

Entendí al silencio como lenguaje...

Aprendí a aprender lo que no me ensañaron...

Entendí que aprender es crear nuevas dudas...

Aprendí que el inicio influye en el final...

Entendí que cada final es un inicio...

Aprendí a vivir insatisfecho, pero gozando agradecido lo que tengo...

Entendí que la satisfacción debe ser pasajera...

Aprendí a entender...

*GRCM (2009)*

## AGRADECIMIENTOS

Al dador de la vida, principio y fin...nada hay fuera de Él.

A mi Madre, porque mayor que las diferencias es el Amor que me has brindado todos estos años, gracias por creer y confiar en mí y por instruirme en el camino.

A la Dra. Myrna Vicencio M., por recibirme con brazos y corazón abiertos, por ser ejemplo en dedicación y por ser maestra.

A la Dra. Laura Cobos Marín, por ser inspiración y ejemplo, por la oportunidad de trabajar con usted y aprender de usted.

A la Dra. Rosa Elena Miranda Morales, por adoptarme una temporada y por darme la primera oportunidad de estar frente a un grupo.

A Alejandra Hernández Herrera, por tu amabilidad y compañía, por animarme en los días en que no todo salía bien, por tu disposición y por siempre tener listo el material que necesitaba.

A Gabriel Campos (Gabo), sin tu ayuda con el análisis de los resultados no hubiera llegado a la discusión, serás silvestre pero nunca común y siempre serás mi maestro de Genética, aunque ya seas doctor.

A mi queridísimo editor, Gabriel Paredes, sin ti seguiría enredada en mis ideas y definitivamente todo hubiera sido más doloroso, desesperante y frustrante. Un "gracias" no alcanza, pero que más te digo... ¡tq!

A mis amigas, Laura, Ale, Mariana, Tania, Cynthia y a mis mariposas, por llegar en el momento indicado.

A mis compañeros de virología, con ustedes el trabajo es mucho más disfrutable.

A todos los que de muy diversas formas contribuyeron a la realización y conclusión de este trabajo, en especial a mi Tía Toña y a mi Abuela Licha, aunque ya no están.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
Epizootiología.....	2
Características generales del virus.....	4
Patogenia.....	6
Semiología.....	9
Lesiones.....	10
Diagnóstico.....	10
Tratamiento.....	13
Control.....	13
Justificación.....	14
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares.....	15
Material y métodos.....	15
1. Estandarización de la prueba de IP para la detección del virus de DC en cultivo celular.....	16
1.1. Cultivo celular.....	16
1.2. Determinación de la presencia viral mediante la técnica de RT- PCR.....	17
2. Prueba de IP para la detección del virus de DC en muestras de animales con diagnóstico clínico de distemper canino.....	24
Resultados.....	25
1. Estandarización de la prueba de IP para le detección del virus de DC en cultivo celular.....	25

1.1.	Cultivo celular.....	25
1.2.	RT-PCR.....	26
1.3.	Estandarización en microplacas.....	27
2.	Prueba de IP para la detección del virus de DC en muestras de animales con diagnóstico clínico de distemper canino.....	27
2.1.	Resultados de la prueba de IP en los controles y muestras.....	27
2.2.	Información de los pacientes.....	29
2.3.	Análisis estadístico.....	36
	Discusión.....	37
	Conclusiones.....	39
	Referencias.....	40

## **RESUMEN**

LÓPEZ HUERTA CINDY FERNANDA UTILIZACIÓN DE LA PRUEBA DE INMUNOPEROXIDASA PARA EL DIAGNÓSTICO DE DISTEMPER CANINO (BAJO LA DIRECCIÓN DE : DRA. LAURA COBOS MARÍN Y MVZ. RAYMUNDO ITURBE RAMÍREZ).

El Distemper Canino (DC) es una enfermedad viral multisistémica de distribución mundial que se conoce desde 1760 y se presenta principalmente en cachorros, animales viejos y adultos sometidos a tensión o a intensa actividad física, así como en individuos inmuno-deprimidos. Constituye una de las enfermedades más relevantes y graves entre los caninos y otras especies silvestres, por lo que es importante confirmar su diagnóstico clínico con pruebas de laboratorio eficaces, a fin de establecer manejos y tratamientos adecuados.

En este trabajo se utilizó la prueba de inmunoperoxidasa para el diagnóstico de DC en 149 casos de perros y un hurón con diagnóstico clínico de distemper canino comparándola después con la prueba de inmunofluorescencia; se obtuvo una correspondencia del 92% y no se encontró una diferencia estadística significativa<sup>1</sup>, por lo que se concluye que la inmunoperoxidasa es una prueba adecuada y eficiente para el diagnóstico de DC.

---

<sup>1</sup>( $P < 0.05$ ),  $K = 0.9179$

## **INTRODUCCIÓN**

El distemper canino (DC) es una enfermedad viral multisistémica de distribución mundial que se conoce desde 1760. Se presenta principalmente en cachorros, animales viejos y adultos sometidos a tensión o a intensa actividad física, así como en individuos inmuno-deprimidos, y es una de las enfermedades más graves e importantes en los caninos y en otras especies.<sup>1</sup>

Debido a las similitudes morfológicas de los cambios neuropatológicos provocados por el virus de DC y enfermedades desmielinizantes en humanos tales como la esclerosis múltiple, es un modelo de estudio de la patogénesis de la pérdida de mielina asociada a mecanismos inmunomediados<sup>2</sup>. Más aún, la eliminación linfoide y la prolongada disminución de la respuesta inmune en las infecciones por distemper son comparables a las ocasionadas por infección con el virus de Sarampión.

### *Epizootiología*

---

Este padecimiento tiene una morbilidad de entre el 25% y 75%, una mortalidad de entre el 50% y 90% y afecta a un amplio rango de hospederos que incluye a cánidos, félidos, mustélidos y mamíferos marinos, entre otros, provocando desórdenes digestivos (diarrea, gastroenteritis), respiratorios (rinitis, neumonías), cutáneos (hiperqueratosis del plano nasal, de los cojinetes, y dermatitis pustular) y nerviosos (ataxia, incoordinación, convulsiones)<sup>3,4,5</sup>. La inmunosupresión y la leucoencefalitis desmielinizante son las principales secuelas en perros<sup>6,7,8,9</sup>.

No se ha comprobado una predisposición por raza, pero se menciona que hay una menor incidencia, mortalidad y secuelas en los animales braquicefálicos con respecto a los dolicocefálicos y que en las razas greyhound, alaskan malamute y siberian husky se presentan más casos<sup>10</sup>. El virus puede eliminarse durante 60 a 90 días y encontrarse en células epiteliales hasta por 3 semanas postinfección<sup>11</sup>.

Se sospecha de perros y lobos como transmisores del agente en algunos brotes de DC hacia focas y grandes felinos de parques y reservas<sup>12,13</sup>. Hasta ahora se reconoce un solo serotipo de DC y varios genotipos con diferente virulencia y tropismo<sup>14,15,16,17,18,19,20</sup>.

Algunas cepas están relacionadas con la polioencefalitis (Snyder Hill-CDV) mientras que otras inducen una leucoencefalitis desmielinizante (R252 y A75-17-CDV<sup>21,22</sup>).

Aunque la enfermedad se ha controlado mediante el uso de vacunas, la aparición de variantes del virus y los informes de casos aun en animales vacunados<sup>23</sup>, en México y otros países, resaltan la necesidad de continuar aislándolo en casos positivos vacunados, estudiar dichos aislamientos y comparar su inmunogenicidad con la de las cepas vacunales<sup>24</sup> que se utilizan actualmente, (Haas et al., 1997; Iwatsuki et al., 2000; Uema et al., 2005) ya que entre cepas vacunales y las aisladas de campo se ha encontrado diversidad genética (principalmente en la hemaglutinina, la proteína de fusión y la nucleoproteína) que puede provocar un cambio antigénico<sup>25</sup> asociado al aumento en la incidencia y la presentación de la enfermedad en individuos vacunados.

## Características generales del virus

El virus del DC es un virus envuelto, RNA de cadena simple en sentido negativo enrollado en simetría helicoidal, que codifica para 6 proteínas estructurales: la nucleocápside (N), la fosfoproteína (P), la proteína grande (L), la proteína matriz (M), la hemaglutinina (H), y la proteína de fusión (F)<sup>26</sup> (figura 1). Pertenece al género Morbillivirus y a la familia Paramyxoviridae, tiene un tamaño aproximado de 150-250nm de diámetro. Es susceptible a la luz ultravioleta, fenoles, cuaternarios de amonio, jabones, calor y desecación. Se inactiva por exposiciones de al menos 30 minutos a temperaturas de 50 a 60 °C<sup>27</sup>.

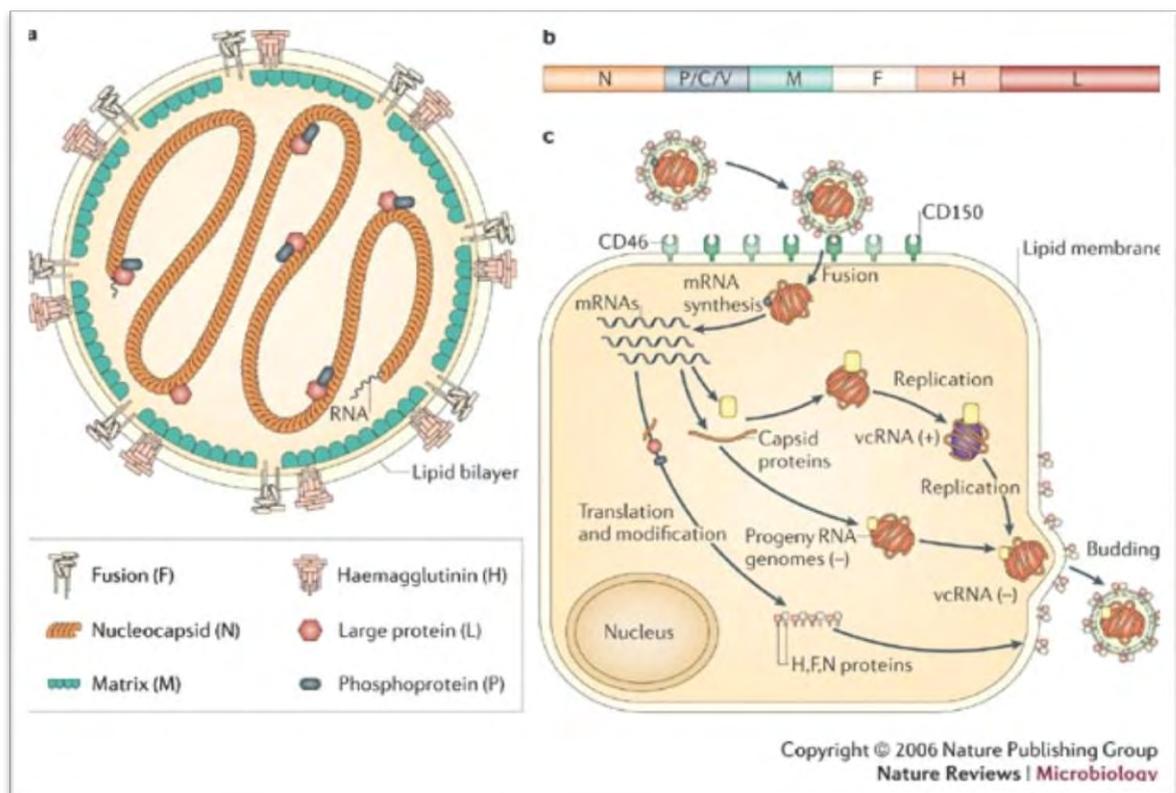


figura 1. Estructura del virus de distemper canino Nature Reviews Microbiology 2006

Componente.	Abreviatura.	Peso molecular.	Función.
Envoltura:			
Hemaglutinina	H	76	Estructural-unión viral.
Proteínas de matriz	M	34	Estructural-penetración.
Proteína de fusión 1	F <sub>1</sub>	40	Estructural-penetración.
Proteína de fusión 2	F <sub>2</sub>	20-13	Estructural-penetración.
Nuclear:			
Proteína grande	L	180-200	Funcional-complejo de polimerasa.
Polimerasa	P	66	Funcional-complejo de polimerasa.
Nucleocápside	N	58	Estructural-protecte el genoma.

**Cuadro 1 Componentes estructurales del virus de distemper canino tomado de Greene Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos (2000)**

### *Patogenia.*

La infección ocurre vía inhalación de aerosoles, que introduce el virus en el tracto respiratorio.

Días Post-infección (PI)

- 1 La infección se inicia en el tracto respiratorio y macrófagos alveolares.
- 2 El virus es transportado a los nodos linfáticos bronquiales y tonsilas.

- 3-6 En este periodo el virus, asociado a células mononucleares, es llevado vía sanguínea (viremia primaria) a la médula ósea, bazo, timo, ganglios linfáticos cervicales y mesentéricos, tejido linfoide asociado a mucosas, macrófagos en la lámina propia del estómago e intestino delgado y células de Kupffer. La viremia sucede por la dispersión de partículas virales libres, así como por partículas asociadas a leucocitos y trombocitos.
- 5 Multiplicación viral en el sistema linfoide invadido, lamina propia intestinal y células de Kupffer, lo que genera la necrosis del tejido linfoide con sus consecuentes manifestaciones (leucopenia); primera etapa febril.
- 7-9 Segunda viremia con células mononucleares infectadas y partículas virales libres: tiene como resultado la infección de células parenquimales y de todos los tejidos del cuerpo, es por esto que el virus de DC puede encontrarse en células vasculares (incluyendo fibroblastos y trombocitos), bronquiales, endoteliales, epiteliales, neuroectodermales, del tracto respiratorio, digestivo y urinario, del sistema endocrino, del sistema nervioso central y de tejido linfoide<sup>28</sup>. Esta viremia continúa durante varios días (frecuentemente asociada con fiebre alta) y el virus es eliminado incluso por perros que no presentan signos clínicos.
- 14 Se consideran tres posibles escenarios que dependen de la respuesta celular y humoral del hospedero que, a su vez, determina parcialmente el grado de propagación y distribución del virus.
  - La producción de anticuerpos neutralizantes y la respuesta citotóxica mediada por células alcanzan niveles suficientes, por lo que la

infección es controlada rápidamente y no se presentan signos clínicos evidentes.

- La respuesta del sistema inmune es deficiente o nula, la propagación continúa afectando el epitelio intestinal, respiratorio, urogenital, piel, glándulas exócrinas, endocrinas y sistema linforeticular; la enfermedad es multisistémica grave con signos gastrointestinales (vómito, enteritis de catarral a hemorrágica, deshidratación, desequilibrio electrolítico y ácido-base), cutáneos (hiperqueratosis, dermatitis pustular) y respiratorios (bronquitis y algunas veces neumonía), lo que puede terminar en muerte.
- Respuesta intermedia: El virus permanece de manera prolongada en tejidos epiteliales y predispone a una enfermedad crónica de la sustancia blanca. En la encefalitis crónica hay incremento de anticuerpos antimielina como reacción secundaria al proceso inflamatorio. Además, puede presentarse un aumento de los anticuerpos neutralizantes intratecales, los cuales activan macrófagos infectados y producen la liberación de radicales libres que destruyen las células oligodendrogliales<sup>29</sup>.

El virus entra al Sistema Nervioso Central (SNC) ya sea como partículas virales solas o en relación con linfocitos, penetra las células endoteliales de las meninges, y llegue hasta las células endodiales que recubren el sistema ventricular y así alcanza el líquido cefalorraquídeo (LCR). El curso depende de la edad, respuesta inmune del hospedero y propiedades neurotrópicas e inmunosupresoras del virus.

La encefalitis aguda ocurre en animales jóvenes o con inmunosupresión. El virus causa lesiones multifocales en la sustancia blanca y gris debido a la infección y necrosis neuronal produciendo polioencefalomalacia. En la sustancia blanca es característica la desmielinización no inflamatoria de las lesiones agudas relacionada con la infección viral de los macrófagos y células astrogiales más que las oligodendrogiales, que son las que producen la mielina.

Los animales afectados presentan ataxia, temblores, mioclonos y convulsiones que, dependiendo de la intensidad, pueden dejar secuelas o conducir a la muerte. Una forma de encefalitis crónica, también conocida como “encefalitis del perro viejo”, se presenta progresivamente en perros mayores de 6 años de edad, sus signos incluyen marcha compulsiva en círculos, cambios de conducta, pérdida de la vista, vocalizaciones y escasa respuesta a estímulos ambientales.

La enfermedad multisistémica por lo general dura de 2 a 4 semanas con una mortalidad de entre el 50% y 100%, sobre todo en cachorros menores a las 6 semanas de vida que tienen escasa protección materna.

Los perros que se recuperan con mínimas repercusiones son aquellos que tienen una respuesta humoral y celular eficiente, es decir, aquellos con una producción suficiente de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas nucleares P y NP entre los 6 y 8 días post-infección (DPI), y contra proteínas de envoltura H y F, 10 a 20 DPI detectados por medio de ELISA o Inmunoprecipitación. La respuesta inmune mediada por células aparece 10 a 14 DPI.

## *Semiología*

---

- Fiebre transitoria de 3 a 6 días PI, con o sin leucopenia; estos signos pueden pasar desapercibidos o presentarse junto con anorexia y depresión. La fiebre persiste por varios días antes de que se presenten descargas nasales serosas, secreción ocular mucopurulenta.
- Los signos respiratorios y gastrointestinales son los más frecuentes y suelen complicarse con infecciones bacterianas debido a la leucopenia.
- Se presentan también hiperqueratosis de los cojinetes, del plano nasal, dermatitis pustular en muslos, abdomen y cara interna de las orejas.
- Durante el desarrollo de los dientes permanentes el virus de DC infecta los ameoblastos ocasionando hipoplasia del esmalte.
- Uveítis anterior, neuritis óptica con pupilas dilatadas sin respuesta, zonas circunscritas de hiperreflexia.
- Los signos neurológicos frecuentes incluyen:
  - 1) Movimientos involuntarios de un músculo o grupo de músculos tales como los de la pierna o faciales: mioclonos, espasmo flexor e hiperquinesia;
  - 2) Movimientos voluntarios exagerados;
  - 3) Paresis o parálisis (más notorio en los miembros pélvicos en forma de ataxia) seguida de tetraparesia y tetraparálisis;
  - 4) Salivación y movimientos de masticación.

Si los episodios se hacen más frecuentes y severos, se pueden presentar movimientos de carrera, así como pérdida del control para orinar y defecar.

El curso de la manifestación sistémica puede ser de 10 días, pero la presentación inicial de los signos neurológicos puede tardar varias semanas o incluso meses.

### *Lesiones*

---

- Atrofia del timo;
- Bronconeumonía;
- Enteritis;
- Necrosis de tejido linfático;
- Neumonía intersticial;
- Cuerpos de inclusión citoplasmáticos e intranucleares en epitelio respiratorio, urinario y gastrointestinal.
- Degeneración, necrosis y desprendimiento de la retina
- Degeneración neuronal, gliosis, desmielinización, congestión perivascular, leptomeningitis no supurativa y cuerpos de inclusión principalmente en células de la glía.

### *Diagnóstico*

---

Considerando que algunos signos aparecen cuando la enfermedad está ya muy avanzada y que el DC puede confundirse con infecciones multisistémicas

ocasionadas por otros agentes virales (como hepatitis infecciosa canina), bacterianos (como leptospira), protozoarios (neospora, coccidia, toxoplasma) y químicos (plomo y organofosforados) que provocan los mismos signos, es importante confirmar el diagnóstico clínico con pruebas de laboratorio, a fin de establecer un manejo y tratamiento adecuados. Se debe considerar al DC como diagnóstico diferencial en cachorros no vacunados con manifestaciones sistémicas, cuadros febriles, anorexia y depresión. De confirmarse la enfermedad, debe ponerse en cuarentena al paciente para evitar la diseminación de la enfermedad e iniciar el tratamiento con antibióticos para combatir las infecciones secundarias.

La confirmación del diagnóstico clínico se realiza determinando la presencia del virus mediante el aislamiento viral<sup>30</sup>; con pruebas serológicas o con pruebas moleculares que detecten la presencia del virus, entre las que se pueden mencionar:

- a) La inmunofluorescencia directa (IF), en la que muestras de frotis nasal, conjuntival o vaginal se incuban con anticuerpos antidistemper (policlonales o monoclonales) marcados con fluoresceína;
- b) La inmunohistoquímica (IHQ)<sup>31,32,33</sup>, en la que se utiliza un anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal o policlonal antidistemper) y un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano o alguna otra enzima. Para esta prueba se utilizan biopsias de piel a fin de confirmar el diagnóstico antemortem, y cortes de diversos tejidos para diagnóstico postmortem. Esta es una prueba confiable, sensible y específica, pero su utilidad para confirmar diagnóstico antemortem está limitada por el tipo de muestras que requiere;

c) La inmunocromatografía (IC)<sup>34</sup>, prueba que tiene el mismo principio que la ELISA sándwich, con la diferencia de que la reacción se lleva a cabo en papel cromatográfico por capilaridad. Se utilizan dos anticuerpos específicos para el antígeno de interés, uno de ellos se inmoviliza en el papel y el otro se marca con oro coloidal y se infiltra en la almohadilla de la muestra. Dado que el líquido de la misma migra rápidamente a través de la membrana, es posible detectar la presencia o ausencia del antígeno en 15 minutos. La limitante de los kits de cromatografía es la elevada cantidad de antígeno que se necesita para obtener una línea visible;

d) La transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), al detectar porciones específicas de material genético del virus, tiene un alto grado de sensibilidad, pero ello depende del tipo y calidad de la muestra, el método de extracción del ácido ribonucleico (ARN) y la elección de los iniciadores; además, es técnicamente laboriosa y requiere de 4 a 8 horas para un resultado<sup>35,36,37,38</sup>.

Otro método es por pruebas serológicas, midiendo anticuerpos en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) entre los días 7 al 12 post exposición<sup>39,40</sup>, con técnicas como la ELISA<sup>41,42,43</sup> para detectar IgG e IgM, la inmunofluorescencia indirecta, la Inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) y la seroneutralización<sup>44,45</sup>. Las pruebas serológicas no resultan muy útiles para el diagnóstico de la enfermedad debido a que la inmunosupresión causada por el virus puede provocar un retraso en la respuesta humoral o la ausencia de la misma, amén que un alto título de anticuerpos no es necesariamente producto de una infección en curso; para determinar si un título alto de anticuerpos se debe a una infección activa se debe realizar un monitoreo. La detección de

títulos altos de IgG antidistemper en LCR en pacientes con cuadro clínico neurológico es indicativa de una encefalitis por distemper, ya que los anticuerpos se producen de forma local y no se presentan aumentos de IgG antidistemper en LCR de pacientes vacunados o con manifestaciones sistémicas de la enfermedad; sin embargo, la presencia de anticuerpos en LCR depende de el curso de la enfermedad y la respuesta del paciente. En general las pruebas serológicas son más funcionales para valorar la adecuada respuesta a la vacunación<sup>46,47</sup> o para dar un pronóstico que para el diagnóstico de una infección activa.

### *Tratamiento*

---

El tratamiento va encaminado al control de infecciones bacterianas secundarias, para lo que se utilizan: antibióticos de amplio espectro, terapia de fluidos para el control del balance hídrico-electrolítico, suplementos alimenticios, alimentación parenteral, antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios y anticonvulsivos. El uso de antivirales no es muy accesible, pero se encuentran en desarrollo tratamientos basados en la acción inmunomoduladora de diversos fármacos.

No existe un tratamiento que asegure una recuperación completa, algunos pacientes tendrán secuelas (principalmente contracciones tónico-clónicas). Hay casos en que las manifestaciones sistémicas son tan severas que a pesar de los cuidados intensivos no se logra una respuesta favorable y el cuadro termina con la muerte del animal. Cuando los signos neurológicos son graves se recomienda la eutanasia.

---

## *Control*

---

Desde 1960 la enfermedad se controla mediante la inmunización con vacunas de virus activo modificado; sin embargo, existen factores ambientales propios de los inmunógenos y sus formas de aplicación que han favorecido la prevalencia de la enfermedad en la población canina. A partir de 1994 se han presentado y reportado brotes, aun en animales vacunados, en diferentes países. Lo anterior sugiere que actualmente la diversidad genética entre el virus de campo y las cepas utilizadas en las vacunas afecta la inmunogenicidad y antigenicidad de las mismas.

## ***Justificación***

Con la finalidad de ofrecer un diagnóstico más eficiente, es decir, en el menor tiempo y con la mayor certidumbre posible, se busca implementar pruebas con menor tiempo de realización, mayor especificidad y, de ser posible, menor costo. Algunas de las pruebas utilizadas para confirmar el diagnóstico de DC requieren de equipos e insumos especiales que aumentan su costo y disponibilidad, otras requieren entre 7-20 días para su realización, lo que las hace poco útiles cuando se necesita un resultado rápido.

A diferencia de la IF, en la IP sólo se utiliza un microscopio óptico para la interpretación, pero tiene una sensibilidad similar y la marca color café-rojizo que da la reacción, permanece estable durante meses.

En este trabajo se propuso determinar la presencia del virus de DC en muestras sanguíneas y de impronta conjuntival mediante la prueba de IP, y evaluar su uso como una prueba alternativa en el diagnóstico de distemper canino, para lo cual se siguieron la hipótesis y objetivos y se utilizaron el material y métodos que a continuación se enuncian; con base en lo cual se llegó a los resultados que se describen más adelante, para posteriormente hacer un análisis de los mismos en el apartado de discusión y llegar a conclusiones propias.

## ***Hipótesis***

La prueba de IP determinará la presencia del virus de distemper canino en muestras sanguíneas y de impronta conjuntival de animales con diagnóstico clínico de la enfermedad de igual manera que la IF.

### ***Objetivo general***

Implementar la prueba de inmunoperoxidasa en muestras de sangre e improntas conjuntivales de animales con diagnóstico clínico de distemper canino y evaluar su uso como prueba alternativa en el diagnóstico de la misma.

### ***Objetivos particulares***

- Establecer las condiciones óptimas para la realización de la prueba de IP utilizando células vero infectadas con cepas vacunales para posteriormente utilizar la técnica en muestras de pacientes con diagnóstico clínico de la enfermedad.
- Comparar los resultados con la prueba de IF y establecer la correspondencia entre ambas.

## **Material y métodos**

Para establecer las condiciones óptimas de realización de la prueba se hicieron ensayos infectando células VERO con dos cepas virales: Snyder Hill y Lederle. Se utilizaron también diferentes tiempos de incubación, número de lavados, y soluciones de lavado y sueros para posteriormente realizar la prueba en muestras de sangre e impronta conjuntival de animales con diagnóstico clínico de DC.

### **1. Estandarización de la prueba de IP para la detección del virus de DC en cultivo celular.**

#### **1.1. Cultivo celular**

Para corroborar la capacidad de infección de las cepas virales utilizadas, primero se propagó el virus en células VERO crecidas en botellas de poliestireno con un área de cultivo de 25cm<sup>2</sup> en medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) suplementado con suero fetal bovino (5%) a una confluencia del 90%.

Se retiró el MEM por decantación; se realizó un lavado con 2ml de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y una vez retirado el PBS, se hizo un lavado con 2ml de tripsina retirándola después por decantación; se agregó tripsina nuevamente (0.5ml) y se colocó en la incubadora a 37°C durante 3-5 minutos para desprender las células.

Las células se re-suspendieron en 5 ml de medio sin suplementar y se trasladaron 2.5ml de la mezcla a una botella nueva. A cada botella se le agregó 1ml de las cepas de referencia (Lederle y Snyder Hill respectivamente) y se

incubaron a 37°C durante una hora agitando suavemente cada 10 minutos. Posteriormente se agregaron 8.5ml de medio suplementado a cada botella y se mantuvieron en incubadora a 37 °C, hasta observarse efectos citopáticos. Células VERO sin infectar fueron mantenidas en las mismas condiciones que las infectadas como testigo negativo.

### ***1.2. Determinación de la presencia viral mediante la técnica de RT- PCR.***

---

Además de observar el efecto citopático en cultivos celulares infectados con la cepa Lederle y a otro infectado con la cepa Synderhill, así como a los respectivos cultivos testigos (no infectados), se realizó la extracción de ARN a dichos cultivos utilizando 2.0ml de trizol por cada botella de 25cm<sup>2</sup> a la que previamente se le retiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS estéril. También se procesó una muestra de encéfalo positivo a DC por IF para posteriormente utilizarlo como control positivo de la prueba de IP al trabajar las muestras clínicas; se utilizó 1.0ml de trizol por 100mg de muestra mezclándolos en el homogeneizador. Luego de incubar durante 5 minutos en hielo, se agregaron 220µl de cloroformo frío agitando manualmente durante 15 segundos, para después incubar durante 5 minutos en hielo y, finalmente, se centrifugó a 12000G por 15 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante (fase acuosa) sin interfase y se colocó en un tubo nuevo al que se agregaron 520µl de Isopropanol mezclando por inversión y se dejó incubar durante 20 minutos en hielo, pasado lo cual se centrifugaron los sobrenadantes a 12000G durante 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y a la pastilla de ARN se le agregó 1ml de etanol al 80% mezclando suavemente para luego centrifugarla a 7500G durante 5 minutos a 4°C. Se retiró todo el etanol y se dejó secar la pastilla durante 5 minutos en la campana de flujo laminar, una vez seca se re-

suspendió la pastilla de ARN en 15µl de agua destilada con Dietil Pirocarbonato (DEPC) y se incubó en baño maría durante 10 min a 50°C.

Después de solubilizar el ARN, se cuantificó por espectrofotometría para realizar el RT-PCR en un solo paso con 1µg de ARN por muestra. La mezcla de reacción se preparó en la campana de flujo laminar como se muestra a continuación. La secuencia de los iniciadores utilizados se muestra en el cuadro 3.

Reactivo	Cantidad (µl)
2X Reaction Mix	25
RNA	X(1µg)
Primer 1	1
Primer 2	1
RT/ Platinum® Taq Mix	1
Agua destilada	Ajustar a 50
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>

*Cuadro 1 Mezcla de reacción para RT-PCR en un solo paso*

Sentido	Secuencia	# pares de bases
sentido	5' TCA TGA AGT GTG ACG TGG ACA TC3'	22pb
antisentido	5' CTC TCC TGT GCC CTT TTT AAT GG3'	23pb

*Cuadro 2 Iniciadores utilizados para la RT-PCR<sup>48</sup>*

Luego de preparar la mezcla de reacción, las muestras se colocaron en el termociclador para la amplificación según el programa mostrado en el cuadro 4.

Nombre del ciclo	Temperatura °C	Tiempo	Numero de ciclos
RT	42	1hora	1
Desnaturalización	94	1min 30s	35
Alineamiento	56	2min	
Extensión	72	1min 30s	
Extensión final	72	7min	1

*Cuadro 3 Ciclos de la RTPCR para amplificar un fragmento de 696pd del gen de la fosfoproteína del virus de DC*

Una vez concluida la RT-PCR, el producto amplificado se visualizó por electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 2% a los que se les aplicó una descarga de 80 volts durante 45 minutos, posteriormente los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (10µg/ml) y se obtuvieron imágenes con el fotodocumentador.

### **1.3. Estandarización de la prueba de IP en microplacas**

---

Para determinar la dilución de trabajo del anticuerpo y la proteína A peroxidada, se realizaron varios ensayos en microplacas.

- Se utilizaron 4 microplacas de 96 pozos para cada cepa.
- Se realizaron diluciones del virus de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$
- A cada pozo se le agregó una cantidad constante de células VERO (50,000 células /100µl).
- La infección de las células se realizó de forma simultánea a la siembra en la micro placa adicionando a los pozos de las columnas 1, 4, 7 y 10, 100µl de medio y a los pozos de las columnas 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11 y 12, 100µl de medio con virus de DC

- Las microplacas se sellaron e incubaron a 37° C, se revisó el estado de las células diariamente y se fijaron al observar el efecto citopático en ellas.

### *Fijación de microplacas.*

Una vez observado el efecto citopático en las células infectadas, las placas se fijaron con el siguiente protocolo:

- Retirar el medio de las placas por inversión.
- Sumergir la micro placa en un recipiente que contenga solución amortiguadora de fosfatos al 0.01M y desechar inmediatamente por inversión de la microplaca (2 veces).
- Sumergir la microplaca en un recipiente que contenga acetona al 30% durante 10 min.
- Retirar la solución fijadora (por inversión) y sacudir la microplaca sobre un material absorbente para eliminar los residuos de la solución.
- Secar la micro placa a 37° C durante 2 hrs y congelar a -30°C para su uso posterior.

## *Prueba de los sueros testigo*

En estas placas se probaron diferentes diluciones del suero positivo, del negativo y del conjugado, para establecer las diluciones de trabajo, con tiempos de incubación de 60 y 30 minutos.

Se añadieron 100µl de suero antidistemper a cada pozo para después incubar 30 minutos<sup>1</sup> a 37°C. Después de la incubación se lavó con PBS y se agregaron 100µl de la proteína A peroxidada, se incubó nuevamente durante 30 minutos a 37°C, se realizó un segundo lavado con PBS, posteriormente, se agregaron 100µl de sustrato (solución de revelado), realizando un último lavado con PBS 5 minutos después. Como una última prueba de las condiciones bajo las que se trabajaron posteriormente las muestras de pacientes con diagnóstico clínico de distemper canino, se utilizaron también cultivos de células VERO 96 horas PI y sin infectar en Lab-Tek™ Chamber Slide™ System de ocho pozos.

## *2. Prueba de IP para la detección del virus de DC en muestras de animales con diagnóstico clínico de distemper canino.*

Se emplearon muestras recibidas en el laboratorio de virología del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM durante los meses de marzo y abril de 2009, para diagnóstico de DC mediante IF. Las muestras fueron de perros de diferentes edades, sexo, estado de vacunación y signos clínicos.

---

<sup>1</sup> Se probaron diferentes tiempos de incubación (1 hora, 40 minutos, 30 minutos) a 37°C sin una diferencia aparente, por lo que se estableció como tiempo de incubación 30 minutos.

Se incluyeron como testigos una impronta de encéfalo positivo a distemper por IF, confirmado por RT-PCR y una impronta de encéfalo negativo a distemper por IF.

En el caso de muestra sanguínea, se realizó primero el frotis, para después continuar con el mismo procedimiento que para las muestras de conjuntiva como se describe a continuación:

- Delimitar del área a trabajar con lápiz diamante
- Fijar la muestra en acetona al 30% durante 30 minutos
- Agregar 100 µl de suero positivo 1/20
- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos
- Lavar con PBS 2 veces
- Agregar 100µl de proteína "A" peroxidada 1/400
- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos
- Lavar con agua destilada 2 veces
- Agregar 100µl de solución de revelado
- Esperar 3 minutos
- Lavar con agua destilada
- Dejar secar, y
- Observar al microscopio

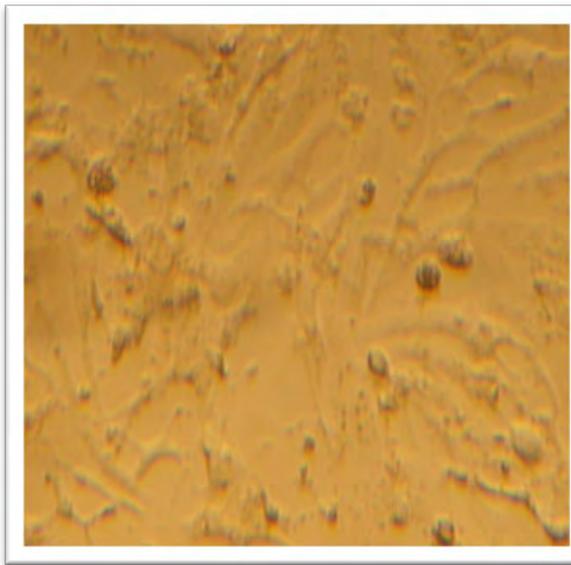
Una vez registrada la lectura de la prueba se comparó el resultado de la prueba de IP con el obtenido mediante IF. La prueba de IF fue realizada por el responsable del diagnóstico virológico y el suplente del diagnóstico virológico del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ según el manual de métodos de prueba.

## **Resultados**

### **1. Estandarización de la prueba de IP para la detección del virus de DC en cultivo celular.**

#### *1.1. Cultivo celular*

Se observó efecto citopático en las células inoculadas con la cepa Lederle a partir de las 72 horas, mientras que con la cepa Snyderhill se observaron después de las 96 horas PI. Como testigo negativo se conservaron células VERO sin infectar mantenidas en las mismas condiciones que las infectadas.



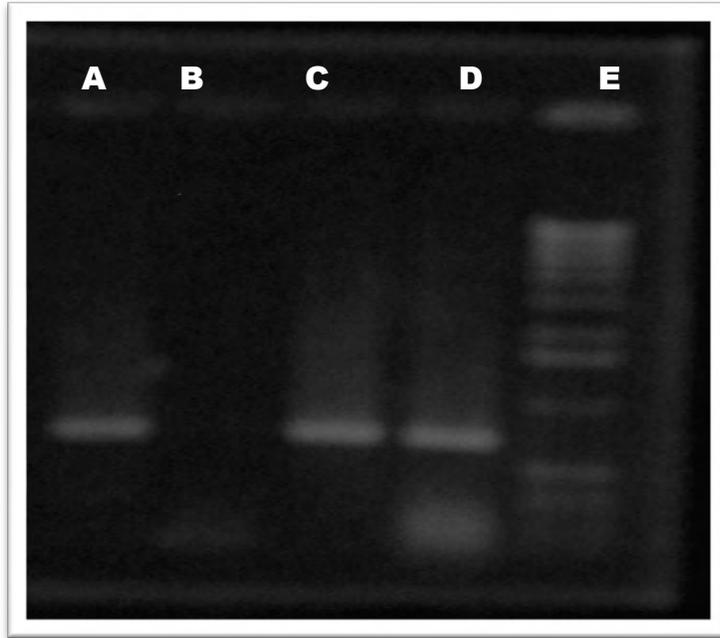
*figura 1 Células VERO 72horas PI*



*figura 2 Células VERO sin infectar*

#### *1.2. RT-PCR*

Se amplificó el fragmento de 696pb de los cultivos celulares infectados con las cepas Lederle y Snyderhill, así como del encéfalo que se utilizó como control positivo al trabajar las muestras clínicas.



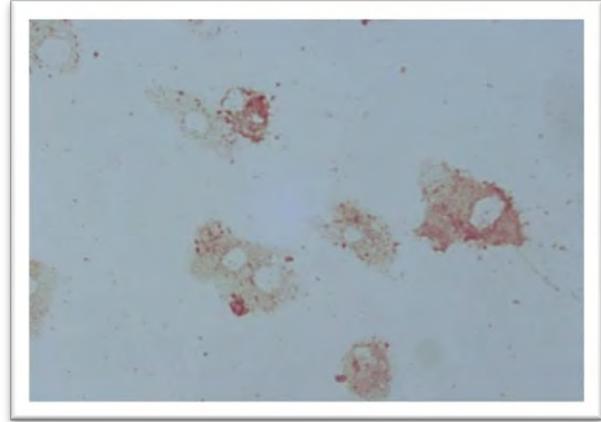
*figura 3 Productos de 696pb amplificados mediante RT-PCR. carril A encéfalo; carril B testigo negativo; carril C células vero infectadas con VDC cepa Lederle; carril D células vero infectadas con la cepa Snyderhill; carril E marcador.*

### *1.3. Estandarización en microplacas*

Después de probar las diferentes combinaciones de diluciones de anticuerpo, conjugado, tiempos de incubación y lavados en células VERO inoculadas con DC y en células no infectadas (testigo), se estableció una dilución de trabajo para el anticuerpo de 1:20 y del conjugado 1:400 con tiempos de incubación de 1 hora y 30 minutos para observar la marca en las células infectadas con ambas cepas de DC.



*Figura.4 IP en células VERO no infectadas*

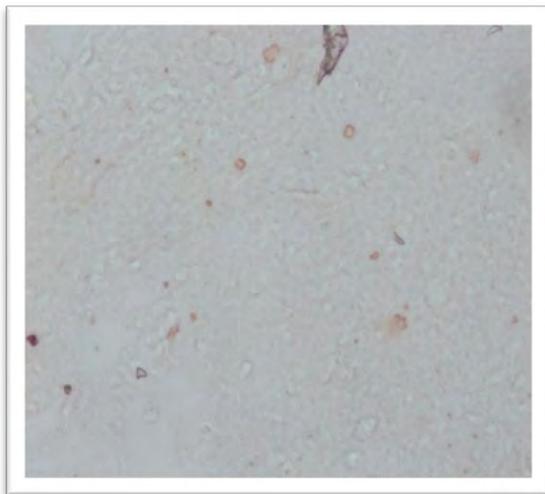


*figura 5. IP en células VERO infectadas*

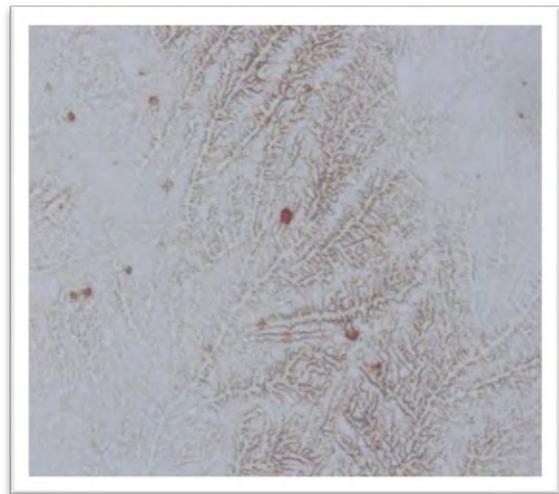
## ***2. Prueba de IP para la detección del virus de DC en muestras de animales con diagnóstico clínico de distemper canino.***

### ***2.1. Resultados de la prueba de IP en los controles y muestras***

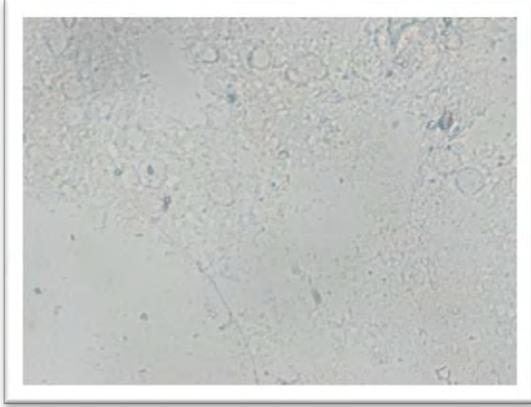
Cada vez que se realizó la prueba de IP en muestras clínicas, se incluyeron una impronta de encéfalo positivo a distemper por IF y RT-PCR (figura 7 y 8) y una impronta de encéfalo negativo a distemper por IF (figura 9 y 10).



*figura 6. Encéfalo positivo*



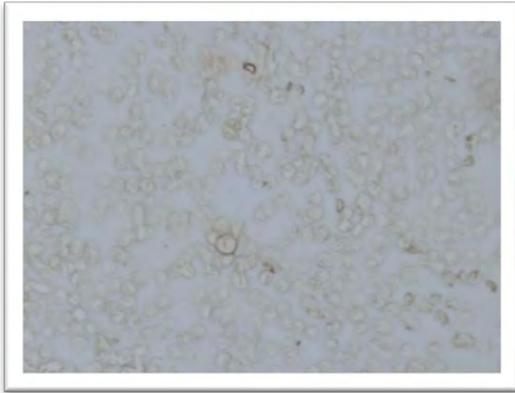
*figura 7. Encéfalo positivo*



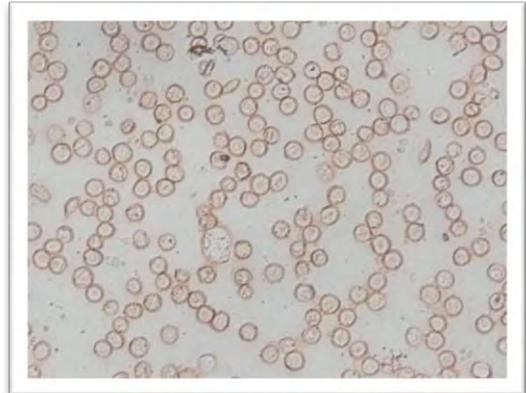
**Figura 1. IP en control negativo**



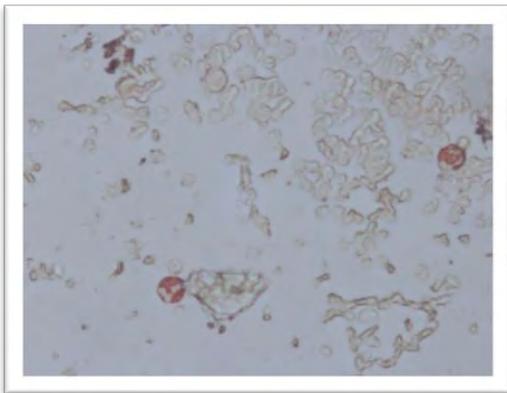
**Figura 2. IP en control negativo**



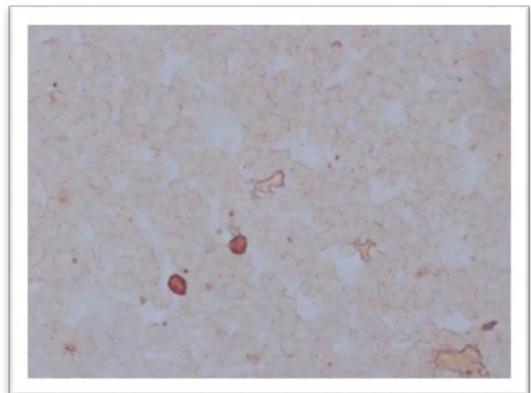
**Figura 3. IP negativa en sangre**



**Figura 4. IP negativa en sangre**



**Figura 5. IP positiva en sangre**



**Figura 6. IP positiva en sangre**



Figura 7. IP negativa en conjuntiva

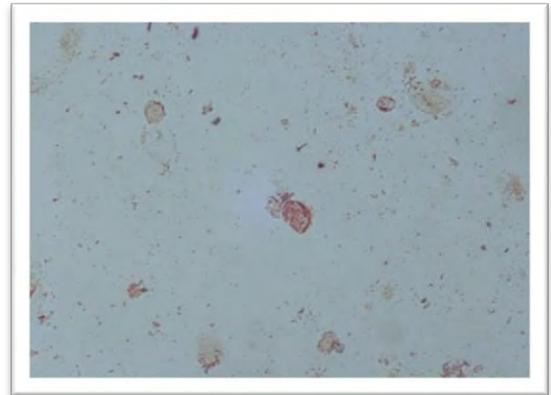


Figura 8. IP positiva en conjuntiva

## 2.2. Información de los pacientes

Se trabajaron muestras de 149 pacientes caninos de diferentes razas y un hurón, de los cuales 77 (51%) eran hembras y 73 (49%) machos.

El rango de edad varió desde un mes hasta 16 años, con una edad promedio de dos años y medio. Se agruparon por edades en cachorros de 0 a 12 meses, adultos de 13 a 84 meses y geriátricos de 85 meses en adelante.

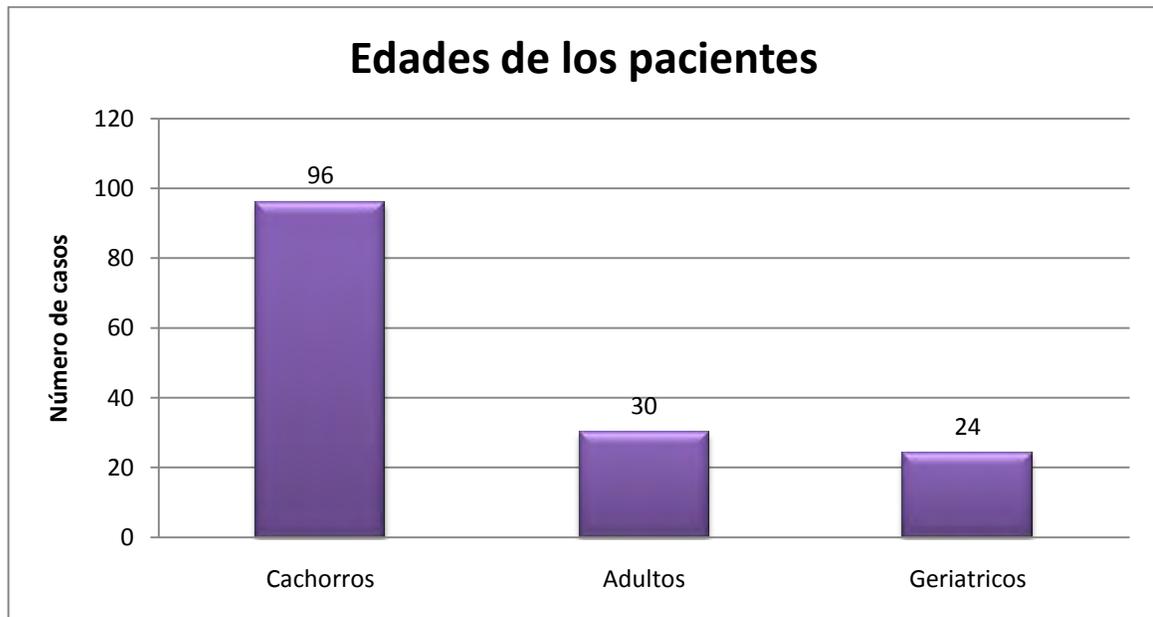


figura 8. Distribución de los pacientes según grupos etarios

Sólo el 12 % de los pacientes tenía cartilla de vacunación al corriente, el 81% no contaba con vacunas, el 7% restante no proporcionó este dato como se muestra en la figura 10.



figura 9. Estado de vacunación

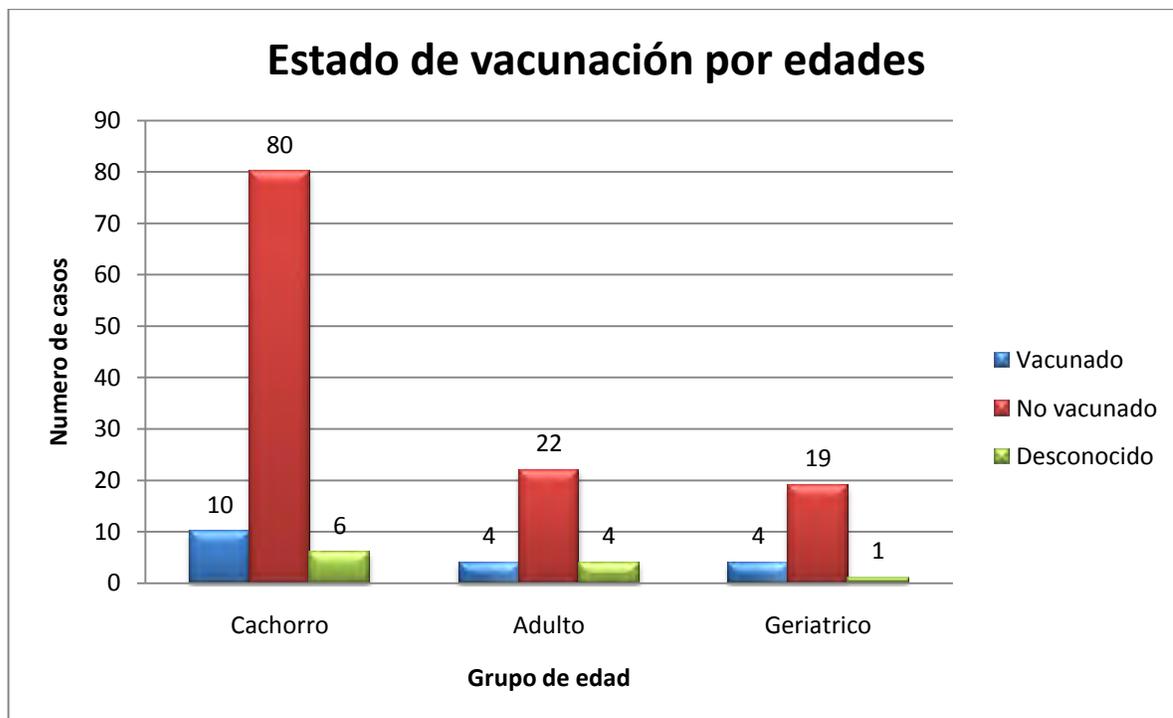


figura 10. Estado de vacunación por grupos de edad

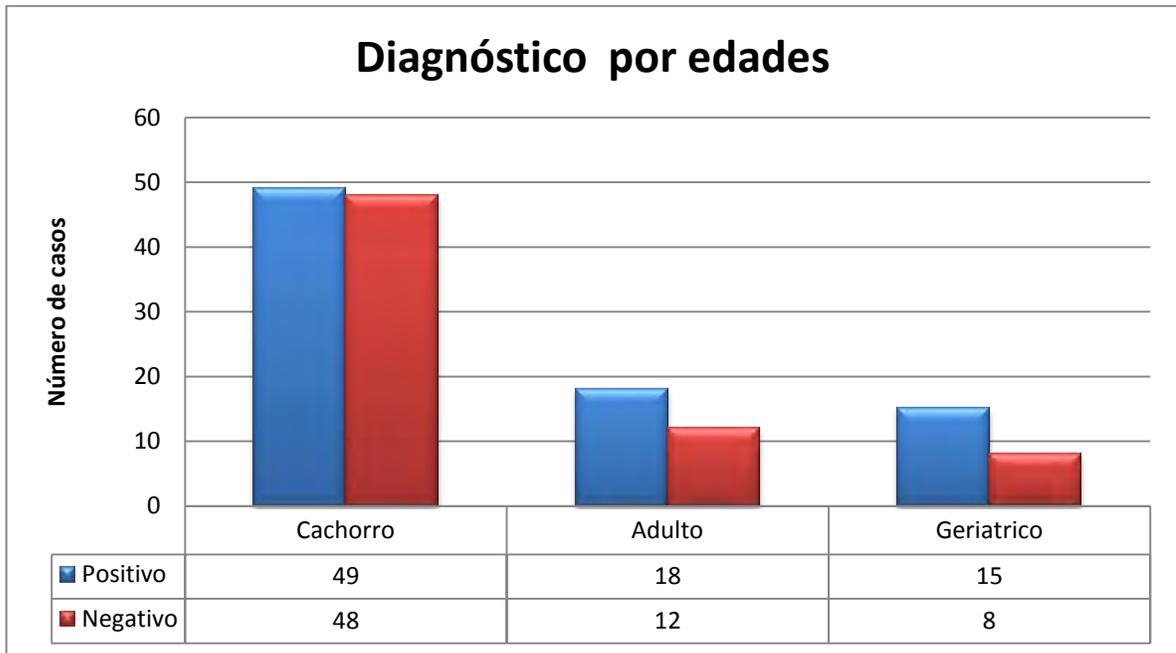


figura 11. Diagnóstico de distemper por grupos de edad

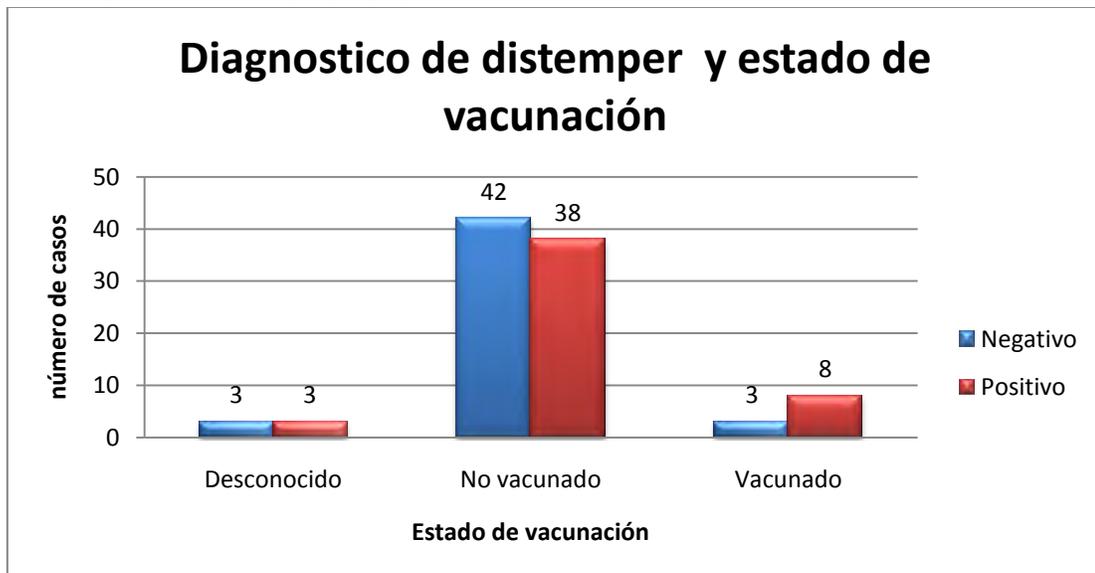


figura 12. Diagnóstico de distemper por estado de vacunación

Los signos clínicos más frecuentes informados por los MVZ que remitieron las muestras fueron: depresión, anorexia y fiebre, que son totalmente inespecíficos y,

en la mayoría de los casos registrados, acompañan a las manifestaciones sistémicas. Debido a la gran variedad y combinación de signos clínicos registrados, se clasificaron según el o los sistemas afectados como sigue:

- ⊕ Digestivo: vómito, diarrea, dolor abdominal.
- ⊕ Respiratorio: Disnea, secreción nasal, tos, estertores.
- ⊕ Neurológico: Mioclonos, incoordinación, temblores, convulsiones, sialorrea, alteraciones en la propiocepción, paresis.
- ⊕ Cutáneo: Hiperqueratosis, lesiones papulares.
- ⊕ Inespecífico: Anorexia, depresión, fiebre, debilidad.

Prueba		IP		IF	
Cuadro clínico	Número de casos	Negativos	Positivos	Negativos	Positivos
Conjuntivitis	1	1			1
Digestivo	28	15	13	12	16
Digestivo, neurológico	2	2		2	
Digestivo, neurológico, cutáneo	1	1		1	
Digestivo, respiratorio	12	9	3	8	4
Inespecíficos	30	14	16	12	18
linfopenia	1	1		1	
Neurológico	37	13	24	13	24
Ninguno	1	1		1	
No referidos	8	4	4	4	4
Respiratorio	22	11	11	11	11
Respiratorio, Digestivo	6	3	3	2	4
Respiratorio, neurológico	1	1		1	
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>76</b>	<b>74</b>	<b>68</b>	<b>82</b>

## Diagnóstico de distemper canino por la prueba de IF segun el cuadro clinico reportado

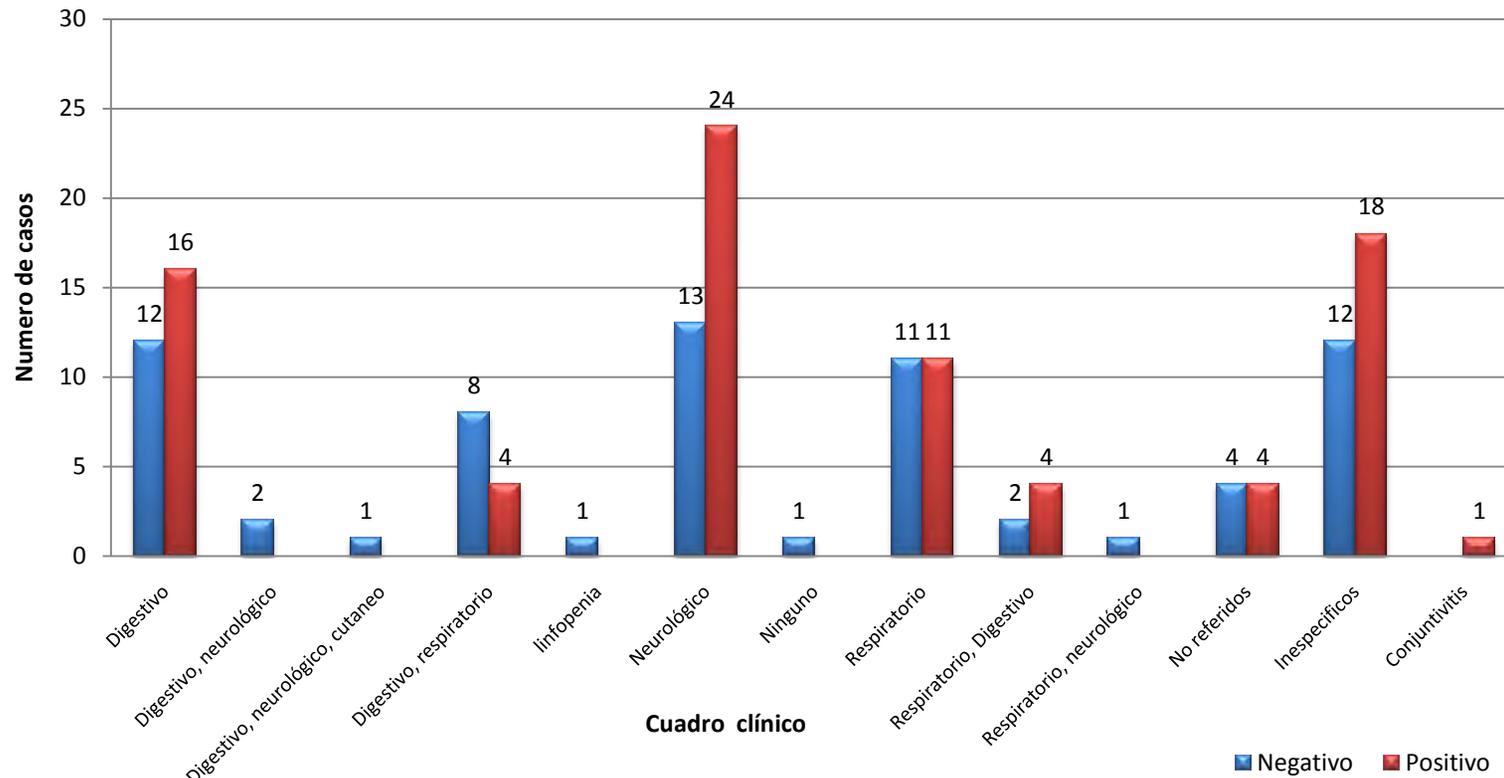


figura 13. Número de casos positivos y negativos a distemper canino por la prueba de IF según el cuadro clínico reportado

# Confirmación del diagnóstico de distemper canino por la prueba de IP

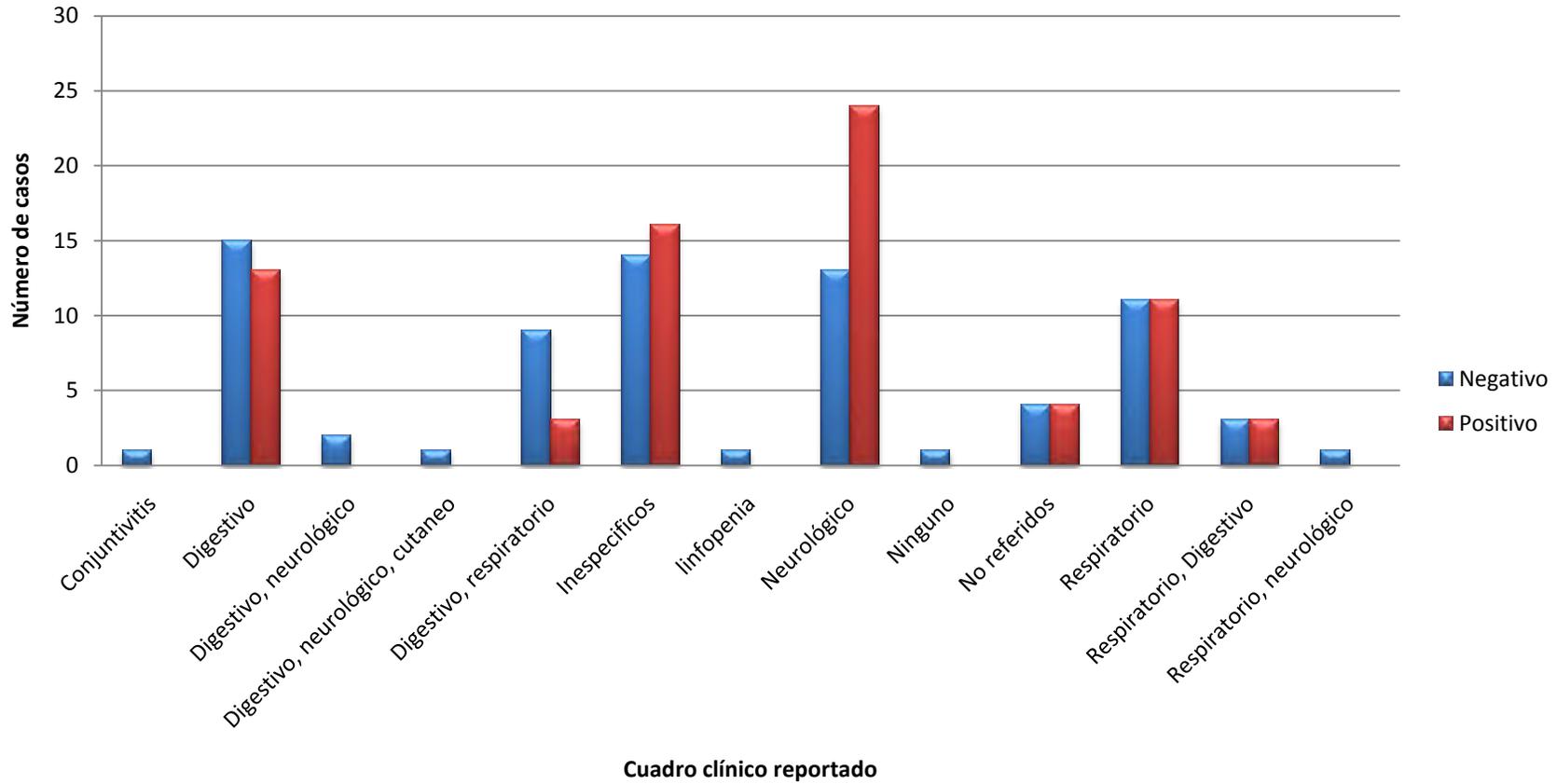


figura 14. Número de casos positivos y negativos a distemper canino por la prueba de IP según el cuadro clínico reportado

Los signos más frecuentes en cada cuadro se muestran en la siguiente tabla:

<b>Signo</b>	<b>Numero de casos</b>	<b>Positivos</b>	<b>Negativos</b>
<b>Anorexia</b>	38	13	26
<b>Depresión</b>	25	11	15
<b>Fiebre</b>	7	3	4
<b>Convulsiones</b>	26	19	7
<b>Mioclonos</b>	4	3	1
<b>Diarrea</b>	31	13	18
<b>Vómito</b>	34	11	26
<b>Secreción ocular</b>	5	0	5
<b>Secreción nasal</b>	11	6	5
<b>Tos</b>	17	5	13

*Cuadro 1. Signos clínicos más frecuente y diagnóstico de distemper canino por IF. Ningún caso reportó un solo signo clínico*

### *Información de las muestras*

---

Las muestras de pacientes con diagnóstico presuntivo de distemper canino que fueron sometidas a ambas pruebas (IF e IP) corresponden a 150 casos. En algunos casos se procesó sólo una muestra (sangre o conjuntiva) y en otros ambas muestras (sangre y conjuntiva), por lo que en total se procesaron 203 muestras.

Tipo de muestra	Número de casos	Numero de muestras
Solo sangre	86	86
Solo conjuntiva	14	14
Sangre y conjuntiva	51	102
<b>Total</b>	<b>150</b>	<b>203</b>

Cuadro 2. Distribución de las muestras

Tipo de muestra	Numero de muestras
<b>Sangre</b>	138
<b>Conjuntiva</b>	65
<b>Total</b>	<b>202</b>

Cuadro 3. Muestras por "tipo"

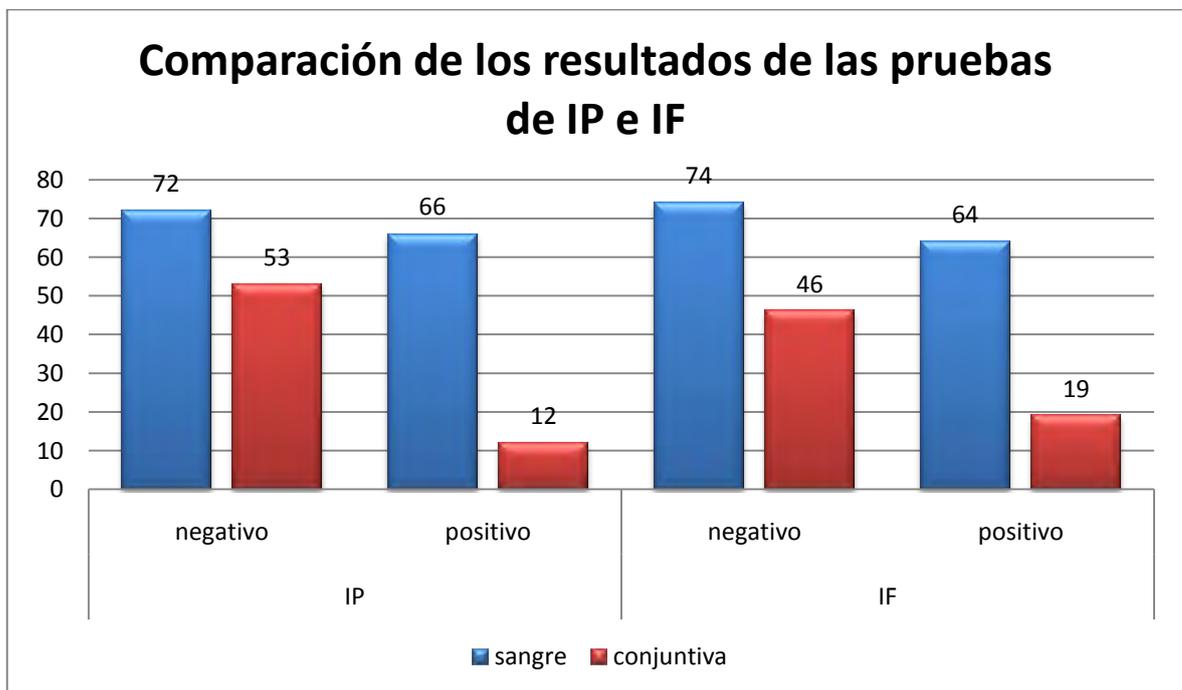


figura 15. Comparación de los resultados de las pruebas de IF e IP en las 203 muestras trabajadas

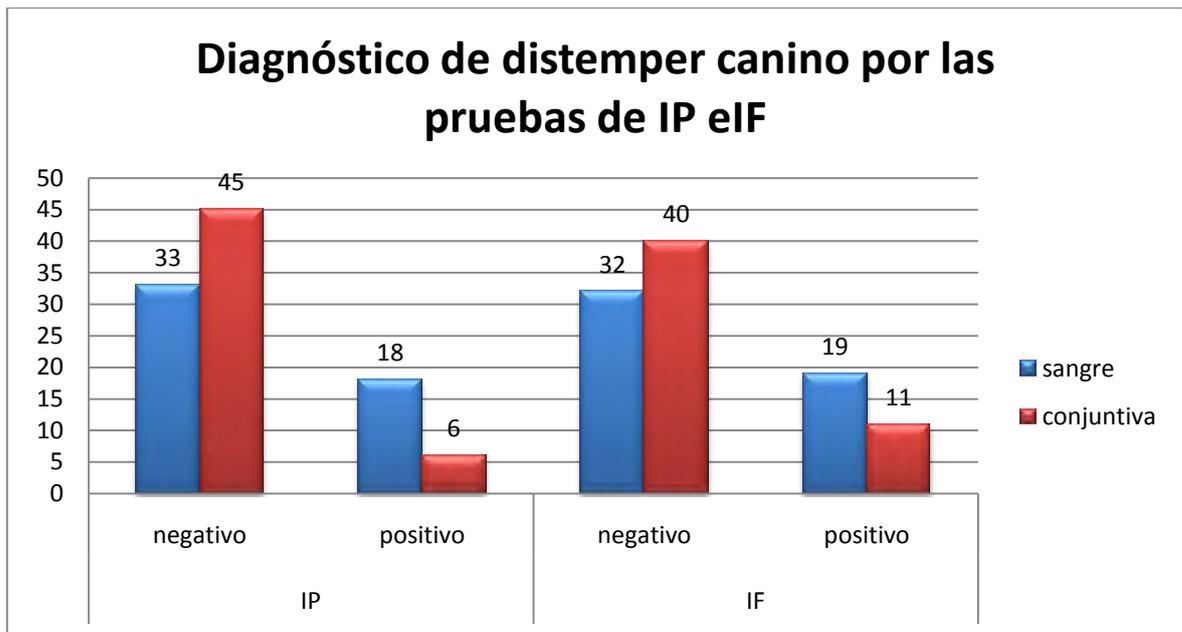


figura 16. Comparación de los resultados de las pruebas de IP e IF en los casos en que se trabajaron ambas muestras

### 2.3. Análisis estadístico

A falta de una prueba dorada como el aislamiento o la RT-PCR para calcular la especificidad y sensibilidad de la prueba de IP, se utilizó el índice kappa<sup>49</sup> para medir la concordancia entre ambas pruebas (IF e IP) y una prueba de homogeneidad de proporciones. Se obtuvo un índice de kappa general de 0.9571 con un 96% de coincidencias y sin diferencia estadística ( $P < 0.05$ ). En muestras de conjuntiva se obtuvo un índice de kappa de 0.9077 con 91% de coincidencias y una diferencia estadística ( $P > 0.05$ ). En muestras de sangre el índice de kappa fue 0.9580 con 93% de coincidencias y sin diferencia estadística ( $P < 0.05$ )

En 26 de los 51 casos en los que se procesaron muestras de sangre e impronta conjuntival se obtuvo el mismo resultado en ambas muestras por la prueba de IF. De estos casos, en las muestras de sangre se obtuvo una correspondencia del 96%, y del 88% en el caso de impronta conjuntival.

No se encontró diferencia estadística entre ambas pruebas y no se encontró diferencia estadística entre la prueba de IP e IF en muestras sanguíneas; sin embargo, si hubo una diferencia estadística entre las pruebas en el caso de las muestras de impronta conjuntival.

## **Discusión**

La prueba de inmunoperoxidasa fue capaz de detectar al virus de DC en muestras de sangre e impronta conjuntival de pacientes con diagnóstico clínico de distemper canino. Esto coincide con Frisk A. L. et al (1999) quienes emplearon la técnica de IHC para el diagnóstico de DC.

Se obtuvo un índice de kappa<sup>50</sup> muy bueno entre las pruebas de IF e IP por lo que se puede decir que se ambas técnicas son funcionales y su uso puede ser indistinto, aunque hubo una mejor concordancia entre ambas cuando se trabajaron muestras de sangre. El alto porcentaje de correspondencia y concordancia entre las pruebas coincide con trabajos en los que se han comparado ambas técnicas para el diagnóstico de otras enfermedades<sup>51</sup> como la leishmaniasis y la enteropatía proliferativa.

La correspondencia entre ambas pruebas fue menor en las muestras de impronta conjuntival, esto pudo deberse en parte al escaso contenido celular de muchas de las muestras y a la poca homogeneidad de las mismas, ya que aun cuando se obtuvieron hasta 4 muestras de un solo animal la calidad no era igual en todas las improntas<sup>52</sup>.

El 80% de los pacientes de con diagnóstico clínico de distemper no estaban vacunados, lo cual es indicativo de la importancia de la vacunación para prevenir esta enfermedad.

Hubo 8 casos positivos en animales vacunados, esto concuerda con los trabajos de Blixenkrone-Møller et al., 1993; Appel et al., 1994; Morell, 1994, 1996; Harder et al., 1995, 1996; Roelke-Parker et al., 1996; Haas et al., 1997; Ek-Kommonen et al., 1997; Summers and Appel, 1999; Iwatsuki et al., 2000; Uema et al., 2005 ; Lan et al., 2005; Calderon Gallo et al. 2007; en los que se reporta infección a pesar de la vacunación. En dichos estudios se obtuvo el aislamiento viral y se encontró que existían diferencias genéticas entre la cepa vacunal y la de campo, lo que podría indicar que el virus circulante en dichas regiones se ha modificado<sup>53</sup>. Hubiera sido importante hacer el aislamiento de estos ocho casos y secuenciar para comparar las diferencias con la cepa con la que fueron inmunizados y determinar si la infección pudo deberse a estas diferencias y si el aislamiento correspondía con la cepa CIESAJSMC (GeneBank Accession Number DQ887333) secuenciada por Simon-Martínez et al (2008)<sup>54</sup>.

El mayor número de casos con diagnóstico positivo correspondió a animales entre 0 y 12 meses de edad, esto coincide con la literatura<sup>55</sup> donde se indica que la enfermedad afecta principalmente a animales jóvenes, aunque puede afectar adultos sometidos a estrés (en los datos clínicos del paciente, no se contaba con esta información).

El 36.5% de los casos confirmados de DC (por IF e IP) presentó cuadros neurológicos (con convulsiones como principal manifestación), mientras que el

28% tuvo signos digestivos (con diarrea y vómito), el 22% respiratorios (con anorexia y secreción nasal) y el 12% presentó signos respiratorios y digestivos. Estos datos coinciden con lo reportado en la literatura<sup>56,57,58</sup> como las manifestaciones más frecuentes de la enfermedad.

En este trabajo se estableció la técnica de IP como una alternativa para el diagnóstico de DC, ya que mostró una alta concordancia con la de IF directa.

## **Conclusiones**

La prueba de IP es una alternativa para confirmar el diagnóstico de DC con una eficiencia igual a la de la prueba de IF.

Se debe tener cuidado al tomar las muestras de impronta conjuntival con el fin de que resulte adecuada<sup>59</sup> (con el suficiente número de células) y permita un diagnóstico eficiente y confiable.

Los casos confirmados de DC en este estudio se presentaron principalmente en cachorros (de 0 a 12 meses de edad) no vacunados y la semiología más frecuente fue la nerviosa, seguida de la digestiva, la respiratoria o las dos últimas en conjunto.

## Referencias

1. Appel M. and Summers B. Canine Distemper: Current Status. In: Recent Advances in Canine Infectious Diseases, L.E. Carmichael (Ed.) 23 Nov 1999.
2. Baumgärtner, W., Alldinger, S.,. The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination—a biphasic process. In: Lavi, E., Constantinescu, C.S. (Eds.), Experimental Models of Multiple Sclerosis. Springer, New York, pp. 2005; 871–887
3. Fujita Kentaro, Miura Ryuichi, Yoneda Misako, Shimizu Fusako, Sato Hiroki, Muto Yuri, et al. Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection Virology 2007; 359: 324–335.
4. Blixenkron-Møller M, Svansson V, Have P, Örvell C, Appel M, Pedersen I. R, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. Vet. Microb. 1993; 37: 163–173.
5. Von Messling Veronika, Springfield Christoph, Devaux Patricia, Cattaneo Roberto. A Ferret Model of Canine Distemper Virus Virulence and Immunosuppression. Journal of Virology, Dec. 2003: p. 12579–12591.
6. Krakowka, S., Koestner, A. Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. J. Infect. Dis. 1976; 13: 629–632.
7. Krakowka S. Mechanisms of in vitro immunosuppression in canine distemper virus infection. J. Clin. Lab. Immunol. 1982; 8: 187–196.
8. Krakowka, S., Axthelm, M.K., Johnson, G.C., 1985. Canine distemper virus. In: Olsen, R.G., Krakowka, S., Blakeslee, J.R. (Eds.), Comparative Pathobiology of Viral Diseases, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, pp. 137–164
9. Appel M.J. Distemper pathogenesis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1970; 156: 1681–1684.
10. Greene, C.E., Appel, M.J., Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. WB Saunders Company, 1998 Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp. 9–22.
11. Stettler Marianne, Beck Karin, Wagner Anita, Vandeveld Marc, Zurbriggen Andreas. Determinants of persistence in canine distemper Viruses. Veterinary Microbiology 1997;57: 83-93

12. Kennedy, S., Kuiken, T., Jepson, P.D., Deaville, R., Forsyth, M., Barrett, T., van de Bildt, M.W.G., Osterhaus, A.D.M.E., Eybatov, T., Duck, C., Kydyrmanov, A., Mitrofanov, I., Wilson, S., Mass die-off of Caspian seals caused by canine distemper virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2000; 6: 637–639.
13. Kreutzer, M., Kreutzer, R., Siebert, U., Müller, G., Reijnders, P., Brasseur, S., Härkönen, T., Dietz, R., Sonne, C., Born, E.W., Baumgärtner, W., In search for virus carriers of the 1988 and 2002 phocine distemper virus outbreaks in European harbour seals. *Arch. Virol.* 2008; 153: 187–192.
14. McCullough, B., Krakowka, S., Koestner, A., Experimental canine distemper virus-induced demyelination. *Lab. Invest.* 1974;3: 216–222.
15. McCullough, B., Krakowka, S., Koestner, A., Experimental canine distemper virus-induced lymphoid depletion. *Am. J. Pathol.* 1974;74: 155–170.
16. Summers, B.A., Greisen, H.A., Appel, M.J., Canine distemper encephalomyelitis: variation with strain. *J. Comp. Pathol.* 198;494: 65–75.
17. Shapshak, P., Graves, M.C., Imagawa, D.T., Autologous and allogeneic antibody responses to canine distemper virus isolates from dogs with chronic neurological diseases. *Viral Immunol.* 1987;1: 45–54.
18. Mori, T., Shin, Y.S., Okita, M., Hirayama, N., Miyashita, N., Gemma, T., Kai, C., Mikami, T., The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. *J. Gen. Virol.* 1994; 75:2403–2408.
19. Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 1999;3: 3634–3643.
20. Haas, L., Liermann, H., Harder, T.C., Barrett, T., Löffelholz, 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. *Vet. Microbiol.* 1999; 69: 15–18.
21. Summers, B.A., Appel, M.J., Aspects of canine distemper virus and measles encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1994; 20: 525–534.
22. Orlando, E., Imbschweiler, I., Gerhauser, I., Baumgärtner, W., Wewetzer, K., In vitro characterisation and preferential infection by canine distemper virus of glial precursors with Schwann cell characteristics from adult canine brains. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, in press 2008.

23. Ek-Kommonen, C., Sihvonon, L., Pekkanen, K., Rikula, U., Nuotio, L., Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet. Rec.* 1997; 141: 380–383.
24. Calderon Gallo Marina, Remorini Patricia, Periolo Osvaldo, Iglesias Marcela, Mattion Nora, La Torre José. 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.
25. Martella Vito , Elia Gabriella , Lucentea Maria , Decaro Nicola, Lorusso Eleonora , Banyai Krisztian , Blixenkron-Møller Merete, Nguyen Thi Lan , Ryoji Yamaguchi , Francesco Cirone , Leland Eugene Carmichael , Canio Buonavoglia. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Veterinary Microbiology* 2007; 122: 32–42.
26. Diallo, A., Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Vet. Microbiol* 1990. 23, 155–163.
27. Lednicky John, Meehanb Thomas, Kinsel Michael, Dubachd Jean, Hungerford Laura L, Sarich Nicolene A, Witecki Kelley E, et al. 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; 18: 147–157
28. Beineke A., Puff C., Seehusen F., Baumgärtner W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2009; 127: 1–18.
29. Vandeveld Marc award lecture, wsava/waltham international award for scientific achievement, 2004, wsava fecava hvms world congress, scientific proceedings.
30. Lednicky John, Meehanb Thomas, Kinsel Michael, Dubachd Jean, Hungerford Laura L, Sarich Nicolene A, Witecki Kelley E, et al. 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; 18: 147–157.
31. Damián M., Morales E., Salas G. and Trigo F.J. Immunohistochemical Detection of Antigens of Distemper, Adenovirus and Parainfluenza Viruses in Domestic Dogs with Pneumonia. *J. Comp. Path.* 2005; Vol. 133: 289–293.
32. Haines D.M, Martin K.M, Chelack B.J, Sargent R. A, Outerbridge C. A. and Clark E.G. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal

- mucosa, and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 396-399.
33. Liang C. T, Chueh L. L, Pang V. F, Zhuo Y. X, Liang S. C, Yu C. K, et al. A Non-biotin Polymerized Horseradish-peroxidase Method for the Immunohistochemical Diagnosis of Canine Distemper, *J. Comp. Path.* 2007; Vol. 136: 57-64.
  34. Dong-Jun Ana, Tae-Young Kimb, Dae-Sub Song, Bo-Kyu Kang, Bong-Kyun Park An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper *Journal of Virological Methods* 147 (2008) 244–249.
  35. Saito T.B, Alfieri A.A., Wosiacki S.R, Negrao F.J, Morais H.S.A, Alfieri A.F. 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.
  36. Frisk, A.L., Konig, M, Moritz, A, Baumgartner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37: 3634– 3643.
  37. Elia Gabriella, Decaro Nicola, Martella Vito, Cirone Francesco, Lucente Maria Stella, Lorusso Eleonora, et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 2006; 136: 171–176 .
  38. Cho H. S. and Park N. Y. Detection of Canine Distemper Virus in Blood Samples by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Vet. Med. B* 2005; 52: 410–413.
  39. Olson P, Finnsdo H, Klingeborn B, and Hedhammar A., Duration of antibodies elicited by canine distemper virus vaccinations in dogs. *Vet. Rec.* 1997; 141: 654–655.
  40. Griot-Wenk E, Cherpillod P, Koch A, Zurbriggen R, Bruckner L., Wittek R. et al. The Humoral Immune Response to Recombinant Nucleocapsid Antigen of Canine Distemper Virus in Dogs Vaccinated with Attenuated Distemper Virus or DNA Encoding the Nucleocapsid of Wild-Type Virus. *J. Vet. Med. A* 2001; 48: 295-302.
  41. Potgieter Leon N. D, Ajidagba Peace A. Quantitation of canine distemper virus and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assays using protein A and monoclonal antibody capture. *J Vet Diagn. Invest.* 1989; 1:110-115.

42. Latha D, M. Geetha, Ramadass P, Narayanan R.B. Development of recombinant nucleocapsid protein based IgM-ELISA for the early detection of distemper infection in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007; 119: 278–286.
43. Latha D, Geetha M, Ramadass P, Narayanan R.B. Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 251–260.
44. Masami Mochizuki, Megumi Motoyoshi, Ken Maeda and Kazunari Kai Complement-Mediated Neutralization of Canine Distemper Virus In Vitro: Cross-Reaction between Vaccine Onderstepoort and Field KDK-1 Strains with Different Hemagglutinin Gene Characteristics *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, July 2002; p. 921–924.
45. Oyedele O.I, Oluwayelu D.O, Cadmus S.I.B, Odemuyiwa S.O. and Adu, F.D. Protective levels of canine distemper virus antibody in an urban population using plaque reduction neutralization test. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 2004; 71: 227-230.
46. Latha D., Geetha M., Ramadass P., Narayanan R.B. Evaluation of ELISA based on the conserved and functional middle region of nucleocapsid protein to detect distemper infection in dogs *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 251–260.
47. Masami Mochizuki, Megumi Motoyoshi, Ken Maeda, and Kazunari Kai Complement-Mediated Neutralization of Canine Distemper Virus In Vitro: Cross-Reaction between Vaccine Onderstepoort and Field KDK-1 Strains with Different Hemagglutinin Gene Characteristics *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, July 2002, p. 921–924
48. Amaro Lara Miriam Identificación del virus de moquillo canino en muestras sanguíneas de pacientes con esclerosis múltiple.(tesis de licenciatura) México(D.F.)México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México, 2007
49. Olave Leyva José Ignacio Frecuencia del virus de la rabia en quirópteros hematófagos de algunas áreas endémicas del estado de Hidalgo y la Sierra Norte del estado de Veracruz por inmunofluorescencia directa y detección molecular.( Tesis de maestría) México(D.F.)México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009
50. Coura Xavier Sílvia, Monteiro de Andrade Héliada, Hadad Monte Semíramis Jamil, Chiarelli Ingrid Maria, Geraldo Lima Wanderson, Marques Michalick Marilene Suzan, Luiz Tafuri Washington and Luiz Tafuri Wagner Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods *BMC Veterinary Research* 2006; 2:17

51. Roberto M. C. Guedes, Connie J. Gebhart, Nathan L. Winkelman, Rebecca A. Mackie-Nuss A comparative study of an indirect fluorescent antibody test and an immunoperoxidase monolayer assay for the diagnosis of porcine proliferative enteropathy *J Vet Diagn Invest* 2002; 14:420–423
52. Pedneault Louise, Anglow Margaret , Alfieri Carolina, Rubin Earl Diagnosis of cytomegalovirus (CMV) infection in pediatric transplant patients by the antigenemia, shell vial, and conventional culture assays performed on blood: correlation with CMV disease *Clinical and Diagnostic Virology* 6 (1996) 51 61
53. Yasuhiro Ikeda, Kazuya Nakamura, Ttakayuki Miyazawa, Ming-Chu Chen, Ttzong-Fu Kuo, James A. Lin, Takeshi Mikami, Chieko Kai, And Eiji Takahashi Seroprevalence of canine distemper virus in cats *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*, May 2001, p. 641–644.
54. J. Simon-Martínez, R. Ulloa-Arvizu , V.E. Soriano, R. Fajardo Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico *The Veterinary Journal* 175 (2008) 423–426.
55. Blixenkron-Møller M, Svansson V, Have P, Örvell C, Appel M, Pedersen I. R, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microb.* 1993; 37: 163–173.
56. Blixenkron-Møller M, Svansson V, Have P, Örvell C, Appel M, Pedersen I. R, et al. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Vet. Microb.* 1993; 37: 163–173.
57. Sanjay Kapil, Robin W. Allison, Larry Johnston III, Brandy L. Murray, Steven Holland, Jim Meinkoth and Bill Johnson1 Canine Distemper Virus Strains Circulating among North American Dog, *CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY*, Apr. 2008, Vol. 15, p. 707–712 .
58. Dong-Jun Ana, Tae-Young Kimb, Dae-Sub Songc, Bo-Kyu Kangc, Bong-Kyun Park An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper *Journal of Virological Methods* 147 (2008) 244–249 .
59. Kim, D., Jeung, S.Y., Ahn, S.J., Lee, J.H., Pak, S.I., Kwon, H.M., 2006. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 68, 877–879.