

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Detección del virus de Distemper Canino mediante RT-PCR y RT-PCR
+ PCR anidada utilizando dos diferentes pares de iniciadores.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ADRIANA MORA HERNÁNDEZ

ASESOR

Dr. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Dios gracias por el amor que le brindas a todo el mundo.

Doy gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán le agradezco por acogerme en sus instalaciones y brindarme los conocimientos de Médico Veterinario Zootecnista.

Quisiera agradecer a mis padres cuya capacidad de sacrificio, fuerza de voluntad y sencillez, han constituido un motor impulsor en mi vida, me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio, gracias por todo los amo.

Agradezco a mis hermanos por brindarme su apoyo y sus consejos los quiero mucho.

A mi asesor el doctor Carlos Ignacio Soto Zárate por su cordialidad y su apoyo que han sido muy grandes durante todo este tiempo de duro trabajo, muchas gracias doctor por haber puesto todos los medios para que yo pudiera hacer mi tesis, por todo su tiempo invertido en la dirección y corrección de esta tesis, por sus palabras de ánimo, por haber creído en mi y por todos sus sabios consejos desde el inicio hasta el final de este trabajo.

A mi amigo Francisco Carbajal le agradezco su compañía, consejos y ayuda incondicional, gracias por tener la chispa de ser un buen compañero y amigo te quiero.

A mi amigo MVZ César López Farías aunque nos conocemos poco de verdad le agradezco tu amistad y apoyo en todo momento, espero que lleguemos a conocernos mejor, gracias por tener un corazón tan noble.

A los profesores y compañeros del laboratorio de investigación # 4 “Morfología veterinaria y biología celular” gracias por su paciencia y compañía.

Este trabajo se realizó con el apoyo de la Cátedra de Investigación “Morfología veterinaria y biología celular” (Clave PACIVE GVC-10) y de la Cátedra de Docencia “Mejoramiento de la enseñanza de la asignatura de Biología Celular para la carrera de Médico Veterinario Zootecnista” (Clave PACIVE CD-05).

DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta Tesis con gran cariño a todas las personas que confiaron y creyeron en mí, quiero que sepan que esto es un gran logro en mi vida y no lo hubiera logrado sin el apoyo de cada uno de ustedes.

A mi mamá María Amada Hernández Rojas.

A mi papá Ramón Mora Hernández.

A mis hermanos y hermanas.

A mi sobrina Lorena.

A mi asesor el Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate.

A mi amigo Francisco Javier Carbajal Merchant.

A mi amigo MVZ César López Farías.

A mi amigo fiel Nico.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	2
Resumen	3
Introducción	4
Objetivos	12
Materiales y Métodos	13
Resultados	20
Discusión	25
Conclusiones	28
Glosario	29
Bibliografía	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ADN:** Ácido Desoxirribonucleico
- **ADNc:** Ácido Desoxirribonucleico complementario
- **ARN:** Ácido Ribonucleico
- **ARNm:** Ácido Ribonucleico mensajero
- **cbp:** cuanto baste para
- **DC:** Distemper Canino
- **DEPC:** Dietil-pirocarbonato
- **ECP:** Efecto citopático
- **ELISA:** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a una Enzima
- **mM:** milimolar
- **MMLV:** (Moloney Murine Leukemia Virus) Virus Moloney de Leucemia Murina
- **nm:** nanómetro
- **NP:** Nucleocápside
- **pb:** pares de bases
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **pg:** picogramos
- **PI:** Post-infección
- **pM:** picomoles
- **Puppy DP:** Vacuna puppy de Distemper y Parvovirus Vacuna bivalente combinada de virus activo atenuado y liofilizado para la prevención precoz del Distemper y Parvovirus canino.
- **RI:** Respuesta inmune
- **RT:** Transcriptasa reversa
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **U:** unidades
- **VDC:** Virus del Distemper Canino
- **VVM:** Virus vivo modificado
- **µl:** microlitro

RESUMEN

El virus de Distemper Canino (VDC) pertenece a la familia Paramyxoviridae, a la subfamilia *Paramyxovirinae* y al género *Morbilliviruses*. El Distemper Canino (DC) es una enfermedad letal con morbilidad y mortalidad altas, se caracteriza por la gran variedad de signos sistémicos y neurológicos, y es particularmente contagiosa en perros de 3-6 meses de edad. El diagnóstico de DC se basa principalmente en la sospecha clínica y la confirmación se realiza con la identificación del antígeno viral por inmunofluorescencia o bien realizando el aislamiento del virus. El objetivo de este trabajo fue realizar la detección del VDC por medio de pruebas moleculares (RT-PCR y RT-PCR + PCR anidada) utilizando dos diferentes pares de iniciadores, los cuales limitan una secuencia específica del gen de la nucleocápside de la cepa Onderstepoort del VDC. En el caso de los iniciadores diseñados por Frisk (denominados 1 y 2 en este trabajo) determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb, mientras que el fragmento limitado por los iniciadores diseñados por Yong-Hwan (denominados 3 y 4 en este trabajo) es de 419 pb. Las muestras se obtuvieron de cultivos de células RK13 infectados con virus vacunal y virus de campo. Como resultado de este trabajo se logró la purificación de ARN total en cantidad y calidad adecuada. Sin embargo, la reacción de RT-PCR no fue capaz de detectar la presencia del VDC en ninguna de las muestras y con ninguno de los dos pares de iniciadores, este resultado se puede atribuir a que existía una cantidad insuficiente de ARN viral en las muestras. Con el fin de aumentar la sensibilidad de esta prueba se decidió combinar los iniciadores y realizar la RT-PCR + PCR anidada, como producto de estas reacciones se obtuvo el amplificado de 287 pb tanto en la muestra de virus vacunal como en la muestra de virus de campo. La estandarización de las pruebas y el uso exitoso de los oligonucleótidos reportados por Yong Hwan y col. (2001) y Frisk y col. (1999) posibilita su uso como método de diagnóstico para la enfermedad de Distemper Canino.

INTRODUCCIÓN

El Distemper Canino (DC) es una enfermedad vírica letal con una gran variedad de signos sistémicos y neurológicos en perros en todo el mundo, ¹ tiene un periodo de incubación de 3-7 días, es altamente contagiosa en perros jóvenes (3-6 meses de edad) y se caracteriza por producir leucopenia y llevar a los animales a un estado de inmunocompromiso. Presenta morbilidad alta y mortalidad variable. Esta enfermedad produce fiebre difásica, rinitis aguda, lesiones cutáneas y, posteriormente, bronquitis, neumonía catarral, gastroenteritis severa y signos nerviosos. ^{2,3}

Esta enfermedad es muy contagiosa en perros y resto de cánidos (zorro, dingo, coyote, lobo, chacal), mustélidos (hurón, visón, comadreja, marta, mofeta, tejón, nutria) y prociónidos (mapache, panda, coatí). ^{4, 5} Los animales infectados eliminan el virus por todas las secreciones y excreciones corporales durante los 60 a 90 días después de la infección natural y la fuente primaria de exposición son los aerosoles. ^{6,7}

Etiología

El virus del Distemper Canino (VDC) pertenece a la familia Paramyxoviridae, a la subfamilia *Paramyxovirinae* y al género *Morbillivirus*. ⁸ Es un virus relativamente grande (150-250 nm) con ARN de filamento único dispuesto en simetría helicoidal, está rodeado por una serie de glicoproteínas incorporadas en la membrana celular (figura 1). ⁶ Muestra susceptibilidad a la luz ultravioleta, calor y resequedad, es destruido por temperaturas entre 50 y 60° C y por la mayoría de los detergentes, jabones y diversos químicos (fenol, cuaternarios de amonio, formol, etc.). ^{4,6}

La virulencia viral puede determinar la gravedad y el tipo de enfermedad clínica desarrollada. Ciertas cepas, como Snyder Hill, A75/17 y R/252, son altamente virulentas y neurotrópicas. La primera ocasiona poliencefalomielitis, en tanto que las dos últimas producen desmielinación; otras cepas varían en cuanto a su capacidad para producir lesiones en el SNC. ⁶

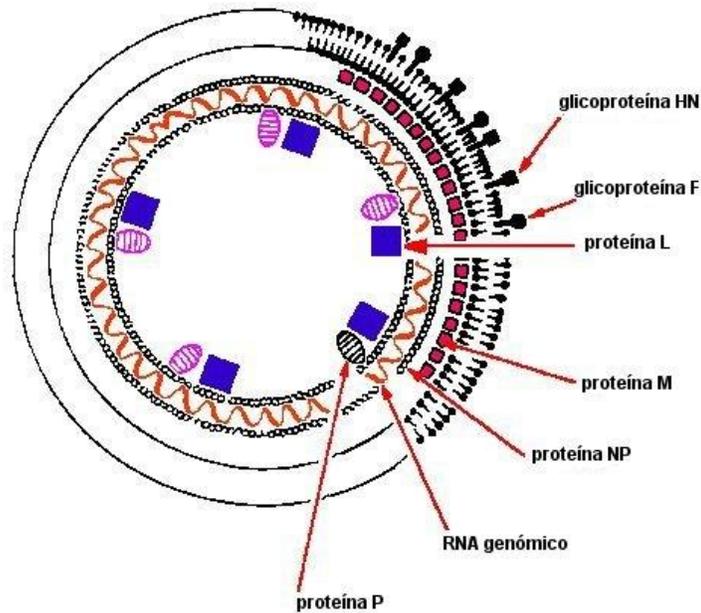


Figura 1. Estructura del virus del Distemper Canino. HN, hemaglutinina; F, proteína de fusión; M, proteína de matriz; L, proteína grande; P, polimerasa; NP, nucleocápside. Tomado con fines didácticos de Greene, 2000.

Transmisión

Se transmite sobre todo, por medio de secreciones de ojos y nariz durante el estado febril inicial de la enfermedad, las cuales entran en contacto con el epitelio de las vías respiratorias superiores. También la orina y las heces contienen el virus y pueden transmitir la enfermedad.^{4,9}

Factores de susceptibilidad

La susceptibilidad depende básicamente de la virulencia de la cepa del virus de Distemper Canino, de la edad del animal y el estado inmunitario del huésped.^{5,10}

Signos clínicos

1. Enfermedad subclínica o leve. La enfermedad leve se asocia con fiebre (40-41°C), anorexia transitoria, depresión y una leve conjuntivitis serosa.⁴

2. Enfermedad multisistémica grave. Generalmente existe fiebre, aunque a veces pasa desapercibida, las secreciones oculares y nasales son inicialmente serosas, pero luego se convierten en mucopurulentas. Puede existir depresión, anorexia, diarrea, vómitos, deshidratación y/o intususcepción intestinal. Inicialmente manifiesta tos seca, la cual rápidamente se transforma en húmeda y productiva.^{4, 10}
3. Signos neurológicos. Pueden aparecer simultáneamente con otros signos multisistémicos o pueden ser evidentes 1-3 semanas después de la recuperación de la enfermedad sistémica y son progresivos y variables. Pueden consistir en convulsiones, hiperestesia, caminar sin rumbo, caminar en círculos, y cambios de conducta. Los trastornos de la marcha y la postura comprenden ataxia, asinergia, paraparesia y tetraparesia.⁴
4. Otros signos. Los animales pueden mostrar queratoconjuntivitis, hiperqueratosis nasal y digital que son manifestaciones crónicas.^{4, 10}

Patogenia

Durante el primer día, se produce la infección de los macrófagos tisulares de las vías respiratorias altas; del día 2 al 4, la infección se extiende a los tejidos linfoides de las tonsilas palatinas y de los nódulos linfáticos retrofaríngeos y bronquiales; del 4 al 6, se extiende a los tejidos linfoides sistémicos y al hígado, bazo, nódulos linfáticos abdominales 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. La fiebre disminuye durante algunos días hasta que se desarrolla una segunda fase febril que normalmente va acompañada de conjuntivitis, rinitis y anorexia; los signos gastrointestinales y respiratorios como tos, diarrea, vómitos, anorexia, deshidratación y pérdida de peso pueden presentarse; siendo las infecciones bacterianas secundarias a menudo los que complican la enfermedad del moquillo canino. Entre los días 6 y 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 al 14, la evolución varía dependiendo de la respuesta inmunológica del huésped, y puede incluir recuperación, enfermedad clínica multisistémica grave ó localización en el sistema nervioso

central (SNC). Los perros con respuestas débiles desarrollan una infección vírica de otros tejidos como piel, SNC y órganos glandulares y epiteliales^{4,5,9,10}

Respuesta inmune

Durante la primera semana de infección, los perros siempre desarrollan linfopenia y están inmunodeprimidos. El efecto más notable en la infección por VDC es la disminución de células T y B y la necrosis de los tejidos linfoides. Los animales que logran recuperarse rápidamente con signos clínicos mínimos desarrollan una fuerte respuesta celular y humoral.¹¹ Los títulos de anticuerpos varían dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Así se encuentra que los perros que sanan tienen los títulos más altos, mientras que los perros que mueren a consecuencia de la infección muestran poca o ninguna actividad de anticuerpos.¹²

La inmunidad celular mediada por los linfocitos T citotóxicos circulantes aparece entre 10 - 14 días post-infección (PI) y alcanza su pico máximo entre 14 a 28 días PI. Posteriormente disminuyen gradualmente y desaparecen a las 6 - 10 semanas PI. Los perros que desarrollan enfermedad aguda o subaguda desarrollan muy pobre o nula respuesta inmune (RI) neutralizante humoral y celular o bien aparecen tardíamente. Los perros con infección crónica del SNC pueden desarrollar una fuerte respuesta inmune en forma tardía.¹¹

Prevención

Actualmente la inmunización con vacunación controlada es la única forma efectiva de profilaxis para el VDC. La inmunización activa con vacunas a VVM induce una inmunidad duradera y es la que ha permitido tener al distemper canino bajo control en los últimos 35 años.¹¹

- Vacunas: Las primeras vacunas a virus vivo modificado fueron producidas por adaptación del virus a cultivos de células aviares o de células de canino. En el primer caso el VDC adaptado produjo la cepa Onderstepoort y, en el segundo, la adaptación del VCD produjo la cepa Rockborn, actualmente estas cepas aún se siguen utilizando en la producción de

vacunas. Este tipo de vacunas son muy efectivas ya que inducen una inmunidad de larga duración, de uno a varios años, en la mayoría de los perros.¹³

Existen pequeñas desventajas en cada vacuna; las cepas virales adaptadas a células caninas inmunizan al 100% de los perros susceptibles pero esporádicamente pueden producir encefalitis postvacunal. Por el contrario, las cepas virales adaptadas a células aviares son más seguras para caninos aunque la respuesta inmune aparece 2 a 3 días después que la producida por vacunas adaptadas a células caninas y además posee la desventaja de que no todos los perros susceptibles son protegidos.^{11, 13}

Diagnóstico

- **Diagnóstico clínico.** Se basa principalmente en la sospecha clínica, apoyada por el antecedente característico de un cachorro de 3-6 meses de edad que no ha sido vacunado. Los perros más afectados muestran signos clínicos característicos que permiten establecer el diagnóstico presuntivo.^{6, 10}
- **Diagnóstico patológico.** El diagnóstico patológico se basa en el hallazgo de diversas lesiones macroscópicas y microscópicas.
 1. Lesiones macroscópicas: mucosas congestionadas y cubiertas con exudado mucopurulento, bronquiolos con tapones mucopurulentos, pulmón con lóbulos craneal y caudal de color rojo o pardo, mucosa gástrica e intestinal congestionadas y cubiertas de secreción mucopurulenta, se observa degeneración parenquimatosa de los órganos internos, el bazo puede estar normal o ligeramente tumefacto.¹²
 2. Lesiones microscópicas: inclusiones celulares que se localizan sobre todo en células epiteliales de las mucosas, células reticulares, glía y neuronas localizadas en su mayor parte en el citoplasma, pero a veces también inclusiones intranucleares^{6, 12}
- **Diagnóstico de laboratorio.** Se realiza una hematología que muestra en casos agudos una linfopenia, trombocitopenia y los monocitos pueden estar aumentados.¹¹
- **Inmunocitoquímica.** En los casos agudos pueden hallarse antígenos virales y/o cuerpos de inclusión en células blancas, improntas vaginales o conjuntivales, células de lavado bronquial, sedimentos urinarios o líquido cerebroespinal. Las partículas virales han sido

observadas en materia fecal por microscopía óptica. En casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus.¹¹

- **Aislamiento viral.** El virus puede ser aislado de las mismas muestras usadas para inmunofluorescencia. Sin embargo, el aislamiento viral no se realiza en forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.¹¹
- **Serología.** La detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos no es suficiente para el diagnóstico. Perros infectados en forma aguda pueden morir sin aparición de anticuerpos neutralizantes mientras que los infectados en forma subaguda o crónica pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los perros vacunados.¹¹ Prueba de ELISA para la detección de IgG e IgM séricos contra el virus plantea el inconveniente de no permitir diferenciar si los anticuerpos son vacunales, de una exposición previa o si corresponden a la enfermedad actual y la IgM aparece como resultado de una infección o vacunación reciente.^{6, 10, 11, 14}
- **Pruebas moleculares:** El diagnóstico molecular se realiza con la reacción de PCR, y algunas variantes de esta como RT-PCR y PCR anidada.

1. PCR: Esta reacción detecta microorganismos infecciosos amplificando una secuencia específica de ADN. La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción de polimerización de ADN, en la que se han introducido algunas modificaciones destinadas a conseguir una amplificación selectiva y muy eficaz de un fragmento específico de ADN (figura 2).¹⁵

El objetivo de la PCR es la amplificación de un fragmento de ADN, presente en mezclas de muy diversas fuentes sin necesidad de una purificación previa. Se puede partir de homogeneizados, extractos crudos, sangre completa, mezclas de fragmentos de ADN obtenidos con enzimas de restricción, muestras resultantes de la extracción y aislamiento de ADN, etc.¹⁶

El proceso implica la participación de un molde de ADN del que se requiere amplificar una región, dos iniciadores (oligonucleótidos de 20-30 bases), mezcla de deoxinucleótidos trifosfatos, solución amortiguadora, cloruro de magnesio y una ADN polimerasa.¹⁵

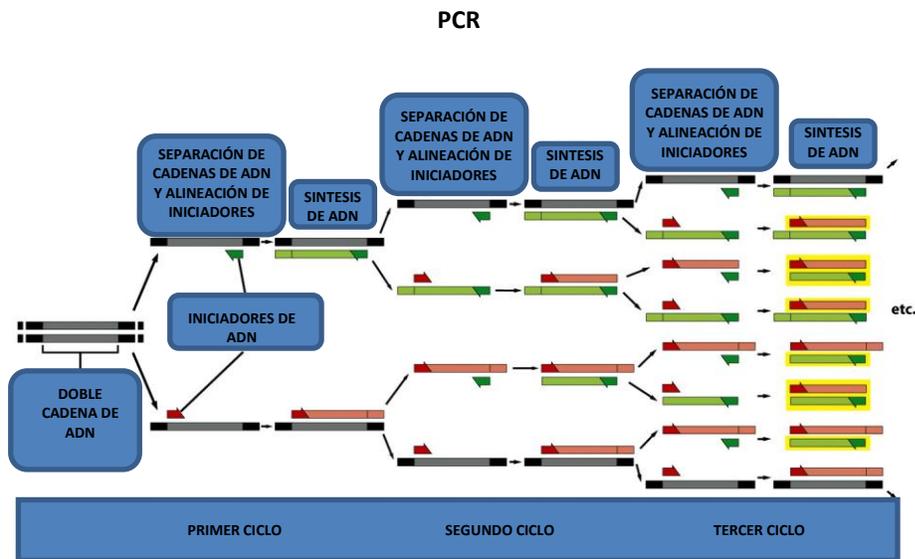


Figura 2. Desarrollo de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Tomada para fines didácticos de Alberts, 2009.

2. RT-PCR: La técnica de la RT-PCR es una variante de la PCR que permite detectar la acumulación de ARN en órganos, tejidos o células.¹⁶ El nombre de 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, de inicio no se obtiene una copia de ARN, sino de ADN, aunque mantiene la secuencia original. El proceso comienza con la síntesis de ADNc por la acción de la transcriptasa reversa, una polimerasa de ADN dirigida por ARN, el ADNc permanece unido al molde como dúplex ARN:ADNc. En una segunda etapa, este dúplex se desnaturaliza 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.¹⁷
3. PCR Anidada: La especificidad se puede aumentar realizando una segunda reacción de PCR (PCR anidada), con dos nuevos iniciadores que hibridan dentro del fragmento diana amplificado por el primer par de iniciadores, dando así lugar a productos de PCR más cortos, pero más específicos. Sólo las copias correctas de la primera diana contendrán ambas secuencias complementarias a los nuevos iniciadores, a diferencia de los productos inespecíficos generados en la primera PCR (que se observan en la electroforesis como múltiples bandas o una banda difusa),

motivo por el cual no resultarán amplificadas en la segunda reacción (PCR anidada). Este método también sirve para aumentar el factor de amplificación conseguido, al suponer dos rondas de amplificación.¹⁷

Gran parte del éxito de una reacción de amplificación depende de los iniciadores utilizados. Frisk y col. (1999), diseñaron un par de iniciadores que han probado ser una buena alternativa, de tal manera que es una de las secuencias que más se han utilizado en trabajos experimentales con el VDC. Dichos iniciadores fueron diseñados para amplificar un fragmento del gen de la nucleocápside del VDC, están localizados en una región altamente conservada de este gen en la cepa Onderstepoort y la longitud del producto amplificado es de 287 pb. Con el fin de aumentar la sensibilidad de esta prueba, Yong-Hwan y col. (2001) diseñaron dos pares de iniciadores y propusieron el uso de dos reacciones sucesivas (RT-PCR+PCR anidada). Igual que en Frisk y col. (1999), los iniciadores utilizados amplifican el gen de la nucleocápside del VDC de la cepa Onderstepoort y el tamaño del amplificado obtenido después de desarrollar ambas reacciones es de 419 pb.

En un trabajo previo realizado en la FESC se utilizaron los dos pares de iniciadores diseñados por Yong-Hwan con excelentes resultados.¹⁸ Sin embargo todos los resultados positivos sólo fue posible obtenerlos hasta que se realizó la PCR anidada y en ningún ensayo se pudo obtener un amplificado utilizando únicamente la RT-PCR.

En este trabajo se utilizarán los iniciadores diseñados por Yong-Hwan y col., (2001) y Frisk y col., (1999) para desarrollar la RT-PCR, utilizando muestras de cultivos celulares infectados con VDC de origen vacunal (cepa Onderstepoort) y con un virus aislado de un brote de campo. Finalmente, se realizarán las reacciones de RT-PCR y PCR anidada con el uso combinado de ambos pares de iniciadores. Los resultados obtenidos nos permitirán determinar la utilidad de cada una de estas reacciones en la detección del VDC como herramienta de diagnóstico o de investigación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Realizar la detección del virus de Distemper Canino por medio de técnicas moleculares (RT-PCR y RT-PCR + PCR anidada).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a. Obtener partículas virales de VDC provenientes de cultivos celulares infectados con virus vacunal y virus de campo.

- b. Obtener ARN de buena calidad a partir de los cultivos celulares infectados con virus vacunal y virus de campo.

- c. Determinar las condiciones óptimas para desarrollar la reacción de RT-PCR para cada uno de los pares de iniciadores utilizados.

- d. Realizar la detección del virus de Distemper Canino mediante RT-PCR + PCR anidada combinando los diferentes pares de iniciadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Obtención del virus

El virus de Distemper Canino (VDC) de origen vacunal fue obtenido de la vacuna Puppy DP^{MR}(Nobivac). La estrategia aplicada en la obtención de este virus comprendió dos pasos, de los cuales el primero fue infectar de manera transitoria células de linfoma de ratón¹⁹, las cuales fueron incubadas a 37°C y la interacción se mantuvo sólo durante tres días, después de los cuales las partículas virales fueron liberadas por medio de ciclos sucesivos de congelación-descongelación. Con las partículas obtenidas se infectó un cultivo de células RK13 (células epiteliales de riñón de conejo) mantenidas en medio de cultivo DMEM+SFB 5% en el cual se dejó desarrollar el ciclo viral completo, el cultivo infectado fue mantenido en incubación hasta que se hizo evidente el efecto citopático, después de lo cual se obtuvieron las partículas virales de la misma manera que en el paso anterior, el producto final fue mantenido en congelación hasta su uso.

Por su parte, el virus de campo proviene de un brote que se desarrolló en la FES Cuautitlán en 2006 y los viriones fueron obtenidos a partir de un extracto de bazo de un cachorro de tres meses de edad que murió manifestando los signos clínicos de esta enfermedad. Así mismo cultivos confluentes de células RK-13 fueron infectados con este virus de campo, los cultivos infectados fueron incubados a 37°C durante 6 días y posteriormente se liberaron las partículas con ciclos consecutivos de congelación-descongelación, la suspensión final fue mantenida en congelación hasta su utilización.

b) Purificación de ARN

El ARN total fue aislado a partir de 500 µl de suspensión de un cultivo de células RK-13 infectado con virus vacunal (cepa Onderstepoort) o con virus de campo, los cuales fueron depositados en un tubo Ependorf de 1.5 ml. Se agregó 1 ml de TRIzol^{MR}(Invitrogen, Cat. 15596-026) que es un reactivo a partir de una solución mono-fásica de fenol e isotiocianato de guanidina para el aislamiento de ARN desarrollado por Chomczynsky y Sacchi. Después de una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo para facilitar la separación de la fase acuosa, se agitaron los tubos por inversión manual durante 1 minuto y se incubaron por 2 a 3 minutos a TA.

Posteriormente, se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos a 4°C (al finalizar este paso encontramos una fase roja inferior llamada fase de fenol-cloroformo, una fase intermedia con ADN y una fase acuosa incolora superior con el ARN), se transfirió la fase acuosa a un tubo Ependorf nuevo y se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico que precipita el ARN, 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 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se levantó la pastilla de ARN que quedó en el fondo del tubo con 1 ml de Etanol al 75 % frío y fue lavada con vórtex.

El ARN fue nuevamente centrifugado a 10,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se permitió que el etanol se evaporara completamente. Finalmente, el ARN fue disuelto en 40 µl de agua destilada con dietil pirocarbonato (agua-DEPC). Estas muestras fueron mantenidas en congelación para su utilización en la reacción de la transcriptasa reversa en los 10 días subsecuentes sin ningún problema. Todo el material que se utilizó era nuevo y estéril (tubos y puntas para micropipetas).

El ARN total fue cuantificado con el fin de determinar la cantidad y calidad del ARN obtenido, las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Jenway, Genova MK3) utilizando una longitud de onda de 260 nm. Posteriormente se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. Debido al tamaño de los ARN ribosomales, que son las moléculas que son visibles se utilizó esta concentración de agarosa.

c) Reacción de la Transcriptasa reversa

Se utilizó la transcriptasa reversa M-MLV^{MR} (Invitrogen, cat. 28025-013) junto con el iniciador 5 (figura 2) diseñado por Yong-Hwan y col. (2001), 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. Estas reacciones fueron realizadas en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) y la concentración de los reactivos utilizados en la RT se muestra en la Tabla 1.

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

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

ND: No determinado.

d) Reacciones de PCR

Para los ensayos de PCR se utilizaron dos pares diferentes de iniciadores; el primer par se tomó de Frisk y col. (1999) y el otro de Yong-Hwan y col. (2001), ambos pares de iniciadores limitan una secuencia específica del gen de la nucleocápside de la cepa Onderstepoort del VDC. En el caso de los iniciadores diseñados por Frisk (denominados 1 y 2 en este trabajo) determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb, mientras que el fragmento limitado por los iniciadores diseñados por Yong-Hwan (denominados 3 y 4 en este trabajo) es de 419 pb (figura 3 y tabla 2). Para la realización de este trabajo los iniciadores mencionados fueron sintetizados por un laboratorio comercial (Accesolab).

Estas reacciones fueron realizadas en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) y la concentración de los reactivos utilizados en la reacción Frisk se muestra en la tabla 5 y para Yong-Hwan se muestra en la tabla 4.

e) Reacción de PCR Anidada

Para realizar la PCR anidada se tomaron 5 μ l del resultado de la reacción de RT-PCR y se preparó la reacción de PCR anidada con las mismas concentraciones usadas previamente (tabla 3). Para el producto obtenido de la RT-PCR se utilizaron los iniciadores diseñados por Yong-Hwan (2001), esta reacción se llevó a una serie de nuevos ciclos utilizando los iniciadores diseñados por Frisk (1999) (PCR anidada), estos iniciadores determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb que se localiza dentro de la región amplificada

con la RT-PCR (figura 3). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) utilizando las condiciones empleadas por el autor (tabla 5).

f) Visualización de los amplificados

Los amplificados obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. La detección del virus se basó en la obtención de un amplificado cuyo tamaño debe corresponder con el número de pares de bases esperado; 287 pb para los iniciadores diseñados por Frisk y 419 pb para los de Yong-Hwan.

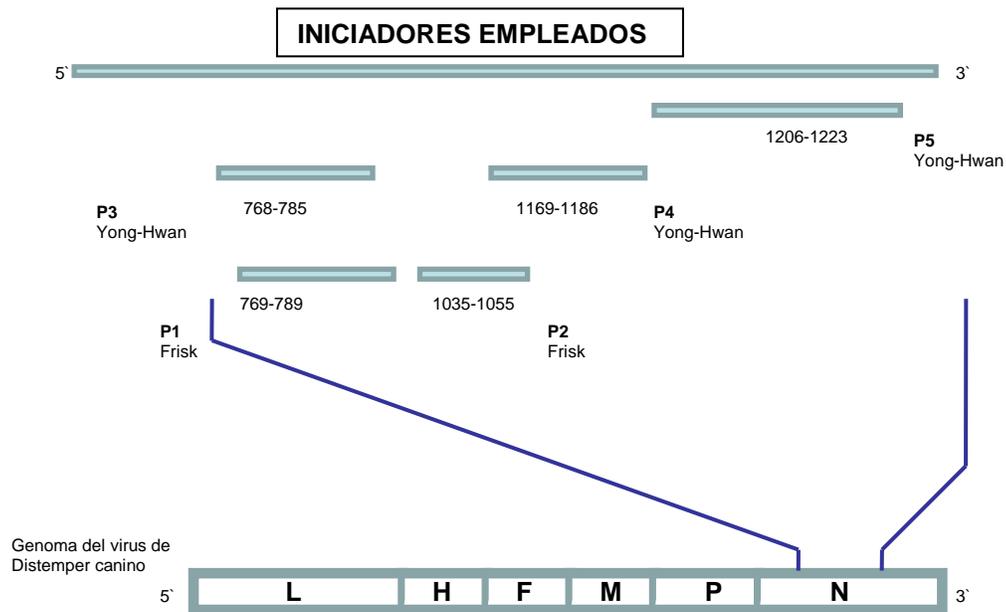


Figura 3. Ubicación de los iniciadores empleados en las reacciones de RT-PCR y RT-PCR + PCR anidada. L=RNA polimerasa, H=hemaglutinina, F=fusión, M=matriz, P=fosfoproteína, N= nucleocápside.

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores empleados en las reacciones de RT-PCR + PCR anidada.

INICIADOR	SECUENCIA 5' - 3'	AMPLIFICACIÓN (Pb)	POSICION DE NUCLEOTIDOS	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN	REFERENCIA
Primer 1	ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT	287	769-789	59.5°C	Frisk y col., 1999
Primer 2	CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC	287	1055-1035	59.5°C	Frisk y col., 1999
Primer 3	GTT AGC TAG TTT CAT CCT	419	768-785	54°C	Yong-Hwan y col., 2001
Primer 4	GGT CCT CTG TTG TCT TGG	419	1169-1186	54°C	Yong-Hwan y col., 2001
Primer 5	GGCGCT CAT CTT GGA CAT	--	1206-1223	--	Yong-Hwan y col., 2001

Tabla 3. Concentración de los reactivos utilizados en las reacciones de PCR.

Reactivos	Solución Stock	Concentración final	Volumen
Amortiguador	10x	1x	5 µl
Cloruro de Magnesio	50 mM	2.5 mM	2.5 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
Taq polimerasa	5 U/µl	2.5 U	0.5 µl
ADNc	ND	ND	5 µl
Agua (cbp)	--	--	50 µl

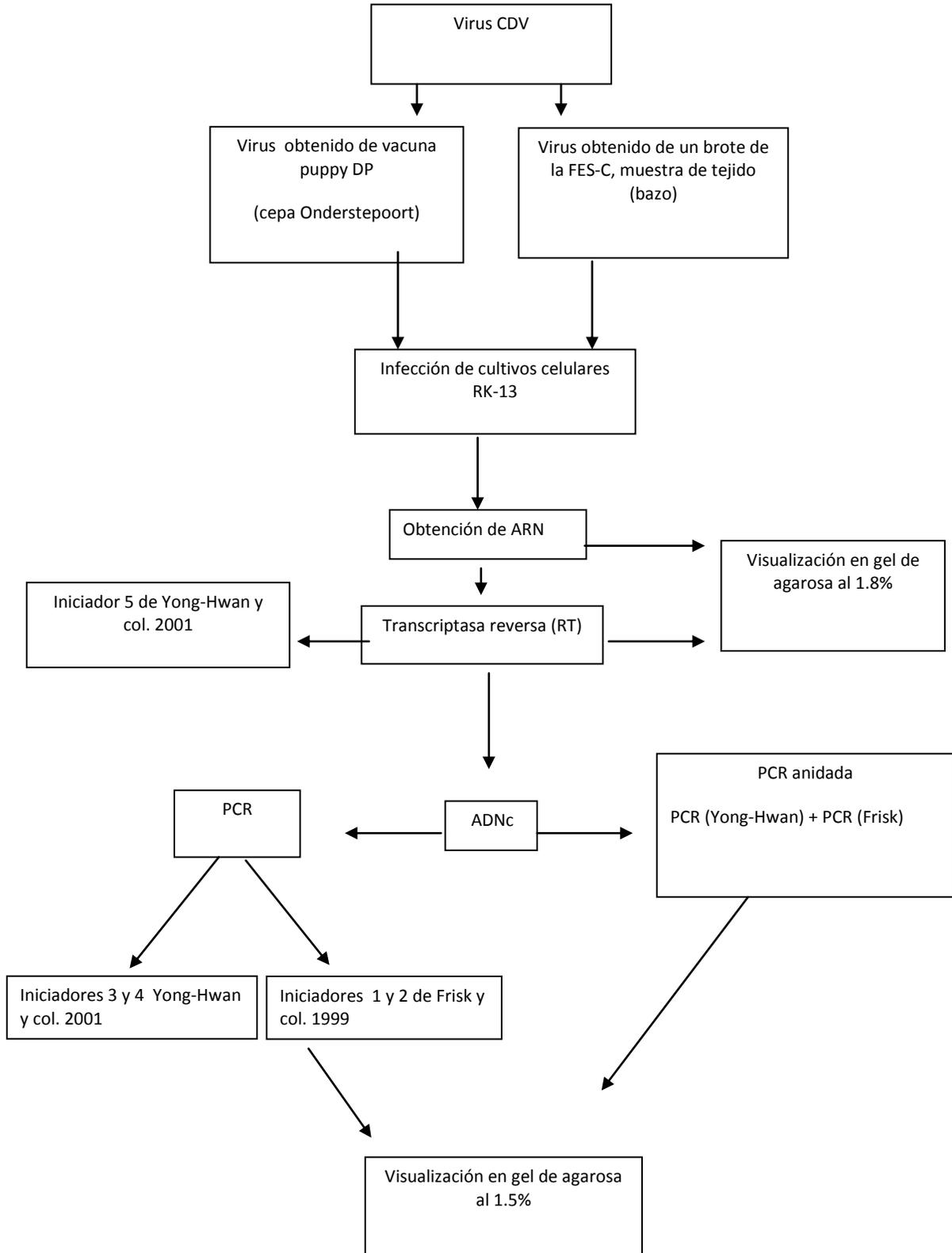
Tabla 4. Condiciones de amplificación empleadas durante el desarrollo de la PCR utilizando los iniciadores diseñados por Yong-Hwan y col. (2001).

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

Tabla 5. Condiciones de amplificación empleadas durante el desarrollo de la PCR utilizando los iniciadores diseñados por Frisk y col. (1999).

Etapas	No. de ciclos	Condiciones
Desnaturalización inicial	1	94°C por 3 minutos
Desnaturalización	30	94°C por 30 segundos
Alineamiento	30	59.5°C por 1 minuto
Amplificación	30	72°C por 30 segundos
Amplificación final	1	72°C por 5 minutos

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

a) Obtención del virus

Cultivos confluentes de células RK-13 fueron infectados con virus de Distemper Canino (VDC) de origen vacunal y con un aislado de un brote de campo, se dejó desarrollar el ciclo viral completo hasta que el efecto citopático fue evidente y se visualizó en un microscopio invertido. Estas células mostraron un crecimiento rápido y fue notoria la replicación del VDC tanto vacunal como de campo, a los 5 días se observó el efecto citopático que consistió en la formación de cúmulos celulares que rápidamente condujeron a la formación de sincitios, también resultó evidente la presencia de vacuolas en el citoplasma de las células infectadas (figura 4).

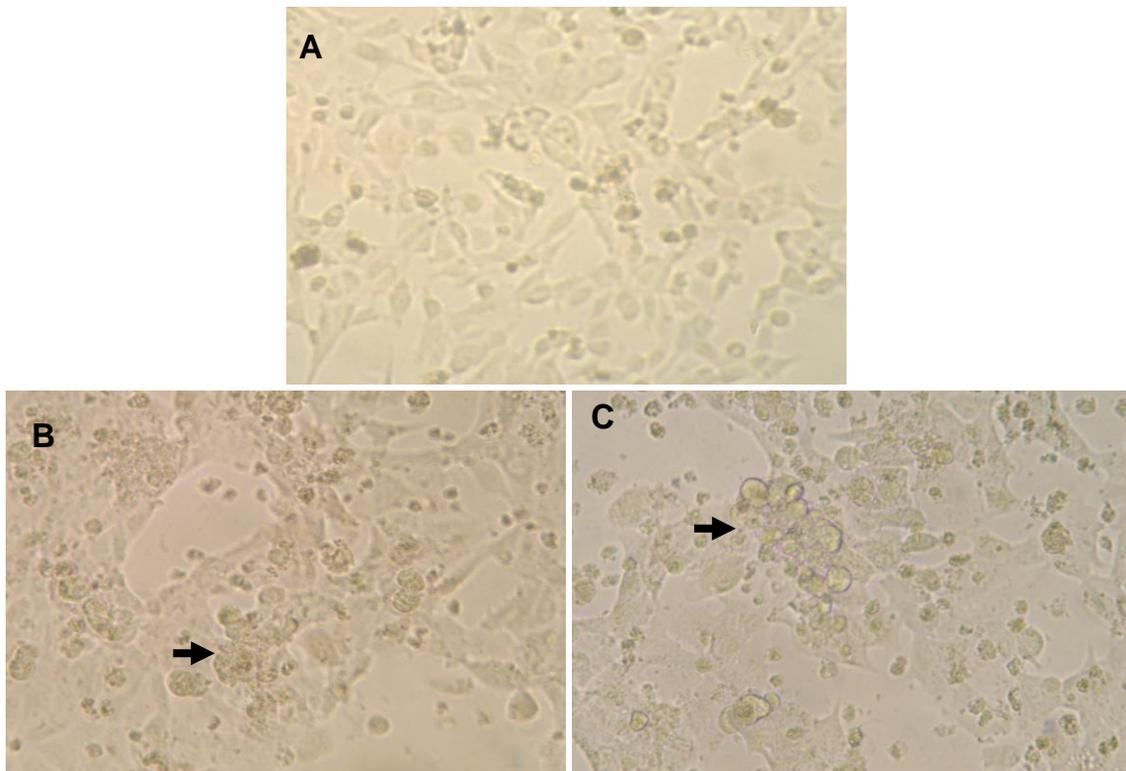


Figura 4. Cultivos de células RK-13. A. células sin infectar (control); **B.** células infectadas con virus de campo; **C.** células infectadas con virus vacunal (cepa Onderstepoort). La flecha indica la presencia de efecto citopático en los cultivos infectados.

b) Purificación del ARN

El ARN total de los cultivos celulares infectados con VDC fue obtenido con TRIzol^{MR} (Invitrogen, cat. 15596-026). Para conocer la cantidad y la calidad del ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Jenway, Genova MK3) utilizando luz ultravioleta de 260 nm de longitud de onda y posteriormente se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (figura 5). De la muestra de virus vacunal se logró obtener 400 pg/ μ l y de la muestra de virus de campo 920 pg/ μ l (tabla 6). Podemos señalar que se obtuvo una cantidad adecuada de ARN total, aunque se desconoce la proporción presente de ARN viral. Al observar el gel de agarosa al transiluminador se aprecian dos bandas bien definidas de ARN lo cual indica que no se encuentra degradado y que es de buena calidad (figura 5).

Tabla 6. Cuantificación del ARN total.

Muestra	Lectura 260 nm	Concentración
Cultivo infectado con virus vacunal	0.010	400 pg/ μ l
Cultivo infectado con virus de campo	0.023	920 pg/ μ l

c) Reacción de la Transcriptasa Reversa

Con el fin de obtener el ADN complementario (ADNc) del gen de la nucleocápside viral se realizó la reacción de transcriptasa reversa (RT), para esto se utilizó el iniciador 5 de Yong-Hwan y col. (2001) y se llevó a cabo en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) utilizando las condiciones mencionadas en materiales y métodos. El resultado de esta reacción se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.8% y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (figura 5). Debido a que no hay amplificación durante la RT no se espera observar ningún amplificado y en algunos casos sólo se llega a observar un barrido tenue tal como sucedió en nuestro trabajo.



Figura 5. Visualización del ARN purificado y del producto de la reacción de la Transcriptasa Reversa (RT). Carril 1, ARN purificado a partir del aislado de virus vacunal; carril 2, ARN purificado a partir del aislado de virus de campo; carril 3, producto de la RT a partir del aislado de virus vacunal; carril 4, producto de la RT a partir del aislado de virus de campo.

d) Reacción de PCR utilizando los iniciadores diseñados por Yong-Hwan y Frisk (RT+PCR)

Esta reacción se realizó con el fin de amplificar un fragmento del gen de la nucleocápside del virus de Distemper Canino en muestras de cultivos de células RK13 infectados con virus vacunal y con virus de campo. En la primera reacción se utilizaron los iniciadores 3 y 4 de Yong-Hwan (2001) (tabla 2 y figura 3) que determinan la amplificación de un fragmento de 419 pb. En una segunda reacción se utilizaron los iniciadores 1 y 2 de Frisk (1999) (tabla 2 y figura 3) que determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb. Como control negativo se utilizó un cultivo de células RK-13 sin infectar. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) utilizando las concentraciones (tabla 3) y las condiciones reportadas por los autores (tablas 4 y 5). Posteriormente, los resultados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. No fue posible detectar la presencia del virus de DC en ninguna de las muestras con ninguna de las reacciones. Al observar el gel de agarosa al transiluminador se aprecia la presencia de productos inespecíficos, en el caso de la reacción de Yong-Hwan se observa una banda que

no corresponde al amplificado esperado de 419 pb (figura 6A), y para Frisk observamos varias bandas y barridos que tampoco corresponden al amplificado esperado de 287 pb (figura 6B).

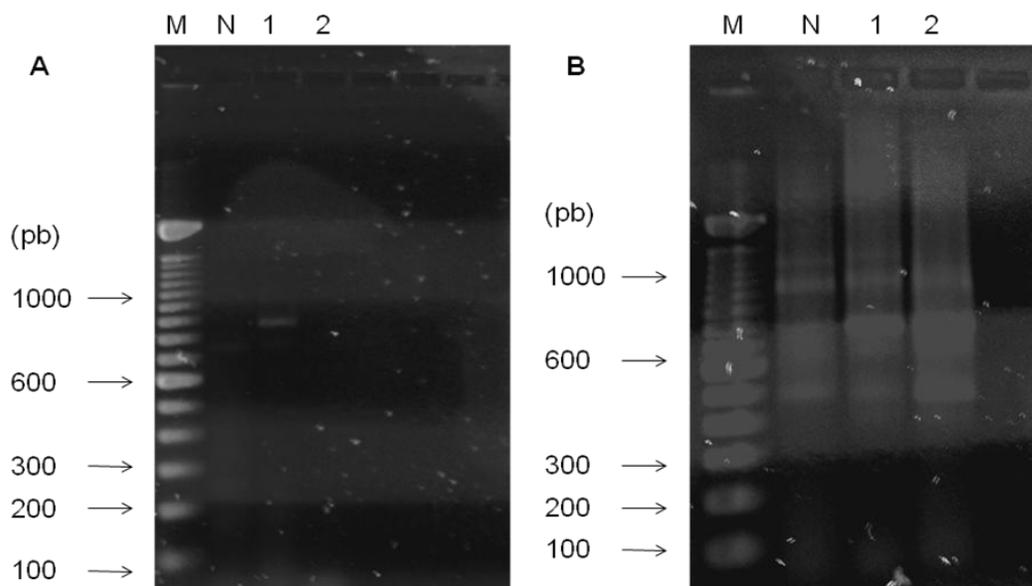


Figura 6. Detección del gen de la nucleocápside (NP) del virus de Distemper Canino por RT-PCR.
A. Utilizando los iniciadores diseñados por Yong-Hwan y col. (419 pb) Carril 1, virus de campo; carril 2, virus vacunal. **B.** Utilizando los iniciadores diseñados por Frisk y col. (287 pb) Carril 1, virus de campo; carril 2, virus vacunal; N, control negativo; M, marcador de ADN de 100 pb (Invitrogen, catálogo 15628-019).

e) Reacción de PCR anidada (RT-PCR + PCR Anidada)

Esta reacción se realizó con el fin de aumentar la especificidad y sensibilidad de la RT-PCR inicial. El producto obtenido de la PCR en la que se utilizaron los iniciadores diseñados por Yong Hwan y col. (2001), fue sometido a una serie de nuevos ciclos utilizando los iniciadores diseñados por Frisk y col. (1999) (PCR anidada). Para realizar esta prueba se utilizaron muestras de virus vacunal y de virus de campo. Los iniciadores de Frisk determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb que se localiza dentro de la región amplificada con la RT-PCR (figura 3). Como control negativo se empleó un cultivo de células RK-13 sin infectar. Las reacciones se realizaron en un termociclador (TechGene, mod. FT Gene 2D) utilizando las concentraciones (tabla 3) y condiciones empleadas por los

autores (tablas 4 y 5, respectivamente). Posteriormente se analizó el producto de esta reacción mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta. Al observar el gel de agarosa al transiluminador se observa una banda bien definida de 287 pb tanto en la muestra de virus vacunal (figura 7A) como en las muestras de virus de campo (figura 7B) que corresponde al amplificado esperado y corrobora la presencia del VDC en ambas muestras.

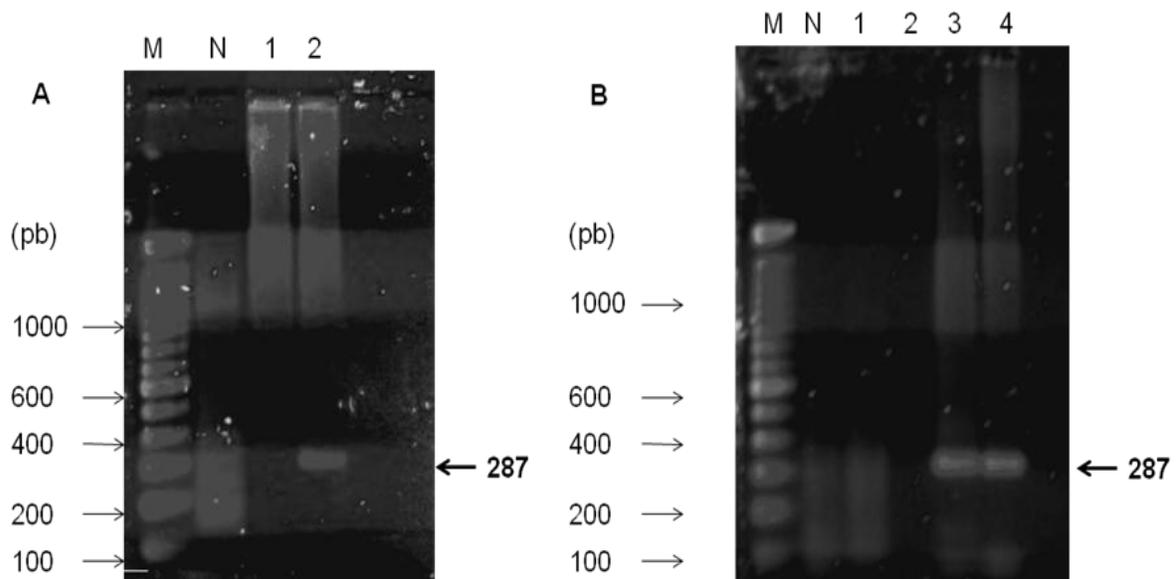


Figura 7. Detección del gen de la nucleocápside (NP) del virus de Distemper Canino por RT-PCR utilizando los iniciadores diseñados por Yong- Hwan+PCR anidada utilizando los iniciadores diseñados por Frisk. A. Carril 1-2, muestras de virus vacunal; carril 1 RT-PCR; carril 2 PCR anidada; B. Carril 1-4, muestras de virus de campo; carril 1 y 2, RT-PCR; carril 3 y 4, PCR anidada; N, control negativo; M, marcador de ADN de 100 pb (Invitrogen, catálogo 15628-019).

DISCUSIÓN

El diagnóstico de Distemper Canino se basa principalmente en la sospecha clínica, apoyada por el antecedente característico de un cachorro de 3-6 meses de edad que aún no ha sido vacunado.^{2, 5} También se puede identificar el antígeno viral por ELISA, inmunofluorescencia o bien se puede realizar el aislamiento del virus.⁶

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., sin embargo esta sensibilidad varía con la muestra elegida, el método de extracción del ácido nucleico y los iniciadores utilizados.^{3,}

⁷ Se menciona que la PCR combinada con PCR anidada resulta ser el método más sensible para detectar el VDC.^{2, 20, 21}

El objetivo de este trabajo fue realizar la detección del VDC por medio de RT-PCR y RT-PCR + PCR anidada utilizando dos diferentes pares de iniciadores. Por ello se utilizaron los iniciadores diseñados por Frisk y col. (1999) y Yong-Hwan y col. (2001) los cuales limitan una secuencia específica del gen de la nucleocápside de la cepa Onderstepoort del virus de Distemper Canino y se buscaba determinar si existía alguna diferencia en cuanto a capacidad de amplificar entre ambos pares de iniciadores. Para realizar las pruebas se utilizaron muestras provenientes de cultivos de células RK-13 infectados con virus vacunal y virus de campo, y el control negativo fue un cultivo celular no infectado.

Es importante señalar que en varios estudios se revela que el gen de la nucleocápside está altamente conservado en todos los *Morbillivirus*, así en un trabajo donde se compara la secuencia del gen de la nucleocápside de una cepa virulenta (A75/17) con una cepa atenuada (Onderstepoort), se reporta una gran similitud entre ambas secuencias y sólo pequeños cambios en ciertas regiones.²²

A pesar de existir algunas diferencias antigénicas entre cepas de VDC demostradas por pruebas serológicas, se acepta generalmente que existe un sólo serotipo. Sin embargo, existen diferencias considerables en cuanto a la patogenicidad de las diferentes cepas aisladas. Así, las diferentes cepas del VDC presentan propiedades biológicas distintas y sin embargo, pueden tener la misma reactividad frente al análisis por anticuerpos monoclonales.¹¹ Asimismo, se ha señalado que las cepas de VDC pueden diferenciarse por

su capacidad para realizar su replicación o no en cierto tipo de células, además de que pueden desarrollar diferentes clases de efectos citopáticos.^{11, 23, 24}

La cepa vacunal del VDC provino de la vacuna Puppy DP^{MR} (Nobivac), dicha vacuna está compuesta de partículas virales de Distemper y Parvovirus canino, así es que fue necesario aislar a los viriones de Distemper Canino. Para hacerlo se sacó provechó del tropismo que de manera natural presenta el VDC por los linfocitos, para esto la suspensión vacunal se puso a interactuar con células de linfoma de ratón y sin esperar el desarrollo de ECP se obtuvieron las partículas virales y, con el producto resultante, se infectó el cultivo de células RK-13, en el cual, finalmente se permitió el desarrollo completo del ciclo viral y la manifestación de los efectos citopáticos (figura 3). En este punto es importante recalcar que las dos cepas utilizadas fueron capaces de replicar en las células RK-13, el desarrollo de efectos citopáticos (ECP) y, el hecho de que, los ECP inducidos fueron idénticos en ambas cepas.^{11, 23, 24}

Por su parte, el virus de campo provino de un brote que se desarrolló en la FES Cuautitlán en 2006 y los viriones fueron obtenidos a partir de un extracto de bazo de un cachorro de tres meses de edad que murió manifestando los signos clínicos de esta enfermedad.

La extracción de ARN se realizó con TRIzol^{MR} (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante y se puede señalar que el ARN obtenido cumple con los estándares de calidad y cantidad reportadas en los protocolos (tabla 6, figura 4). Sin embargo, no es posible determinar la proporción que de dicho ARN es de origen viral.

En una de las reacciones de PCR se utilizaron los iniciadores 3 y 4 de Yong-Hwan y col. (2001) los cuales determinan la amplificación de un fragmento de 419 pb y en otra reacción se utilizaron los iniciadores 1 y 2 de Frisk y col. (1999) que determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb. A pesar de que se realizaron varios intentos no fue posible obtener el amplificado esperado en ninguna de las reacciones probadas (Yong-Hwan y Frisk).^{2, 3}

La PCR anidada se realizó con el fin de aumentar la capacidad de detección y la especificidad de esta prueba molecular, para ello se sometió el producto obtenido de la PCR en la que se utilizaron los iniciadores diseñados por Yong Hwan y col. (2001), a una serie de nuevos ciclos utilizando los iniciadores diseñados por Frisk y col. (1999). La realización de la PCR anidada significó someter a la secuencia problema a otros 30 ciclos de amplificación, lo cual hizo posible detectar el amplificado, los iniciadores de Frisk

determinan la amplificación de un fragmento de 287 pb, luego entonces como producto de esta prueba se logró el amplificado esperado en ambas muestras.^{2, 20, 21}

Este resultado parece confirmar la hipótesis de que la no detección del amplificado en las pruebas de RT-PCR se puede atribuir a que existe una cantidad insuficiente de ARN viral en las muestras procesadas, ya que al asociar a la RT-PCR con la PCR anidada se logró obtener el amplificado de 287 pb en los dos tipos de muestras.

La presencia de una cantidad mínima de ARN viral, la actividad de las RNAsas endógenas y la falta de accesibilidad del ARN parcialmente degradado pueden influir hasta en un 86-88% sobre la sensibilidad de la prueba de PCR.²¹ A pesar de que se cuantificó el ARN obtenido, no fue posible evaluar la sensibilidad de esta prueba ya que partimos del ARN total y no hay forma de determinar la proporción exacta de ARN viral.

Con el fin de evaluar adecuadamente la sensibilidad de esta prueba resulta necesario clonar la secuencia blanco (gen de la nucleocápside) y de esta manera poder determinar el número de copias del gen que se estarían colocando en la mezcla de reacción de la PCR.^{25, 26}

En este trabajo se logró la amplificación del fragmento esperado del gen de la nucleocápside tanto en la muestra de virus vacunal como en la de virus de campo. Al resultar positivas ambas muestras se podría considerar que la cepa del virus de campo es similar o idéntica a la Onderstepoort, pero existen varios estudios que revelan que las cepas del VDC tienen pequeñas diferencias en las secuencias de su ARN²⁰, de tal forma que la evidencia encontrada (amplificación del gen de la nucleocápside con los mismos iniciadores) no permite determinar la cepa de nuestro virus de campo, para ello sería necesario realizar estudios de epidemiología molecular que permitieran determinar la relación entre estas dos cepas.^{27, 28} El uso de la PCR en la epidemiología molecular, constituye una novedosa herramienta para la aplicación rápida y eficaz de las medidas en el control epidemiológico de las enfermedades infecciosas,²⁹ aunque en el caso del VDC los genes que se evalúan por presentar una mayor variabilidad son los genes de la hemaglutinina (H) y el de la proteína de fusión (F).^{27, 28, 30} Resulta clara la necesidad de realizar este tipo de estudios en nuestro país con el fin de conocer el comportamiento epidemiológico de esta enfermedad que a final de cuentas es el resultado de cambios inesperados en el genoma del virus.^{27, 28}

CONCLUSIONES

-En todas las muestras trabajadas se obtuvo una cantidad adecuada de ARN total, aunque no fue posible determinar la proporción presente de ARN viral.

-El análisis electroforético permitió apreciar que el ARN purificado era de buena calidad.

-La reacción de RT-PCR no fue capaz de detectar la presencia del virus de Distemper Canino en ninguna de las muestras y con ninguno de los dos pares de iniciadores.

-La no detección del amplificado en las pruebas de PCR se puede atribuir a una cantidad insuficiente de ARN viral en las muestras, ya que al asociar a la RT-PCR con la PCR anidada se logró obtener el amplificado de 287 pb en los dos tipos de muestras.

-La estandarización de las pruebas y el uso exitoso de los oligonucleótidos reportados por Yong Hwan (2001) y Frisk (1999) posibilita su uso como método de diagnóstico para la enfermedad de Distemper Canino.

GLOSARIO

- **ADN:** Largo polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN constituye el material genético de la mayoría de los organismos y orgánulos que se conocen; normalmente se encuentra formando una doble hélice, aunque algunos genomas virales contienen ADN de una sola cadena. ³¹
- **ADNc:** ADN monocatenario sintetizado *in vitro* a partir de un molde de ARN maduro por medio de la enzima transcriptasa reversa. ³¹
- **ARN:** Ácido orgánico, polímero de los ribonucleótidos adenina, guanina, citosina y uracilo. Constituye el material genético de algunos virus y de forma más general, es la molécula derivada del ADN por transcripción, que transporta la información (ARN mensajero), suministra la estructura subcelular (ARN ribosomal), transporta a los aminoácidos (ARN de transferencia) o facilita su propia modificación bioquímica o la de otras moléculas de ARN. ³¹
- **BROMURO DE ETIDIO:** Colorante fluorescente que puede intercalarse entre pares de bases de ADN bicatenario, de ahí su aplicación generalizada para teñir ácidos nucleicos en geles. ³¹
- **CLOROFORMO:** Compuesto orgánico que se utiliza en biología molecular en la purificación de ácidos nucleicos, mejorando la eficiencia de extracción de proteína de tal forma que aumenta la concentración final de los ácidos nucleicos. ³¹
- **DEPC:** Es un compuesto usado en los laboratorios de biología molecular con el fin de inactivar RNAsas, que son enzimas capaces de degradar el RNA. ³¹
- **ECP:** Son los cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a la microscopía óptica, causados durante el ciclo de replicación viral. ³²
- **ELECTROFORESIS:** Técnica de uso generalizado en biología celular. Se utiliza para separar los componentes de mezclas complejas de macromoléculas. Para ello las muestras se someten a un campo eléctrico aplicado a través de una matriz porosa; en tales condiciones, las moléculas migran a velocidades que dependen de sus cargas eléctricas y/o pesos moleculares. ³¹

- **ELISA:** Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a una Enzima que se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción. ³¹
- **INICIADORES:** Pareja de oligonucleótidos que sirven para delimitar una región específica de ADN. ³¹
- **NP:** Estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros. En el interior de esta cápside se encuentra el material genético del virus. ³²
- **PCR:** Técnica de la biología molecular cuyo objetivo es sintetizar un gran número de copias a partir de un fragmento específico de ADN. En teoría es suficiente tener una única molécula del fragmento original para al final de la reacción obtener una gran cantidad de copias, esto permite detectar la secuencia buscada. La PCR resulta útil en el diagnóstico de virus o bacterias causantes de enfermedad, para identificar personas (cadáveres) o hacer investigación científica sobre el ADN amplificado.
- **RT:** La transcriptasa reversa es el proceso en el que se realiza la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de una secuencia de ARN. ³¹
- **TRANSCRIPTASA REVERSA:** Enzima que permite la transcripción del ADN a partir de un molde de ARN. ³¹

BIBLIOGRAFÍA

1. Saito TB, Alfieri AA, Wosiacki SR, Negro FJ. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Res Vet Sci* 2006 80: 116-119.
2. 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: 59-63.
3. Frisk AL, 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.
4. Morgan RV. *Clínica de Pequeños Animales*. 3ª ed. Madrid: Harcourt, 1999: 1127-1129.
5. Ettinger SJ. *Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. 6ª ed. Madrid: Elsevier, 2007: 649-650.
6. Greene C. *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. 2ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2000: 11-23.
7. Nelson R. *Medicina interna de animales pequeños*. 2ª edición, Intermédica, Buenos Aires Argentina. 2000 pp. 1373-1376.
8. Murphy F. *Veterinary Virology*. 3rd ed. USA: Academic Press, 1999: 411-416.
9. Wheeler J.T. 2007. *Redvet. Revista electrónica veterinaria* 2007. Vol.VIII Núm. 6.
10. Birchard S, Sharding R. *Manual clínico de procedimientos en pequeñas especies*. 2ª ed. Mc Graw-Hill Interamericana, 2002: 123-126.
11. Appel MJG, Summers BA. Canine Distemper: Present State. Carmichael L (editor). *Recent Advances in Canine Infectious Diseases*. International Veterinary Information Service, USA, 1999. http://www.IVIS.org/advances/Infect_Dis.Carmichael/appel/chapter_frm.asp?LA=1
12. Hagan W, Bruner D, Gillespie J. *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos: con especial referencia a: etiología, patogenia, inmunidad, epidemiología, diagnóstico y terapéutica biológica*. 4ª ed. Prensa Mexicana S.A. México. 1981: 691-704.
13. Appel MJG, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology* 1995 44: 187-191.

14. Schaer M. Clinical medicine of the dog and cat. Iowa State Press, 2003: 80-81.
15. Ramos R. Técnicas de investigación en biología molecular. Madrid: UAM Ediciones, 2001: 85-90.
16. Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. España: Harcourt, 2001: 187-196.
17. Tagu D, Moussard C. Fundamentos de las técnicas de Biología Molecular. España: Acribia, 2003: 78-91.
18. Lozano Orozco JG. Detección del virus de Distemper Canino por métodos moleculares (Tesis de Licenciatura). FES Cuautitlán México, UNAM, 2006.
19. Hironobu T, Nobuyuki O, Yusuke Y. Morbilliviruses Use Signaling Lymphocyte Activation Molecules (CD150) as Cellular Receptors. Journal of Virology. 2001 75:5842-5850.
20. Jozwik A , Frymus T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. Vet Res Commun 2005 29: 347-359.
21. Rzez'utka A, Mizak B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. Veterinary Microbiology 2002 88: 95-103.
22. Stettler M, Zurbriggen A. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. Veterinary Microbiology 1995 44: 11-12.
23. Lan NT, Yamaguchi R, Takuya H, Kazushige K. Relationship between growth behavior in vero cells and the molecular characteristics of recent isolated classified in the Asia 1 and 2 groups of canine distemper virus. J Vet Med Sci 2009 71: 457-461.
24. Techangamsuwan S, Haas L, Rohnd K, Baumgärtner W. Distinct cell tropism of canine distemper virus strains to adult olfactory ensheathing cells and Schwann cells in vitro. Virus Res 2009 144: 195-201.
25. Shin YS, Mori T, Tomonaga K, Iwatsuki K. Expression of the nucleocapsid protein gene of the canine distemper virus. J Vet Med Sci 1997 59: 51-53.
26. Latha D, Geetha M, Ramadass P, Narayanan RB. 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.

27. Sultan S, Charoenvisal N, Nguyen TL, Ryoji Y. The Asia 2 specific signal peptide region and other domains in fusion protein genes characterized Asia 1 and Asia 2 canine distemper viruses. *Virology* 2009 6: 157.
28. Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology* 2006 116: 301-309.
29. Belák S, Thorén P. Molecular diagnosis of animal diseases: some experiences over the past decade. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2001 4: 434-443.
30. Mochizuki M, Hashimoto M, Hagiwara S, Yoshida Y. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 1999 37: 2936-2942.
31. Jáuregui Rincón J, Chávez Vela N. A. *Glosario de Biotecnología*. D. R. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 2006
32. Mahy B. *A Dictionary of Virology*. Academic Press. 3rd. edition, USA. 2001. pp293-294.