



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Detección del morbillivirus canino, mediante RT-PCR y seroneutralización,
en coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*) en Tabasco.”**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA

MVZ Rodríguez Cabo Mercado Roberto

Tutor:

M. en C. Rendón Franco Emilio

Departamento de Producción Agrícola y Animal, UAM Xochimilco

Comité tutorial:

Dr. Aguilar Sétien Álvaro

Centro Médico Siglo XXI

Dr. Verdugo Rodríguez Antonio

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. México febrero 2018



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.

Índice

Índice de figuras	3
Índice de cuadros	4
Resumen	5
1. Introducción	7
1.1 Virus del distemper canino	8
1.2. Proteínas virales	9
1.3. Replicación	10
1.4. Patogenia	12
1.5. Herramientas diagnósticas	13
2. Antecedentes del virus de distemper canino en carnívoros	14
1.6. Coatí de nariz blanca (Nasua narica)	15
1.7. Mapache (Procyon lotor)	16
3. Justificación	17
4. Hipótesis	17
5. Objetivo general	17
5.1 Objetivos específicos	17
6. Material y métodos	18
6.1. Área de estudio	18
6.2. Sujetos de estudio y muestras	18
6.4 Hematología.....	19
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	20
6.5.2 Cuantificación de ARN	21
6.5.3 Obtención de ADN complementario	21
6.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	22
6.5.5 Estandarización del gradientes de temperatura, concentración magnesio y sensibilidad de la prueba.	23
6.5.6 Ensayo con enzimas de restricción para comprobar identificar el fragmento ..	24
amplificado	24
6.6 Seroneutralización	24
6.6.1 Replicación del virus Cepa Onderspoort.....	24
6.6.2 Cultivo Celular e Infección	24
6.6.3 Titulación del virus.	25

6.6.4 Seroneutralización	26
6.7 Análisis estadístico	27
7. Resultados	28
7.1 Muestras biológicas	28
7.2 Seroneutralización	28
7.2.1 Coatíes	30
7.2.2 Mapaches	30
7.3 Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa	31
7.3.1 Coatíes	32
7.3.2 Mapaches	33
7.4 Diferencias entre especies	34
7.4.1 Seroneutralización	34
7.4.2 RT- PCR.....	35
7.5 Comparación entre edad y sexo	35
7.5.1 Serología	35
7.5.2 RT-PCR	36
7.6 Comparación de los valores de la biometría hemática entre individuos positivos contra negativos al VDC.	38
7.6.1 Serología	38
7.6.2 Biometría Hemática-PCR	40
7.7 Recapturas	42
8. Discusión	42
9.- Conclusiones	49
10. Literatura citada.....	50
11 Anexos	63
Anexo 1.....	63
Anexo 2.....	65
Extracción de RNA	65
Transcriptasa reversa	65
Reacción en cadena de la polimerasa	66
Ensayo con enzima de restricción para comprobar el fragmento amplificado	68
Ensayo de concentración mínima detectable.....	69

Índice de figuras

Figura 1. Representación del genoma del VDC.	9
Figura 2. Representación gráfica de un morbilivirus	10
Figura 3. Replicación de un morbilivirus en la célula hospedero	11
Figura 4. Diseño de la placa para la titulación del VDC por dosis infectiva en cultivo celular 50%.	25
Figura 5. Diseño de la placa para la prueba de Seroneutralización.....	26
Figura 6. Seroneutralización	28
Figura 7. Resultados de la detección del VDC en coatíes por PCR.	31
Figura 8. Resultados de la detección del VDC en coatíes por PCR.	31
Figura 9. Resultados de la detección del VDC en mapaches por PCR.	32
Figura 10. Resultados de la detección del VDC en mapaches por PCR.	32

Índice de cuadros

Cuadro 1. Reactivos para la transcripción reversa.....	21
Cuadro 2. Ciclo de la transcriptasa Reversa.....	21
Cuadro 3. Reactivos y cantidades para la PCR.....	22
Cuadro 4. Muestras biológicas.....	27
Cuadro 5. Número y prevalencia de coatíes positivos a anticuerpos neutralizantes contra el virus del distemper canino en diluciones 1:100 y 1:1000.....	29
Cuadro 6. Número y prevalencia de mapaches positivos a anticuerpos neutralizantes contra el virus del distemper canino.....	29
Cuadro 7. Frecuencia de coatíes positivos y negativos a la prueba de RT-PCR para el VDC.....	32
Cuadro 8. Frecuencia de mapaches positivos y negativos a la prueba de RT-PCR para el VDC.....	33
Cuadro 9. Comparación de frecuencias entre coatíes y mapaches positivos por serología a anticuerpos contra el VDC y por PCR al VDC.....	33
Cuadro 10. Frecuencia de coatíes positivos a anticuerpos contra el VDC estratificados por edad y sexo.....	34
Cuadro 11. Frecuencia de mapaches positivos a anticuerpos contra el VDC estratificados por edad y sexo.....	35
Cuadro 12. Frecuencia de coatíes positivos al VDC en sangre estratificados por edad y sexo.....	35
Cuadro 13. Frecuencia de coatíes positivos al VDC en sangre estratificados por edad y sexo.....	36
Cuadro 14. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre coatíes positivos y negativos a anticuerpos neutralizantes contra el VDC (n= 122).....	36
Cuadro 15. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre mapaches positivos y negativos a anticuerpos neutralizantes contra el VDC (n= 63).....	37
Cuadro 16. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre coatíes positivos y negativos al VDC en sangre.....	38
Cuadro 17. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre mapaches positivos y negativos al VDC en sangre.....	39
Cuadro 18. Recapturas para seroneutralización.....	39

Resumen

La presencia de agentes infecciosos como el Virus del distemper canino (VDC) en poblaciones simpátricas de carnívoros silvestres y domésticos representa un riesgo de transmisión inter e intraespecies. Se analizaron muestras de coatíes (*Nasua narica*) y de mapaches (*Procyon lotor*) correspondientes a periodos de invierno y verano entre los años 2012-2016, provenientes de Villahermosa, Tabasco, por medio de técnicas diagnósticas, seroneutralización (n=185) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (n=83), para determinar la presencia del VDC en ambas poblaciones y adicionalmente se realizaron biometrías hemáticas (n=268) para determinar la condición de salud. Se determinó una prevalencia de 19.6% para coatíes en cuatro periodos comprendidos entre invierno 2012 y verano 2014 de anticuerpos contra el VDC por medio de seroneutralización, mientras que para mapaches fue de 25.8%. La prevalencia del VDC por medio de PCR en muestras obtenidas de invierno 2015 y verano 2016 de coatíes fue de 13.3% y para mapaches de 17.3%. La presencia de anticuerpos contra VDC en mapaches tuvo una relación significativa (IC 95%=1.4-29.4, OR=6.4, P=0.01) con hembras, quienes tuvieron mayor presencia de anticuerpos, mientras que para coatíes no hubo diferencias significativas en cuanto a sexo o edad. Para la PCR se encontró una relación significativa en coatíes con hembras (IC 95%=3.05-10.33, OR=5.62, P=0.00) e individuos adultos (IC 95%=4.85-18.80, OR=9.55, P=0.00), para mapaches la asociación significativa solo fue en individuos jóvenes (IC 95%=1.35-6.0, OR=2.85, P=0.005). Se encontró asociaciones significativas (P=0.04) en coatíes con presencia de anticuerpos contra el VDC teniendo mayor cantidad de eritrocitos al comparar los componentes de la biometría hemática mientras que para la población de mapaches no hubo diferencia significativas. Existieron asociaciones significativas, teniendo mayor cantidad de monocitos coatíes con presencia del VDC (P=0.01), para mapaches con presencia del VDC no se encontraron diferencia significativas. Respecto a la recaptura de individuos un coatí resultó con presencia de anticuerpos contra el VDC y dos años posteriores resulto positivo a la presencia del VDC por PCR. La presencia de del VDC en las poblaciones de coatíes y mapaches representa una amenaza para ellos y otros mamíferos silvestres y domésticos. Se sugieren estudios posteriores con análisis filogenéticos para conocer las cepas y el origen de estas, así como para conocer la dinámica del virus y poder proponer medidas de conservación.

Palabras clave: Distemper Canino, *Procyon lotor*, *Nasua narica*, Parque-Museo de la Venta.

Abstract

The presence of infectious agents such as Canine Distemper Virus (VDC) in the sympatric populations of wild carnivores represents inter and intraspecies risk transmission. Samples of coatis (*Nasua narica*) and raccoons (*Procyon lotor*) were analyzed for winter and summer periods between the years 2012-2016, from Villahermosa, using diagnostic techniques, seroneutralization (n=185) and polymerase chain reaction (n=83) to determine the presence of VDC in both populations, additionally hematic biometrics (n = 268) were used to determine the condition of health. The prevalence was determined for four periods between winter 2012 and summer 2014 of antibodies against VDC by means of the seroneutralization for the coatis was an average of 19.6% while, for the raccoons was 25.8%, the prevalence of VDC by means of PCR In the winter 2015 and summer 2016 covers 13.3% and for maps of 17.3%. The presence of antibodies against VDC in raccoons had a significant relation (95% CI = 1.4-29.4, OR = 6.4, P = 0.01) with the variable sex being the females who had the highest presence of antibodies, whereas for coatis there were no differences significant in terms of sex or age. PCR, a significant relation was found in the coatis for females (CI 95% = 3.05-10.33, OR = 5.62, P = 0.00) and adult individuals (95% CI = 4.85-18.80, OR = 9.55, P = 0.00) For ICA 95% = 1.35-6.0, OR = 2.85, P = 0.005). Significant associations (P = 0.04) were found in coatis with presence of antibodies against VDC, with a higher number of erythrocytes when comparing the components of the blood biometrics, whereas for the raccoon population there were no significant differences. There were significant associations, with more coati with presence of VDC monocytes (P = 0.01), for raccoons with presence of VDC no significant differences were found. Regarding the recapture of individuals a coati was found to have antibodies against VDC and two years later it was positive to the presence of VDC by PCR. The presence of VDC in coatis and raccoons populations present a threat to them and other wild and domestic mammals. Later studies with phylogenetic analyzes are suggested to know the strains and the origin of those that circulate in the Parque-Museo de la Venta, as well as to know the dynamics of the virus and the proponent conservation measures.

Keywords: Distemper Canine virus, *Procyon lotor*, *Nasua narica*, Parque- Museo de la Venta, Tabasco.

1. Introducción

El aumento de la actividad humana favorece factores tales como: pérdida del hábitat de especies silvestres, cambios en el uso de suelo e introducción de especies exóticas (incluyendo especies domésticas), aumentando la diseminación de enfermedades infecciosas a especies silvestres autóctonas y por lo tanto causando daños irreversibles a la estabilidad de los ecosistemas. Por lo anterior el estudio de agentes patógenos y su impacto en la salud de individuos y poblaciones de especies de vida silvestre, es un tema de vital importancia, ya que son aspectos importantes a considerar en programas de conservación (Rovirosa-Hernández *et al.* 2012). Ejemplo de esto es la infección causada por el virus del distemper canino (VDC), un morbillivirus antigénica y filogenéticamente relacionado con el virus del sarampión en humanos (Ludlow *et al.* 2014). Históricamente el VDC se ha asociado con miembros de la familia Canidae, con los primeros brotes registrados a gran escala en perros domésticos en España en 1760 y luego en otros países europeos (Ludlow *et al.* 2014), fue aislado por primera vez en 1905 por Henri Carré (Céspedes *et al.* 2010) y posteriormente se realizaron infecciones experimentales en hurones y zorros que lo diferenciaron del virus del sarampión, al no ser una familia viral exclusiva de la especie humana (Ludlow *et al.* 2014). Se ha reportado transmisión intra e inter-especies por vía de aerosoles, orina, heces y en carnívoros también por ingerir presas infectadas con el VDC, incluso animales que típicamente no son infectadas con VDC como el jabalí (*Sus scrofa*) y el ciervo de Sitka (*Cervus nippon*) que llegan a presentar seroconversión (Ludlow *et al.* 2014). Esto sugiere que la diversidad de especies animales potencialmente susceptibles a la infección por VDC puede ser mucho más amplia de lo que se supone actualmente, así como la capacidad del VDC para utilizar receptores celulares de una amplia gama de especies de vida silvestre (Ludlow *et al.* 2014). El VDC es causante de una enfermedad multisistémica, contagiosa y letal de cánidos y otras familias de mamíferos silvestres en todo el mundo (Céspedes *et al.* 2010), tales como: Canidae (Warren *et al.* 2001; Li *et al.* 2014), Ailuridae (Cottrell *et al.* 2013), Mustelidae (Burts y Angelika, 2007; Keller *et al.* 2012), Viverridae (Takayama *et al.* 2009), Procyonidae (Se-Yeoun *et al.* 2012), Phocidae (James *et al.* 2004), Felidae (Roelke *et al.* 1996; Malzoni *et al.* 2013), Ursidae (Cottrell *et al.* 2013), e incluso primates de la familia Cercopithecidae (Kouji *et al.* 2008).

El VDC es un virus monotípico con el que generalmente basta con una sola exposición para conferir una inmunidad duradera (Meli *et al.* 2010). Los brotes de VDC están aumentando en todo el mundo (Simon-Martínez *et al.* 2008; Takenaka *et al.* 2014). Con frecuencia la transmisión entre especies conduce a epizootias devastadoras en

poblaciones altamente susceptibles o inmunológicamente no protegidas (Meli *et al.* 2010). Incluso en animales domésticos como los perros, existen reportes de casos del virus Distemper Canino (DC) en animales vacunados, que han demostrado ser causados por cepas del VDC recientemente prevalentes (Takenaka *et al.* 2014). Esto ha incrementado el riesgo de transmisión en regiones donde la vacunación no es ampliamente empleada, donde los perros pueden servir como reservorio para transmitirlo a la fauna silvestre (Deem *et al.* 2000).

1.1 Virus del distemper canino

El virus del distemper canino, es un Morbilivirus de la familia *Paramyxoviridae*, con un RNA monocatenario de polaridad negativa, envuelto, no segmentado y pleomórfico, con un genoma de aproximadamente 15,616 nucleótidos y con una longitud entre 150 y 300nm, (Swati *et al.* 2015). Su genoma incluye seis genes separados por regiones intergénicas de 3 nucleótidos, seguidos por una región 5' UTR (no traducida; Gassen *et al.* 2000). Estos genes codifican para seis proteínas estructurales; dos glicoproteínas (Fig. 1) que se encuentran en su envoltura lipídica, la hemaglutinina H (gen H de 1.8 kb) y la proteína de fusión F (gen F de 1.9 kb); hacia el extremo 3' se encuentra la proteína de la matriz M (gen M de 1 kb) que recubre la superficie interior de la envoltura, desempeña un papel en la formación de virus y en la regulación de la transcripción (Yanagi *et al.* 2006), y además sirve para interactuar con el complejo ribonucleoproteico (RNP) que está compuesto por el ARN viral y dos proteínas asociadas a la transcriptasa, la polimerasa larga L (gen L; de 6.5 kb) y la fosfoproteína P (gen P de 1.5 kb). El gen P además codifica entre las primeras 500 a 1000 bases de su extremo 5' para las proteínas no estructurales C y V respectivamente, cuyas funciones están relacionadas con actividades como antagonistas de interferones (IFN). Adicionalmente, la proteína V participa en la edición de ARN co-transcripcionalmente y la proteína C se ha sugerido que está involucrada en la evasión de la respuesta inmune mediada por el interferón $-\beta$ (Lamb y Parks, 2007) a través de un marco de lectura superpuesto (Yanagi *et al.* 2006). Finalmente la proteína N (gen N; de 1.5 kb) de la nucleocápside envuelve el ARN viral y este complejo es el encargado de la síntesis de las proteínas virales y de la replicación del genoma viral (Figura 2; Céspedes *et al.* 2010). Seis nucleótidos están asociados con la proteína N y permiten su unión al esqueleto del azúcar-fosfato del ARN, exponiendo las bases al exterior. Como consecuencia, el ARN puede transcribirse sin disociarse de la nucleoproteína (Gassen *et al.* 2000).

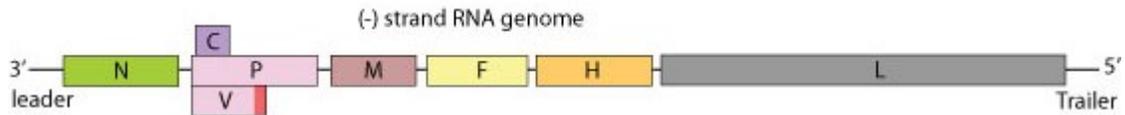


Figura 1. Representación del genoma del VDC, se muestran los seis genes llamados N,P/V/C,M,F,H y L que codifican para las seis proteínas estructurales excepto el gen P/V/C que es un gen multicistónico que codifica las proteínas P, V y C las dos últimas son proteínas no estructurales.

Imagen tomada del sitio web <http://viralzone.expasy.org/>

1.2. Proteínas virales

Las proteínas virales del VDC presentan características y funciones específicas durante la infección:

- La hemaglutinina (H) es una proteína transmembranal tipo II; presenta un dominio citoplasmático en su extremo amino-terminal, un dominio hidrofóbico transmembranal que sirve de anclaje a la membrana y un ectodominio carboxilo terminal (Vandeveldel *et al.* 2011), y forma un tetrámero que interactúa físicamente con la proteína de fusión F (Von Messling *et al.* 2004).

Esta proteína es la encargada de mediar la unión a los receptores celulares (Lamb y Kolakofsky, 2001) siendo el determinante del tropismo celular del virus (Von Messling *et al.* 2001).

- La proteína de fusión (F) es una proteína transmembranal tipo I que participa en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula hospedero (Lamb y Kolakofsky, 2001). Es sintetizada como un precursor inactivo F_0 que es escindida por una furina celular, resultando en la formación de las subunidades F1 y F2, que es su forma biológicamente activa, formando un heterodímero que interactúa con la hemaglutinina durante el proceso de fusión virus-célula (Lamb y Kolakofsky, 2001).

- Proteína de matriz (M) es una proteína que se posiciona debajo de la envoltura lipídica e interactúa con el complejo RNP, la bicapa lipídica y con las protuberancias citoplasmáticas de las glicoproteínas de membrana H y F (Lamb y Kolakofsky, 2001).

- Fosfoproteína (P) es un cofactor de la polimerasa que se activa por fosforilación y forma parte activa del complejo RNP (Lamb y Kolakofsky, 2001).

- La proteína C es traducida a partir del mismo mRNA que la fosfoproteína, solo que su codón de inicio está situado 22 nucleótidos corriente debajo del codón iniciador de la proteína P, caso similar ocurre con la proteína V, por lo que ambas proteínas presentan una misma secuencia en los primeros aminoácidos junto con la proteína P (Cattaneo *et al.* 1989). La proteína V está involucrada en la evasión del sistema inmune inhibiendo las vías de señalización de interferones y otras citocinas lo que se traduce en bajos niveles

de transcripción y expresión de proteínas antivirales, mientras que la proteína C actúa como factor en la liberación de partículas virales estables (Céspedes *et al.* 2010).

- Proteína de la nucleocápside (N) es una proteína de unión al ARN que se autoensambla sobre el genoma viral y el ARN antisentido para formar con las proteínas P y L el complejo RNP (Lamb y Kolakofsky, 2001).

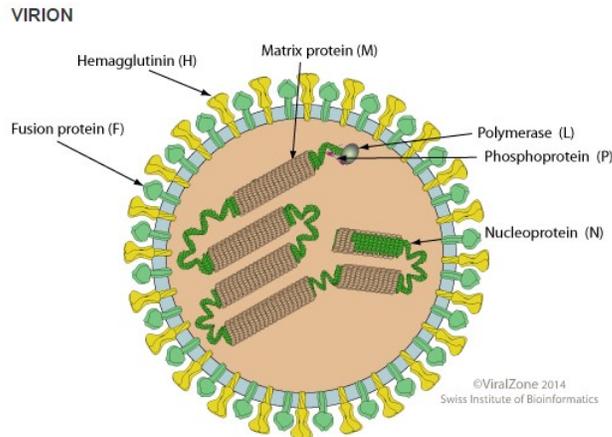


Figura 2. Representación gráfica de un morbilivirus

Tomada de la página web viralzone.expasy.org

1.3. Replicación

El sistema de entrada a la célula depende de las dos glicoproteínas de superficie H y F las cuales interactúan entre sí para fusionar la envoltura viral con la membrana celular y generar un poro de fusión (Hashiguchi *et al.* 2011). La proteína H es la encargada del reconocimiento y unión al receptor celular CD150, también conocido como molécula de señalización para la activación de linfocitos (SLAM por sus siglas en inglés Kouji *et al.* 2008). Este receptor está presente en los linfocitos B y T maduros, timocitos inmaduros, macrófagos y células dendríticas (Yanagi *et al.* 2006; Sintés y Engel, 2010), y es el principal receptor usado por los morbilivirus para introducirse y propagarse en las células blanco (Kouji *et al.* 2008). Otro receptor celular reportado para el VDC es la nectina 4 que se expresa en diversos epitelios carentes de la expresión de SLAM (Noyce *et al.* 2013). Una vez unida la hemaglutinina, provoca un re-arreglo conformacional en la proteína F para la fusión de envoltura y membrana celular (Lamb y Kolakofsky, 2001), permitiendo el ingreso del complejo RNP al citoplasma donde se lleva a cabo la replicación del genoma viral. La síntesis de las proteínas virales comienza en el extremo 3' del genoma, que sirve

1.4. Patogenia

La infección en animales domésticos ha sido bien descrita y podría ser muy similar en especies silvestres (Sharon *et al.* 2000). El VDC se transmite de forma directa principalmente por aerosoles de secreciones respiratorias y oculares, orina y heces (Simón-Martínez *et al.* 2008), y de forma indirecta por medio de fómites. Así mismo, es un virus que puede sobrevivir en el ambiente por periodos cortos, sin embargo, a temperaturas por debajo de 5°C puede ser viable hasta por 14 días (Sharon *et al.* 2000). La infección comienza con la replicación del virus en macrófagos presentes en el tracto respiratorio, diseminándose hacia los nódulos linfáticos locales, donde ocurre la replicación viral en los días 2 a 4 post-infección (PI). Posteriormente el virus se disemina vía sanguínea a tejidos epiteliales como la lámina propia del aparato digestivo, así como al bazo y las células de Kupffer del hígado entre los días 4-9 PI, de donde también puede llegar al sistema nervioso central (SNC). Antígenos virales se han localizado en áreas dependientes de células T y en las regiones Thy-1 o CD4-positivas, también en CD8, CD21 o células IgM positivas. Por lo cual, se ha reportado que células T Thy-1 y CD4-positivas sirven como principales células diana para el VDC durante la fase aguda de la infección (Pan *et al.* 2013). Durante este periodo se desarrolla una leucopenia por depleción de linfocitos T CD4+ CD8+ y B CD21+ (Sharon *et al.* 2000), y por lo tanto, una menor proporción de linfocitos T CD4 + y CD8 + resulta en una disminución de linfocitos B IgG+ y casi pérdida de linfocitos B IgM+ en tejidos linfoides, dando origen a una baja concentración de anticuerpos contra VDC (Pan *et al.* 2013). Esto se acompaña también de una primera etapa febril (Sharon *et al.* 2000). El VDC produce lesiones en tejidos linfoides que incluyen principalmente atrofia tímica, depleción de linfocitos en áreas linfoides con pérdida tejido en nódulos linfáticos, hiperplasia de células reticulares, necrosis folicular focal y puede ocasionar la formación de cuerpos de inclusión eosinofílica intracitoplasmáticas en células de tejido linfoide (Pan *et al.* 2013).

Posteriormente en los días 9-14 PI el curso de la patogénesis depende de la respuesta del hospedero, animales con títulos protectores de anticuerpos y también con una capacidad citotóxica protectora, pueden eliminar al virus de la mayoría de los tejidos sin que se presenten signos de la enfermedad. Mientras que hospederos con una respuesta humoral y celular ineficaz, sufren de una diseminación vía hematológica, acompañada de una segunda etapa febril, a los diversos tejidos con su respectiva semiología como conjuntivitis serosa, disnea, depresión, anorexia, vómito, diarrea, entre otros. La complicación más seria es la infección en el sistema nervioso central (SNC), que conduce

a una serie de trastornos neurológicos, frecuentemente con un mal pronóstico (Simon-Martínez *et al.* 2008). Si durante esta etapa mejora la respuesta inmune del animal, el virus es eliminado de la mayoría de los órganos, con excepción de los pulmones, piel, ojo y SNC. La recuperación de la enfermedad se asocia con una adquisición de inmunidad a largo plazo, aunque en algunos casos se puede liberar al virus hasta por 90 días (Sharon *et al.* 2000).

El VDC entra en el SNC a través del fluido cerebroespinal o cruzando la barrera hematoencefálica a través de células linfoides infectadas. En el SNC, la replicación de VDC en neuronas y células gliales se asocia con lesiones en la sustancia gris y blanca incluyendo la desmielinización no inflamatoria a pesar de la infección restrictiva de oligodendrocitos (menor al 10% Pan *et al.* 2013; Céspedes *et al.* 2010).

La diseminación del virus en el SNC también dependerá de la respuesta inmune del hospedero. Si la respuesta citotóxica es ineficiente se establece una infección persistente no citolítica, que favorece la evasión de la respuesta inmune por el VDC y su diseminación, caracterizada por la restricción de la expresión de proteínas de superficie neuronal y una infección masiva de células nerviosas que promueve lesiones crónicas inmunomediadas, progresivas y reincidentes (Vandeveldt *et al.* 2010). Cuando el virus infecta células endoteliales de las meninges, el epitelio del plexo coroideo puede actuar como un reservorio del virus y a partir de ese lugar continuar la dispersión ya sea de forma libre o asociado a linfocitos, produciendo lesiones en corteza cerebral, nervio óptico y medula espinal, causando encefalopatía aguda y leuco-, polio- o panencefalitis o encefalomielitis con desmielinización multifocal (Céspedes *et al.* 2010). Se ha descrito que los astrocitos son importantes células diana para VDC ya que se encontraron antígenos virales en 30-65% de estas células en la encefalitis desmielinizante inducida por VDC (Pan *et al.* 2013).

1.5. Herramientas diagnósticas

Un método para determinar el estado de salud en los individuos y poblaciones silvestres son los valores hemáticos. Además, debido al comportamiento del VDC en las células leucocitarias, un hallazgo común en el hemograma es la leucopenia, debida al tropismo del virus por los tejidos linfáticos. Estos análisis complementan las evaluaciones clínicas en animales silvestres pero pueden ser limitadas, debido al insuficiente conocimiento de la biología de estas especies y la capacidad de los animales para enmascarar signos clínicos y estrés (Flaiban *et al.* 2008).

De igual manera se han utilizado técnicas serológicas para apoyar el diagnóstico del VDC en animales silvestres como la técnica de anticuerpos fluorescentes y la seroneutralización que utilizó Se-Yeoun *et al.* en el 2012.

Adicionalmente, algunos constituyentes de la sangre proporcionan información fundamental para el diagnóstico de la enfermedad (Wirz *et al.* 2008), lo cual puede lograrse a través de técnicas moleculares, como por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR) como lo mostró Rentería-Zolís *et al.* en el 2014, diagnosticando la presencia del VDC en mapaches silvestres.

En conjunto, la hematología, la serología y la biología molecular ayudan no solo al diagnóstico de patógenos específicos como lo es el VDC, si no también a determinar el efecto sistémico sobre el hospedero, así como la capacidad de éste para generar una respuesta inmune. Esto último resulta fundamental, ya que el VDC afecta tanto a carnívoros silvestres como domésticos, tiene una alta prevalencia en la población canina del mundo y representa una importante amenaza para la conservación de especies afectadas por este virus, especialmente aquellas en contacto con animales domésticos y con hábitos sociales. Ejemplos de lo anterior son el coatí de nariz blanca (*Nasua narica*) y el mapache (*Procyon lotor*), especies gremiales y simpátricas en diferentes sitios geográficos, como es el caso del Parque-Museo de la Venta en Villahermosa, Tabasco.

2. Antecedentes del virus de distemper canino en carnívoros

El virus de distemper canino tiene una gran variabilidad respecto a la mortalidad, morbilidad y letalidad en los diferentes carnívoros. La tasa de letalidad en los hurones domésticos (*Mustela putorius furo*) se acerca al 100%, mientras que los perros domésticos varía de un 50-70 % en los que puede permanecer de manera asintomática. Por otra parte en grandes felinos como: león africano (*Panthera leo*), el tigre (*Panthera tigris*), leopardo (*Panthera pardus*), y el jaguar (*Panthera onca*) se ha reportado un promedio de 23 % de mortalidad confirmado por histopatología y un 60% de los sobrevivientes presenta semiología nerviosa que culmina con una muerte aguda (Sharon *et al.* 2000).

Se ha reportado que los ailúridos y úrsidos también son susceptibles a la infección del VDC, siendo el más documentado, el panda rojo (*Ailurus fulgens*) y el panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*; Sharon *et al.* 2000; Bronson *et al.* 2007). Existen reportes de estudios serológicos de osos polares (*Ursus maritimus*) en Canadá, con sueros positivos

a anticuerpos contra morbilivirus similares al VDC y al virus del distemper de fócidos (Cattet *et al.* 2004). Experimentalmente se ha inducido infecciones con resultados fatales en suidos y primates. Se han documentado casos naturales de encefalitis mortal en macacos japoneses (*Macaca fuscata*; Kouji *et al.* 2008) y pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*; Noon *et al.* 2003).

Para el caso de mapaches silvestres dentro de los Estados Unidos, ocurren epidemias periódicas por lo que esta especie puede desempeñar un papel importante en la dinámica del VDC. Sin embargo, en áreas donde la vacunación contra el VDC no es ampliamente empleada (por ejemplo, partes de África), los perros pueden servir como un reservorio para la fauna silvestre (Sharon *et al.* 2000). En el caso de coaties, existe un reporte del VDC canino en un individuo en Arizona, Estados Unidos el cual solo fue diagnosticado por la signología clínica (Kaufmann *et al.* 1976).

1.6. Coatí de nariz blanca (*Nasua narica*)

El coatí de nariz blanca (*Nasua narica*) es un mamífero perteneciente al orden de los carnívoros. Es de talla mediana y hábitos gregarios, con manadas compuestas por hembras adultas y sus crías, mientras los machos adultos son solitarios (Espinoza-García *et al.* 2014). Se adapta bien a diferentes ambientes (Rovirosa *et al.* 2012), incluso con tendencias peridomésticas lo cual es resultado del contacto con animales domésticos (Mehrkens *et al.* 2013) y repercute en una amplia distribución geográfica que se extiende desde el noroeste de Colombia hasta el noreste de Arizona y Nuevo México. Es una de las siete especies de prociónidos presentes en México (Espinoza-García *et al.* 2014), distribuyéndose en los bosques tropicales y en ambos litorales (Rovirosa *et al.* 2012).

Su dieta consiste principalmente en frutos e invertebrados terrestres. En temporada donde hay escasez de frutos, se ha reportado que grupos de coatíes se enfocan en hojas y presas un poco más grandes, entre las que se encuentran pequeños vertebrados. Por otro lado los coatíes son depredados por grandes felinos como el jaguar (*Panthera onca*) y el puma (*Puma concolor*) en ambientes tropicales (Aranda y Sánchez-Cordero 1996).

Actualmente, el coatí de nariz blanca está catalogado en una posición de preocupación menor (LC) por sus siglas en inglés, según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), sin embargo, tiene una tendencia poblacional a la baja. En México no esta considerada bajo ninguna categoría de protección debido a su amplia distribución

(Espinoza-García *et al.* 2014). La población de coaties esta reportada de al rededor de 108 individuos dentro del sitio de muestreo (Martínez-Hernández *et al.* 2014).

1.7. Mapache (*Procyon lotor*)

El mapache (*Procyon lotor*) es un carnívoro de tamaño mediano cuya distribución natural se extiende desde el sur de Canadá a Centroamérica. Se puede encontrar en una amplia gama de hábitats, incluyendo áreas abiertas, pantanosas, ríos y zonas urbanas en contacto con animales domésticos. Existen poblaciones no nativas establecidas en todo el mundo, incluyendo Alaska, las Antillas, Japón y Europa (García *et al.* 2011).

Tiene actividad nocturna con una dieta omnívora variada. Pasan los días en árboles o bajo tierra en cuevas, emergen al atardecer para alimentarse durante la noche. Se clasificaron originalmente como carnívoros solitarios, aunque evidencia reciente muestra que algunos mapaches tienen jerarquías, viven en grupos, viajan juntos y comparten guaridas. Las hembras y machos rara vez se encuentran juntos fuera de la temporada de apareamiento. Por otra parte, los machos forman grupos para defender su territorio comunalmente, compartiendo recursos y probablemente el acceso a las hembras (Kent y Tang-Martínez 2014). Actualmente, el mapache (*Procyon lotor*) está catalogado en una posición de LC según la UICN, en México no se considera bajo ninguna categoría de protección. La población de coaties esta reportada de al rededor de 98 individuos dentro del sitio de muestreo (Martínez-Hernández *et al.* 2014).

La situación del VDC en prociénidos en México es poco conocida, en el estado de Quintana Roo se reportaron tres mapaches enanos (*Procyon pigmaeus*) positivos al VDC, uno de ellos determinado por inmunofluorescencia de improntas oculares y los tres positivos por la prueba RT-PCR a partir de glóbulos blancos, en el mismo estudio se realizaron ambas pruebas para 3 coatíes dos individuos *N. narica* y un *N. n. nelsoni* los cuales resultaron negativos en las 2 pruebas (Mena *et al.* 2007). No existen otros estudios en prociénidos en el país, sin embargo, durante el verano de 2013 en un proyecto de monitoreo de enfermedades en prociénidos en Villahermosa, Tabasco, un mapache presentó sinología de distemper canino, mismo que fue confirmado por RT-PCR y serología y a partir del cual se realizó su aislamiento del virus en cerebro y vejiga urinaria. Pese a este hallazgo, el impacto a nivel poblacional tanto en coatíes como en mapaches se desconoce.

3. Justificación

Debido a la importancia de la conservación de especies silvestres, por los servicios ecosistémicos que prestan, la amplia distribución de mapache (*Procyon lotor*) y coatí (*Nasua narica*) y los pocos estudios realizados con esta última especie, relacionados con el VDC, es importante determinar la presencia y prevalencia de este virus en poblaciones silvestres. Esto permitirá entender la dinámica de la distribución del virus y generar propuestas de conservación, ayudando a que especies de carnívoros conserven su papel en el ecosistema.

4. Hipótesis

El Virus del distemper canino circula de manera endémica en el Parque-Museo de la Venta en Villahermosa Tabasco, por lo que hacer la detección directa (RT-PCR) o indirecta (seroneutralización) del VDC, permitirá establecer su prevalencia y los niveles de inmunidad en las poblaciones de coatíes y mapaches.

5. Objetivo general

Detectar la presencia o exposición al VDC mediante RT-PCR y seroneutralización para determinar su prevalencia general y estratificada, así como el estado de inmunidad en coatíes y mapaches en Tabasco.

5.1 Objetivos específicos

- Realizar RT-PCR, seroneutralización y hemogramas de muestras de las poblaciones de coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*) del Parque-Museo de la Venta.
- Determinar asociaciones estadísticas entre la presencia o exposición al VDC y variables en poblaciones de coatíes y mapaches como sexo y edad.
- Determinar asociaciones entre el VDC y los valores hemáticos de ambas especies de prociónidos.

6. Material y métodos

6.1. Área de estudio

El área de estudio es el Parque Museo la Venta que está ubicado en el centro de la ciudad de Villahermosa (18°20'N, 93°18'O) a una altura de 10 m sobre el nivel del mar. El 95.5% de la superficie del estado presenta clima cálido húmedo, el restante 4.5% es clima cálido subhúmedo hacia la parte este del estado. La temperatura media anual en la entidad es de 27°C, la temperatura máxima promedio es de 36°C y se presenta en el mes de mayo, la temperatura mínima promedio es de 18.5°C durante el mes de enero. La precipitación media estatal es de 2 550 mm anuales, las lluvias se presentan todo el año, siendo más abundantes en los meses de junio a octubre. En cuanto a la flora predomina la vegetación acuática, le siguen en importancia las selvas húmedas. Hacia el este y oeste se localiza la sabana y bordeando las lagunas se distribuye el manglar. Las selvas se ubican al sur de la superficie estatal, más de 64% de la superficie es de uso agrícola (INEGI, 2015).

6.2. Sujetos de estudio y muestras

Las muestras fueron obtenidas de poblaciones semi-libres de coatíes de nariz blanca (*Nasua narica*) y de mapaches (*Procyon lotor*) que viven dentro del Parque-Museo de la Venta cuyas poblaciones se han calculado en un promedio de 98 mapaches y 108 coatíes utilizando la metodología de captura-recaptura (Martínez-Hernández *et al.* 2014).

La captura animal se realizó mediante el protocolo descrito por Martínez-Hernández *et al.* en el 2014, teniendo un porcentaje aproximado de recaptura del 30% en la población de coatíes y 10% en mapaches. Las capturas se realizaron de manera regular dos veces por año, durante verano e invierno.

Debido a que se contaba con el antecedente de un caso confirmado de distemper canino, las muestras de suero utilizadas pertenecen al banco de sueros del proyecto e incluye las capturas anteriores y posteriores al diagnóstico del individuo enfermo perteneciente al periodo de verano 2013.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de coatíes y mapaches en los periodos de invierno y verano de los años 2012 al 2016, como parte de un proyecto de monitoreo de enfermedades en Villahermosa, Tabasco. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4°C para su traslado a la Ciudad de México. Las muestras se dividieron para tres diferentes pruebas a partir de tubos con ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y tubos sin anticoagulante. Los hemogramas se realizaron en cuanto las muestras arribaron a la

Ciudad de México y se realizaron en el laboratorio de Histopatología UAM Xochimilco. Por otra parte, para la realización de pruebas de seroneutralización, las muestras de sangre sin anticoagulante se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos para obtener el suero, mismos que se mantuvieron a -20°C en el Laboratorio de Inmunovirología de Centro Médico siglo XXI para su posterior análisis. Para este trabajo se utilizaron las muestras que corresponden a: invierno 2012, verano 2013, invierno 2013, verano 2014. Para la prueba de RT-PCR se guardaron 0.5 ml de sangre en EDTA de cada individuo, a las que se les eliminaron los glóbulos rojos y posteriormente se les agregó Trizol Reagent® y se mantuvieron en congelación a -80°C hasta su procesamiento, para esta prueba los periodos analizados fueron verano 2015 e invierno 2016.

6.4 Hematología

Las muestras de sangre fueron procesadas en el laboratorio de histopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM X) en la Ciudad de México, donde se realizaron las biometrías hemáticas dentro de las 48 horas posteriores al muestreo. Para esto, se recibieron de 2-4 ml de la muestra en tubos (BD Vacutainer®) los cuales contenían (EDTA) como anticoagulante y eran mantenidos en refrigeración a 4°C. Se determinó la concentración de los siguientes constituyentes:

1. Conteo total de glóbulos rojos y glóbulos blancos los cuales fueron determinados manualmente con un hemocitometro diluyendo previamente la sangre 1:20 con solución de Turk (Ácido acético 2%, agua destilada y azul de metileno) con el que se hemolizan los eritrocitos, y para el conteo de glóbulos rojos se realiza una dilución 1/200 con la solución de Hayem (sulfato sódico, cloruro sódico, cloruro mercuríco y agua destilada).
2. El hematocrito se obtuvo por medio de la técnica de microhematocrito por centrifugación.
3. Hemoglobina se midió por medio de fotometría con un hemoglobinometro Hemocroma plus® Boditech inc.
4. Volumen corpuscular medio (VGM), hemoglobina corpuscular media (HGM), velocidad de sedimentación globular (VSG) fueron calculados a partir del conteo total de eritocitos y del valor de la hemoglobina, para el
5. Conteo diferencial de leucocitos: para la determinación de neutrófilos (en banda y segmentados), linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos se realizó un frotis de sangre de cada muestra

Por último se midieron las proteínas plasmáticas por medio de un refractómetro RHC200 (Latimer *et al.* 2005).

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

1. Extracción de RNA

Las muestras de sangre completa se procesaron para la RT-PCR en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) en la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La extracción de ARN se realizó a partir de tres tipos de muestra, dos controles positivos: a) cultivo celular de células Vero infectadas con el VDC cepa Onderstepoort, la cual fue amablemente donada por el Dr. Francisco Javier Basurto Alcántara del Área de especialización e investigación de Vacunología y Biología Molecular, y b) muestra de encéfalo de perro diagnosticado con VDC por inmunofluorescencia, amablemente donado por el Dr. Raymundo Iturbe Ramírez responsable del diagnóstico virológico y constatación de productos biológicos virales en la FMVZ UNAM, así como las muestras problema (0.5 ml de sangre periférica). La extracción se realizó de acuerdo a la técnica tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo descrita por Chomczynski y Sacchi, en 1987, la cual consiste en homogenizar los diferentes tipos de muestras (leucocitos, células vero y encéfalo de perro) en una solución de fenol hidroxiquinoleína, tiocianato de guanidina, tiocianato de aminio y glicerol (TRIzol™ Reagent). El proceso continúa con la eliminación progresiva de proteínas y otros contaminantes celulares y la obtención de un material genético cada vez más limpio a través de una mezcla con cloroformo para separar el ARN, el cual terminara siendo precipitado, lavado y finalmente diluido en agua libre de RNasas, agua DEPC (Dietilpirocarbonato) para su uso en la RT-PCR.

Para el caso de cultivo celular se decantó el Minimum Eagle Medium (MEM) con el que se desarrolló en cultivo de células vero infectado con VDC y se le agregaron 2 ml de trizol por cada 25 cm², para la muestra de encéfalo, se colocaron 100 mg de tejido en un mortero estéril y se le agregó 1ml de trizol, se trituró por 1 minuto y se recuperó en un tubo de 1.5 ml. Las muestras sanguíneas se colocaron en tubos estériles con 0.5 ml de agua destilada estéril fría, se agitaron en el homogeneizador por 1 minuto y posteriormente se centrifugaron a 2000 rpm por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se repitió este paso 2 veces para eliminar los eritrocitos de la muestra, al final se agregaron 0.25 ml de trizol. Posteriormente se agregaron 200 µl de cloroformo a cada

muestra, mezclándolo 15 segundos en vórtex y dejándolos 3 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarlos a 12000 rpm, 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron en un tubo nuevo estéril de 1.5 ml y se agregaron 500 µl de isopropanol mezclándolos por inversión gentilmente 15 segundos, se dejaron las muestras toda la noche a -20°C para la precipitación del ARN. Finalmente, se centrifugaron a 12000 rpm 10 minutos a 4°C, se descartaron los sobrenadantes y se agregó 1ml de etanol al 75% con agua DEPC a cada muestra. Se centrifugaron a 7500 rpm por 10 minutos a 4°C, y por último se decantaron los sobrenadantes y se pusieron a secar las pastillas 20 minutos, para finalmente resuspender el ARN en 20 µl de agua DEPC, se homogeneizaron y se colocaron a -70°C hasta su procesamiento para la reacción RT-PCR

6.5.2 Cuantificación de ARN

La cuantificación se realizó por espectrofotometría con el equipo Nano drop (Thermo Scientific®), con una longitud de onda de $A_{260/280nm}$.

6.5.3 Obtención de ADN complementario

Para obtener ADN complementario (ADNc) se realizó una reacción de la Transcriptasa Reversa como a continuación se describe. Los ensayos se realizaron con ARN de cada muestra. El ADNc se obtuvo a partir del ARN de encéfalo de perro que fue positivo a VDC por inmunofluorescencia, también de células Vero infectadas con el VDC, (controles positivos), células sin infectar (control negativo) y de leucocitos de cada uno de los individuos muestreados. La mezcla de los reactivos fue preparada en la campana de flujo laminar como se ilustra en el Cuadro 1.

Reactivo	µL
Bufer 5x	2
dNTP's	2
Primer H13	2
Transcriptasa reversa	1
ARN 1 µg	1-10
Agua estéril	Cbp 20

Cuadro 1. Reactivos para la transcripción reversa.
Se muestran reactivos y cantidades utilizadas.

Las condiciones y ciclos del termociclador para la transcripción de la hebra molde se muestran en el cuadro 2. Se muestra el nombre y número del ciclos, la temperatura y el tiempo.

Ciclo	Temperatura	Tiempo (min)	Número de ciclos
Transcripción Reversa	37°C	60	1
Extensión final	65°C	10	1

Cuadro 2. Ciclo de la transcriptasa Reversa.

6.5.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Se realizó la amplificación de producto correspondiente a un fragmento de aproximadamente 175 pares de bases (pb) del gen H, para lo cual se emplearon los iniciadores específicos reportados Iwatsuki *et al.* 1997 [VDC H13 (5'-CAAGACAAGGTGGGTGCCTT-3') y VDC H18 (5'-CTTGGTGAAATCGAACTCCA-3'). Los cuales fueron diseñados para amplificar dicho segmento específico del-VDC. Estos fueron previamente alineados con el programa BLAST-Primer del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con secuencias reportadas en otros organismos para verificar su especificidad.

La amplificación se llevó a cabo en 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C de 30 segundos por tres minutos, la alineación a 57°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Para la reacción se utilizaron las cantidades y diluciones mostradas en el cuadro 3.

Los productos de la PCR se separaron en un gel de agarosa al 1.5% mediante electroforesis con solución Buffer Tris, Ácido acético, EDTA (TAE), teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un foto-documentador (MiniLumi, BioImaging Sistem®). Posteriormente, se modificaron las constantes de la reacción con la finalidad de obtener una mejor calidad de la prueba y eliminar la detección de bandas inespecíficas en el gel de agarosa.

Las condiciones que se utilizaron fueron:

35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C de 30 segundos por tres minutos, la alineación a 56°C por 30 segundos y la extensión a 72°C por 45 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

H ₂ O c.b.p. 25µl	7.75 µl
Buffer 10X	4 µl
MgCl ₂	3 µl
DNTP's	1 µl
Iniciador en sentido	2.5µl
Iniciador antisentido	2.5µl
ADN (350 ng)	3.5µl
Polimerasa (Taq)	0.75µl
Volumen total	25µl

Cuadro 3. Reactivos y cantidades para la PCR.

6.5.5 Estandarización del gradientes de temperatura, concentración magnesio y sensibilidad de la prueba.

Se realizaron gradientes de temperatura y de concentraciones de magnesio de las reacciones, con el objetivo de determinar la temperatura y concentración de magnesio con las cuales la prueba funcionara eficientemente y se eliminaran las reacciones inespecíficas. Para ello se programó el termociclador (SelectCycler Techne®) con temperaturas de 54.3 °C, 54.9 °C, 55.5 °C, 56.1 °C, 56.9 °C, 57.7 °C, 54.6 °C, 57.3 °C y 57.7°C y para los gradientes de magnesio se aumentaron las concentraciones, a partir de la reportada que era de 50mM (2 µl) a 62.5mM (2.5 µl), 75 mM (3 µl), 87.5 (3.5 µl) y 100 mM (4 µl). Se realizaron diluciones del cDNA comenzando con 300ng/µl seguido de 30ng, 3ng, 300pg, 30pg, 3pg, 300fg, 30fg y 5fg/ µl (Ver anexo 2, ensayo de concentración mínima detectable).

6.5.6 Ensayo con enzimas de restricción para identificar el fragmento amplificado

Se realizó un ensayo *in silico* en el programa SerialCloner® V2.6.1. para llevar a cabo una simulación que permitiera conocer el perfil de digestión de los fragmentos obtenidos. Se llevó a cabo la digestión con la enzima *AluI* (GIBCO®). Se colocó en un tubo de 0.6 ml, 0.6 µl de la enzima (1 U), el ADN (1 µg) y el buffer (4 µl). La reacción se incubó por una hora a 37°C en baño María. Después se inactivó la enzima a -20° C, para posteriormente realizar la electroforesis de los fragmentos obtenidos en un gel de agarosa al 1.5% en TAE 1X, aplicando 60 volts durante 1 hora para finalmente ser teñidos con bromuro de etidio y observarlos en un fotodocumentador (MiniLumi, Bioluminescence System®). El tamaño de los fragmentos fue de 122pb y 54pb lo cual concordó con el análisis *in silico*.

6.6 Seroneutralización

Esta prueba se lleva a cabo en el laboratorio de Inmunovirología, Hospital de Pediatría en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI.

6.6.1 Replicación del virus Cepa Onderspoort

Para la propagación y la obtención de una cantidad adecuada de virus para estandarizar y realizar las seroneutralizaciones necesarias, se llevó a cabo la infección de cultivos celulares, como se describe brevemente a continuación.

6.6.2 Cultivo Celular e Infección

Se propagaron cultivos celulares de las líneas celulares Vero y MDCK para replicar el virus del distemper canino, cepa Onderspoort, lo que fue corroborado por medio del efecto citopático que el virus produce en las células infectadas. Ambas líneas celulares presentaron cambios en la morfología celular así como la formación de sincitios, sin embargo se decidió utilizar células Vero ya que la mayoría de estudios reportados con el VDC y seroneutralización trabajaron con dichas células (Rentería-Solís *et al.* 2014; Takenaka *et al.* 2014; Sakai *et al.* 2013; Marcacci *et al.* 2014). Células Vero fueron cultivadas en botellas de poliestireno con área de cultivo de 25cm² y 75cm². Todo el manejo se realizó en campana de flujo laminar. Se utilizó MEM; Thermo scientific® suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% a 37°C en una atmósfera de 5% de

CO₂. Las células estaban previamente mantenidas en congelación a -70°C. Al descongelar las células se calentaron en baño maría a 37°C lo más rápido posible, se centrifugaron a 1000 RPM por 5 minutos a 4°C para retirar el MEM con Dimetilsulfoxido (DMSO) empleado como crioprotector, se decantó y reconstituyó la pastilla con 5 ml de MEM al 8% de SFB para transferirlo a una botella de 25 cm³, dejándolo en la incubadora a 37°C alrededor de 4 días hasta alcanzar el 80% de confluencia.

Para obtener la células, ya sea para realizar la prueba de seroneutralización, para mantener la línea o propagar el virus, se decantó el MEM y se hizo un lavado con 1 ml de solución isotónica estéril tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés), se decantó y se agregó 1ml de tripsina al 0.05% con EDTA. Se colocó en la incubadora por un periodo de 3-5 minutos, para desprender las células. Para detener el efecto de la tripsina se colocó MEM suplementado con SFB al 10%. Las células en suspensión fueron transferidas a frascos nuevos y se colocaron en la incubadora a 37°C por 3 días para tener 80 % de confluencia.

Una vez con la confluencia adecuada se mantuvo sin infectar un frasco y en otro se realizó una infección, de la siguiente manera:

Se decantó el MEM de la botella para realizar un lavado con 1ml de PBS, mismo que se retiró y se colocó 1ml del VDC de la cepa de referencia Onderspoort (10⁶ partículas virales), se incubó a 37°C por 1 hora, homogenizándolo cada 10 minutos, se decantó y se colocó 6 ml de MEM con 2% de SFB, incubándolo por 7 días, revisándolo diariamente al microscopio para observar el efecto citopático.

6.6.3 Titulación del virus.

Una vez propagada la línea celular y el virus, se realizó la titulación del virus por dosis infectiva en cultivo celular 50% (DICC50%) mediante la técnica de Reed and Muench, utilizando un esquema de infección como se describe en la figura 1. La placa se incubó a 37°C durante 72 horas para observar el efecto citopático como se aprecia en la Figura 6. Debido a las propiedades citotóxicas de los sueros, estos fueron inactivados con calor 30 minutos a 56°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁶	1:5 ⁷
B	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁵	1:5 ⁷
C	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁶	1:5 ⁷
D	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁵	1:5 ⁷
E	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁶	1:5 ⁷
F	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁵	1:5 ⁷
G	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁶	1:5 ⁷
H	CN	CN	CV	CV	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:5 ⁵	1:5 ⁵	1:5 ⁷

Figura 4.

Diseño de la placa para la titulación del VDC por dosis infectiva en cultivo celular 50%. Las columnas 1 y 2 se usaron como controles negativos (CN) colocando células con MEM 2% SFB, las columnas 3 y 4 se usaron como control positivo de VDC (CV) colocando sobrenadante de VDC y MEM 2% SFB, para las columnas 5-12 se usaron diluciones quintuples del VDC Y MEM 2% SFB.

6.6.4 Seroneutralización.

Se utilizó la técnica descrita por Smith *et al.* 1996. En una placa de cultivo celular de 96 pozos se sembraron por pozo 40,000 células Vero en MEM 8% SFB, y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Terminado el lapso de tiempo en otra placa de cultivo celular de 96 pozos se colocó en cada pozo 100 µl de medio MEM 2% SFB. Se designaron 4 pozos como controles negativos (células con MEM 2% SFB sin inóculo de virus ni suero problema) y 4 pozos más como controles positivos (células con MEM 2% SFB con inóculo de virus sin suero problema). Posteriormente se designó una columna para suero de perro previamente hiperinmunizado con diluciones triples a partir de 1:27, encontrando protección contra VDC hasta 1:243, para el caso de los sueros problema se realizaron diluciones decuples seriadas a partir de 1:10 en 4 pozos cada uno. Realizadas las diluciones de los sueros, se agregó 50 µl de una suspensión del VDC previamente titulada (1:125). Esta placa se incubó por 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se realizó el cambio de estas diluciones hacia la placa con las células previamente sembradas y se incubó 72 horas. La placa se observó diariamente al microscopio para corroborar el efecto citopático, una vez

transcurrido el tiempo se fijó la placa con formol 10% durante 60 minutos, se tiñó con Cristal-violeta 30 minutos y se dejó secar al aire 12 horas.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CC	SP 3 ¹⁰	M1 10 ⁵	M2 10 ⁵	M3 10 ⁵	M4 10 ⁵	M5 10 ⁵	M6 10 ⁵	M7 10 ⁵	M8 10 ⁵	M9 10 ⁵	M10 10 ⁵
B	CC	SP 3 ⁹	M1 10 ⁴	M2 10 ⁴	M3 10 ⁴	M4 10 ⁴	M5 10 ⁴	M6 10 ⁴	M7 10 ⁴	M8 10 ⁴	M9 10 ⁴	M10 10 ⁴
C	CC	SP 3 ⁸	M1 10 ³	M2 10 ³	M3 10 ³	M4 10 ³	M5 10 ³	M6 10 ³	M7 10 ³	M8 10 ³	M9 10 ³	M10 10 ³
D	CC	SP 3 ⁷	M1 10 ²	M2 10 ²	M3 10 ²	M4 10 ²	M5 10 ²	M6 10 ²	M7 10 ²	M8 10 ²	M9 10 ²	M10 10 ²
E	CV	SP 3 ⁶	M11 10 ⁵	M12 10 ⁵	M13 10 ⁵	M14 10 ⁵	M15 10 ⁵	M16 10 ⁵	M17 10 ⁵	M18 10 ⁵	M19 10 ⁵	M20 10 ⁵
F	CV	SP 3 ⁵	M11 10 ⁴	M12 10 ⁴	M13 10 ⁴	M14 10 ⁴	M15 10 ⁴	M16 10 ⁴	M17 10 ⁴	M18 10 ⁴	M19 10 ⁴	M20 10 ⁴
G	CV	SP 3 ⁴	M11 10 ³	M12 10 ³	M13 10 ³	M14 10 ³	M15 10 ³	M16 10 ³	M17 10 ³	M18 10 ³	M19 10 ³	M20 10 ³
H	CV	SP 3 ³	M11 10 ²	M12 10 ²	M13 10 ²	M14 10 ²	M15 10 ²	M16 10 ²	M17 10 ²	M18 10 ²	M19 10 ²	M20 10 ²

Figura 5.

Diseño de la placa para la prueba de Seroneutralización.

Columna 1 corresponde a controles positivos al VDC (CV) y negativos solo con cultivo celular (CC) colocando células con MEM 2% SFB, la columna 2 se usó con el control de suero de perro híperinmunizado (SP) con diluciones triples a partir 3³ hasta 3¹⁰, VDC 1:125 DICC₅₀ y MEM 2% SFB, para las columnas 3-12 se usaron para muestras problema M1-M20 con diluciones decuples que van de 10²-10⁵ del suero problema, VDC 1:125 DICC₅₀: y MEM 2% SFB.

6.7 Análisis estadístico

Se obtuvieron las frecuencias de animales serológicamente positivos para ambas poblaciones mediante la fórmula:

$$P = \frac{\text{número Positivos}}{\text{número Total}} \times 100$$

Donde P es la frecuencia, numero positivos son los animales serológicamente positivos por especie y el número total de animales muestreados de cada especie.

Se utilizó el programa Epidat 3.1® para realizar la prueba de Chi cuadrada (x²) para comparar las frecuencias entre especies de animales positivos para serología y RT-PCR y determinar la existencia de diferencias significativas.

También se realizó la medición del odds ratio para determinar si existían diferencias entre sexo y edad en cada especie.

7. Resultados

7.1 Muestras biológicas

Para este estudio se utilizaron 367 muestras de las cuales 259 pertenecían a coatíes y 108 a mapaches y fueron correspondientes a los periodos de muestreo del invierno del 2012 al verano del 2016. En el cuadro 4 se aprecia el número de muestras por especie correspondientes a cada temporada de muestreo así como las pruebas de laboratorio realizadas.

	Coatíes	Mapaches	Prueba realizada
Invierno 2012	33	17	Seroneutralización y hemograma
Verano 2013	30	15	Seroneutralización y hemograma
Invierno 2013	30	20	Seroneutralización y hemograma
Verano 2014	29	11	Seroneutralización y hemograma
Invierno 2015	30	14	RT-PCR y Hemograma
Verano 2016	30	9	RT-PCR y hemograma
Total	259	108	

Cuadro 4. Muestras biológicas.

Numero de muestras de coatíes y mapaches analizadas por periodo entre los años 2012-2016, así como las pruebas que se realizaron..

7.2 Seroneutralización

El título viral utilizado fue de DIC50% 1:125. Los sueros problema de coatí y mapache se utilizaron en diluciones decuples a partir de 1:100 hasta 1:100000. (Ver anexo 1).

Se obtuvieron resultados positivos en diluciones 1:100 y 1:1000 neutralizando el efecto citopático (figura 6) para coatíes y mapaches como se observa en el cuadro 5 y 6 respectivamente.

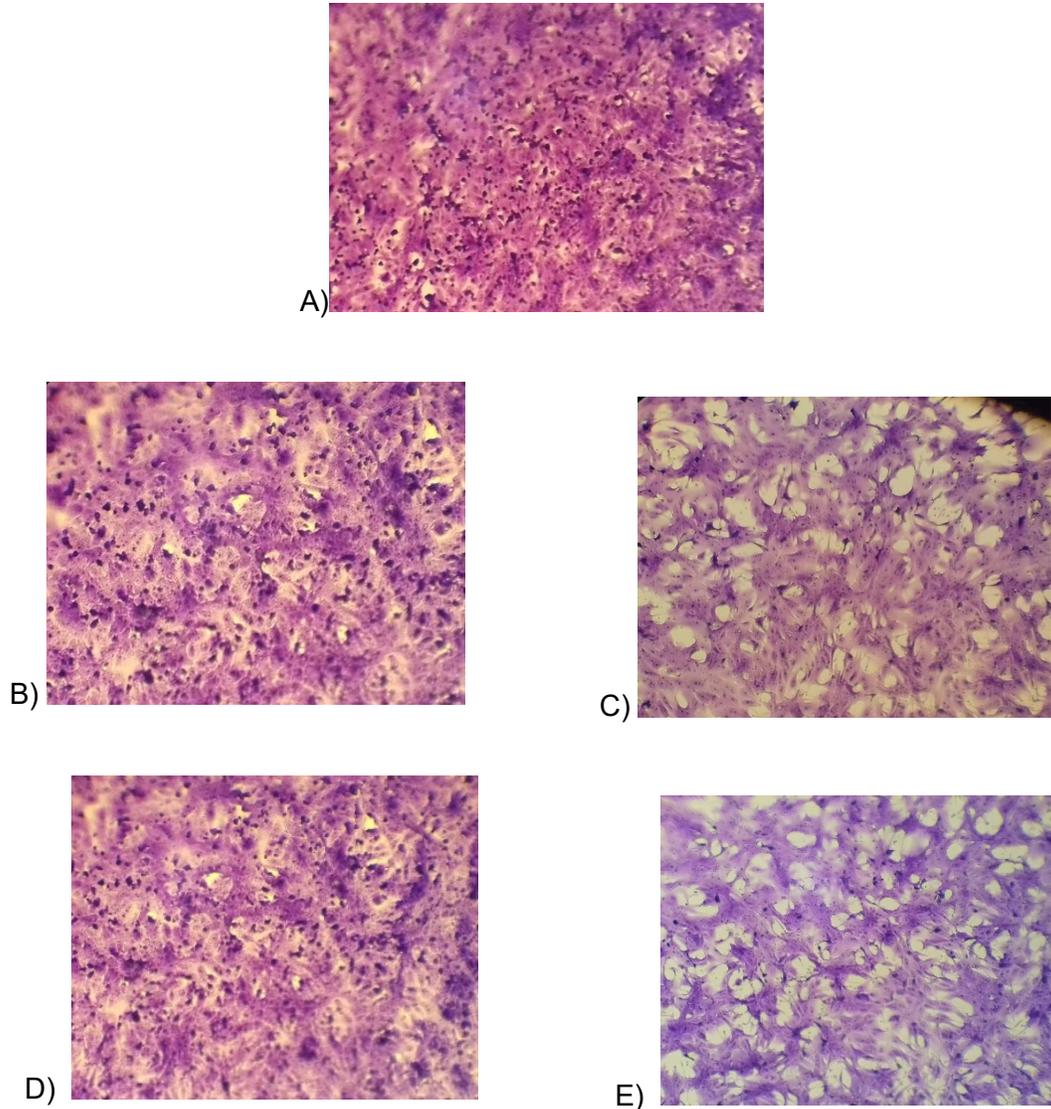


Figura 6. Seroneutralización

Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB y teñidas con Cristal Violeta.

A) Sin inóculo de VDC ni suero problema (Control negativo) B) Sin inóculo de VDC ni suero problema (Control negativo). C) Inoculadas con VDC sin suero problema (Control positivo). D) Inoculadas con VDC y con muestra de suero problema, positiva a anticuerpos contra el VDC (sin efecto citopático). E) Inoculadas con VDC y con muestra de suero problema, negativa a anticuerpos contra VDC (con efecto citopático).

Se realizaron 185 seroneutralizaciones de los cuales 122 correspondían a coatíes y 63 a mapaches como se aprecia en el cuadro 4 de los periodos de captura correspondientes a los muestreos invierno 2012, verano 2013, invierno 2013 y verano 2014.

7.2.1 Coatíes

De un total de 122 muestras analizadas por seroneutralización, se obtuvieron 24 muestras positivas a anticuerpos neutralizantes de las cuales 13 corresponden a una dilución 1:100 y 11 a 1:1000 como se muestra en el cuadro 5.

Temporada	Positivos en dilución 1:100	Positivos en dilución 1:1000	Total de individuos	Prevalencia %
Invierno 2012	4	0	33	12.12
Verano 2013	0	4	30	13.33
Invierno 2013	6	4	30	33.33
Verano 2014	3	3	29	20.68
TOTAL	13	11	122	19.67

Cuadro 5. Número y prevalencia de coatíes positivos a anticuerpos neutralizantes contra el virus del distemper canino en diluciones 1:100 y 1:1000.

Se obtuvieron prevalencias de coatíes positivos a anticuerpos neutralizantes del 12.12%, 13.33%, 33.33% y 20.68% para los periodos de invierno 2012, verano 2013, invierno 2013 y verano 2014 respectivamente, la prevalencia total para los cuatro periodos fue de 19.67% como se observa en la cuadro 5.

7.2.2 Mapaches

Se analizaron 63 muestras por seroneutralización para la población de mapaches, de las cuales se obtuvieron 16 muestras positivas a anticuerpos neutralizantes, 15 de ellas corresponden a una dilución 1:100 y solo 1 a 1:1000 como se muestra en el cuadro 6.

Temporada	Positivos en dilución 1:100	Positivos en dilución 1:1000	Total de individuos	Prevalencia %
Invierno 2012	1	0	17	5.88
Verano 2013	6	0	15	24
Invierno 2013	5	1	20	30
Verano 2014	3	0	11	27.27
TOTAL	15	1	63	25.39

Cuadro 6. Número y prevalencia de mapaches positivos a anticuerpos neutralizantes contra el virus del distemper canino en diluciones 1:100 y 1:1000.

Para la población de mapaches se obtuvieron prevalencias de 5.88%, 24%, 30%, 27.27% para los periodos de invierno 2012, verano 2013, invierno 2013 y verano 2014 respectivamente, la prevalencia total para los cuatro periodos fue de 25.80% de individuos positivos a anticuerpos neutralizantes como se observa en el cuadro 6.

7.3 Transcriptasa Reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

El ARN obtenido del cultivo celular sin infección (control negativo), el cultivo infectado con el virus del distemper canino cepa Onderspoort y de encéfalo de perro positivo a distemper canino por inmunofluorescencia (controles positivos), se observó íntegro (Ver anexo 2) y en la cuantificación se obtuvo 0.750-0.996 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para cultivo celular con y sin infección y 1.3-1.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para el encéfalo con una proporción $A_{260/280\text{nm}}$ de 1.8 considerándolo como ARN de buena calidad (Madrigal, 2000). Se realizó la extracción de ARN de glóbulos blancos a partir de 83 muestras biológicas de sangre completa correspondientes a 60 Coatíes y 23 mapaches, correspondientes a los muestreos de verano 2015 y verano 2016. Su cuantificación mostró cantidades menores a las de cultivo celular las cuales variaron de 0.020 a 0.145 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para coatíes y de 0.026 a 0.236 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para mapaches con una relación $A_{260/280\text{nm}}$ de 1.6 (ver anexo 2).

Se realizó la transcripción reversa de todas las muestras y controles a partir de 1 μg de RNA o lo más cercano a esa cantidad para obtener el DNAC, posteriormente se amplificó un fragmento de 175 pb específico para el VDC correspondiente a una región del gen que codifica para la hemaglutinina, que se encuentra entre el nucleótido 7091 y el nucleótido 7265 del genoma lo cual se confirmó por medio de la digestión del producto con la enzima *AluI*. El resultado fue un producto de 122pb y uno de 54pb (ver anexo 2) como se observó en la simulación realizada previamente con el programa serial cloner V2.5. La concentración mínima detectable de ARN que amplifica la RT-PCR fue de 30 fg a partir del control positivo de células Vero infectadas con el virus del distemper canino (ver anexo 2). Se analizaron 83 muestras por RT-PCR de los cuales 60 corresponden a coatíes y 23 a mapaches de los periodos de captura, invierno 2015 y verano 2016, todos los productos de la PCR se reamplificaron (ver anexo 2).

Prevalencias por RT-PCR

7.3.1 Coatíes

60 muestras de coatíes se sometieron a RT-PCR, 8 fueron positivas al virus del distemper canino de las cuales 1 corresponde al muestreo del verano 2015 mientras que el resto al invierno 2016 como se observa en el cuadro 6 y en las figuras 7 y 8.

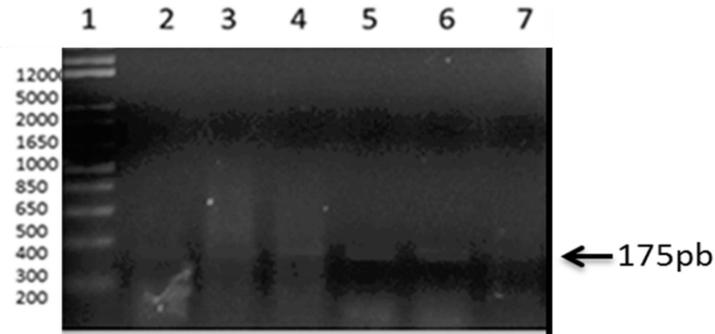


Figura 7. Resultados de la detección del VDC en coatíes por PCR.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2-5 corresponden a muestras de coatíes positivos a VMC, en el carril 6 y 7 el control positivo y negativo respectivamente.

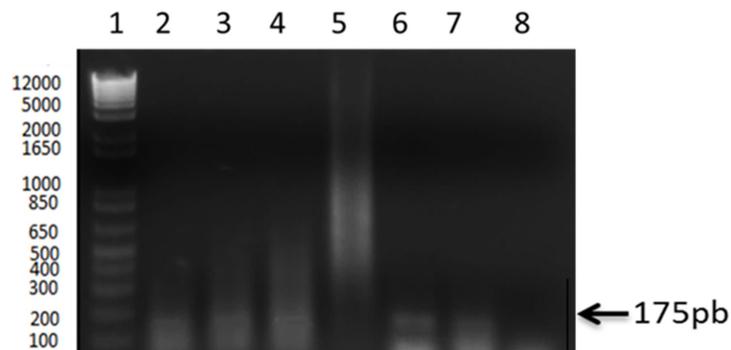


Figura 8. Resultados de la detección del VDC en coatíes por PCR.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder®, carril 2-4 y 6 corresponden a muestras de coatíes positivos a VMC, carril 5 muestras de coatíes negativos a VDC, en el carril 7 y 8 el control positivo y negativo respectivamente.

Periodo	Total	Positivos	Prevalencia %
Invierno 2015	30	1	3.33
Verano 2016	30	7	23.33
TOTAL	60	8	13.33

Cuadro 7. Frecuencia de coatíes positivos y negativos a la prueba de RT-PCR para el VDC.

Las prevalencias para coatíes positivos a virus de distemper canino durante las temporadas de invierno 2015 y verano 2016 fueron de 3.33% y 23.33%, una prevalencia total de 13.33% se obtuvo para ambos periodos como se aprecia en el cuadro 7.

7.3.2 Mapaches

Se analizaron 23 muestras por RT-PCR, 4 de ellas fueron positivas al virus del moquillo canino de las cuales 1 corresponde al muestreo del verano 2015 y 3 al invierno 2016 como se observa en el cuadro 6, figuras 9 y 10.

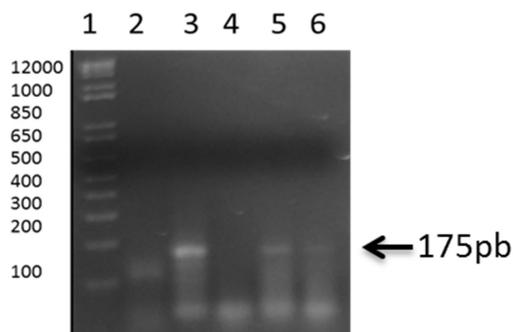


Figura 9. Resultados de la detección del VDC en mapaches por PCR.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2 se observa una digestión de la banda de 175 pb con un resultado de 122pb, carril 3 y 4 se observan los controles negativo y positivo respectivamente, carril 5 y 6 corresponden a muestras de mapaches positivos a VMC.

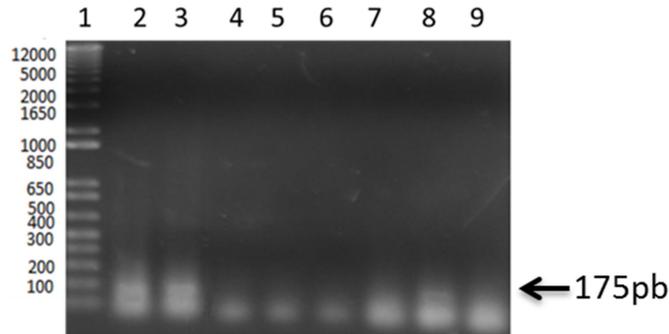


Figura 10. Resultados de la detección del VDC en mapaches por PCR.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2, 3 y 6 corresponden a muestras de mapaches positivos a VDC, carril 4-7 muestras de mapaches negativos a VDC, en el carril 7 y 8 el control positivo y negativo respectivamente.

Periodo	Total	Positivos	Prevalencia
Invierno 2015	14	1	7.14
Verano 2016	9	3	33.33
Total	23	4	17.39

Cuadro 8. Frecuencia de mapaches positivos y negativos a la prueba de RT-PCR para el VDC.

Las prevalencias para mapaches positivos a virus de distemper canino durante los muestreos de invierno 2015 y verano 2016 fueron de 7.14% y 33.33% respectivamente y una prevalencia total de 17.39% para ambos periodos como se aprecia en el cuadro 8.

7.4 Diferencias entre especies

7.4.1 Seroneutralización

Se compararon las frecuencias de individuos positivos a anticuerpos contra el virus del distemper canino entre las poblaciones de coatíes y mapaches durante el periodo que abarca desde el invierno 2012 hasta el verano 2014. La frecuencia de individuos positivos fue de: 18.85% para coatíes y 22.22% en mapaches, no se encontró diferencia

significativa que indique que alguna especie tiene mayor frecuencia de anticuerpos contra VDC. ($X^2= 0.2949$, $g=1$, $p=0.58717$; cuadro 8).

7.4.2 RT- PCR

Se comparó la frecuencia entre especies de individuos que presentaron el VDC en sangre durante el periodo antes mencionado, sin encontrar diferencias significativas ($X^2=0.2214$, $g=1$, $p= 0.6380$; cuadro 9).

Especie	Serología			PCR		
	Positivos	Total	Frecuencia (%)	Positivos	total	Frecuencia (%)
Coatíes	24	122	19.67	8	60	13.33
Mapaches	14	63	22.22	4	23	17.39

Cuadro 9. Comparación de frecuencias entre coatíes y mapaches positivos por serología a anticuerpos contra el VDC y por PCR al VDC.

7.5 Comparación entre edad y sexo

7.5.1 Serología Coatíes

Se evaluó la asociación entre sexo y edad y la presencia de anticuerpos contra el VDC, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas para la variable sexo (IC 95%=0.72-1.84, OR= 1.15, P=0.55), de igual manera no se encontraron diferencias con la edad. (IC 95%= 0.57-1.46, OR=0.91, P=0.72; cuadro 10).

Coatíes	Serología			
	Machos		Hembras	
	Jóvenes n=12	Adultos n=6	Jóvenes n=40	Adultos n=64
Positivos	2	2	12	8
Frecuencia (%)	16.66	33.33	30	12.5

Cuadro 10. Frecuencia de coatíes positivos a anticuerpos contra el VDC estratificados por edad y sexo.

Mapaches

También se evaluó la asociación entre sexo y edad y la presencia de anticuerpos contra el VDC en mapaches, detectando una asociación positiva dependiente del sexo donde las hembras presentan 6.4 veces mayor probabilidad de presentar anticuerpos contra el VDC en comparación con los machos (IC 95%=1.4-29.4, OR=6.4, P=0.01). Mientras que al evaluar la población positiva a anticuerpos contra el VDC con respecto a la variable edad no se encontraron diferencias significativas (IC 95%=0.33-2.55, OR=0.92, P=0.88; cuadro 11).

Serología				
Mapaches	Machos		Hembras	
	Jóvenes n=7	Adultos n=11	Jóvenes n=14	Adultos n=30
Positivos	1	0	4	10
Frecuencia (%)	14.28	0	28.57	33.33

Cuadro 11. Frecuencia de mapaches positivos a anticuerpos contra el VDC estratificados por edad y sexo

7.5.2 RT-PCR Coatíes

Se evaluó la asociación de sexo y edad con presencia del VDC en sangre, encontrando diferencias significativas, con una probabilidad 5.62 veces mayor en hembras que en machos (IC 95%=3.05-10.33, OR=5.62, P=0.0), así mismo se encontró una mayor presencia de del VDC en individuos adultos con 9.55 veces mayor riesgo que en individuos jóvenes (IC 95%=4.85-18.80, OR=9.55, P=0.00; cuadro 12)

PCR				
Coatíes	Machos		Hembras	
	Jóvenes n=9	Adultos n=2	Jóvenes n=14	Adultos n=35
Positivos	1	1	0	6
Frecuencia (%)	11.11	50	0	17.14

Cuadro 12. Frecuencia de coatíes positivos al VDC en sangre estratificados por edad y sexo.

Mapaches

Al evaluar las asociaciones de sexo y edad con presencia del VDC en sangre, se encontró una asociación positiva dependiente entre edad siendo los jóvenes los que tienen 2.85 veces más probabilidad que los adultos de presentar VDC en sangre (IC 95%=1.35-6.0, OR=2.85, P=0.005), para la variable sexo no se encontró diferencias significativas (IC 95%=0-45X10¹⁰, OR=.048, P=0. 61) que influyan en la presentación del VDC en sangre (cuadro 13).

PCR				
Mapaches	Machos		Hembras	
	Jóvenes n=2	Adultos n=1	Jóvenes n=11	Adultos n=9
Positivos	0	0	3	1
Frecuencia (%)	0	0	27.27	11.11

Cuadro 13. Frecuencia de coatíes positivos al VDC en sangre estratificados por edad y sexo.

7.6 Comparación de los valores de la biometría hemática entre individuos positivos contra negativos al VDC.

7.6.1 Serología

Coatíes

Se compararon las medianas de los diferentes componentes de la biometría hemática en la población de coatíes, individuos positivos a anticuerpos contra el VDC contra negativos, encontrando diferencias estadísticamente significativas solo en eritrocitos, teniendo los individuos negativos una mediana mayor a la de individuos con presencia del VDC en sangre (negativos= $7.60 \times 10^9/L$, positivos= $6.93 \times 10^9/L$, $p=0.0438$). Para el resto de los componentes de hemograma no se encontraron diferencias significativas (ver cuadro 14)

Formula Roja	Positivos	Negativos
<u>Eritrocitos ($\times 10^{12} /L$)</u>	<u>6.93*</u>	<u>7.6*</u>
Hemoglobina (g/L)	103	98
Hematocrito (L/L)	0.35	0.34
VGM (fl)	48.7	45.5
HGM (pg/cel)	14.35	13.57
CHGM (g/L)	295.02	294.87
Formula blanca	Positivos	Negativos
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	10.10	9.95
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	2.40	2.85
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	5.88	3.99
Monocitos ($\times 10^9/L$)	0.539	0.858
Eosinófilos ($\times 10^9/L$)	0.697	1.090
Basófilos ($\times 10^9/L$)	0.106	0.137
Proteínas plasmáticas (g/L)	7.41	7

Cuadro 14. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre coatíes positivos y negativos a anticuerpos neutralizantes contra el VDC (n= 122).

* Diferencias significativas.

Mapaches

Se compararon las medianas de los diferentes componentes de la biometría hemática en la población de mapaches, individuos positivos a anticuerpos contra el VDC contra negativos, en este caso no se encontraron diferencias significativas en ningún componente de la biometría hemática (cuadro 15)

Formula Roja	Positivos	Negativos
Eritrocitos (x10⁹/L)	7	6.64
Hemoglobina (g/L)	106	106
Hematocrito (L/L)	0.37	0.34
VGM (x10⁹/L)	50.7	50
HGM (x10⁹/L)	16.9	15.2
CHGM (g/L)	295.02	294.87
Formula blanca	Positivos	Negativos
Leucocitos (x10⁹/L)	10.2	10.2
Linfocitos (x10⁹/L)	1.26	1.7
Neutrófilos	7.14	7.46
Monocitos	0.453	0.380
Eosinófilos	0.30	0.78
Basófilos	0	0
Proteínas plasmáticas	9.2	9

Cuadro 15. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre mapaches positivos y negativos a anticuerpos neutralizantes contra el VDC (n= 63).

7.6.2 Biometría Hemática-PCR Coatíes

Se compararon las medianas de los diferentes componentes de la biometría hemática en la población de coatíes positivos y negativos al VDC en sangre periférica, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en: eritrocitos, teniendo los individuos negativos una mediana mayor a la de individuos positivos (negativos= $6.45 \times 10^9/L$, positivos= $5.736 \times 10^9/L$, $p=0.001$), se presentó una mayor cantidad de monocitos en individuos positivos al VDC contra individuos negativos al virus en sangre (positivos = $1.02 \times 10^9/L$, negativos= $0.549 \times 10^9/L$, $p=0.013$). Para el caso de los restantes componentes no se encontraron diferencias significativas (Ver cuadro 16).

Formula Roja	Positivos	Negativos
<u>Eritrocitos ($\times 10^{12} /L$)</u>	<u>5.73*</u>	<u>6.45*</u>
Hemoglobina (g/L)	91.25	94.37
Hematocrito (L/L)	0.30	0.31
VGM (fl)	53.83	49.19
HGM (pg/cel)	15.68	14.91
CHGM (g/L)	295.65	303.33
Formula blanca	Positivos	Negativos
Leucocitos ($\times 10^9/L$)	9.75	9.2
Linfocitos ($\times 10^9/L$)	2.89	3.69
Neutrófilos ($\times 10^9/L$)	3.68	4.28
<u>Monocitos ($\times 10^9/L$)</u>	<u>1.02*</u>	<u>0.549*</u>
Eosinófilos ($\times 10^9/L$)	0.78	1.164
Basófilos ($\times 10^9/L$)	0.024	0.57
Proteínas plasmáticas (g/L)	7.05	7.4

Cuadro 16. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre coatíes positivos y negativos al VDC en sangre (n= 60). * Diferencias significativas.

Mapaches

Se compararon las medianas de los diferentes componentes de la biometría hemática en la población de mapaches, individuos positivos al VDC contra negativos, en este caso no se encontraron diferencias significativas en ningún componente de la biometría hemática (Cuadro 17).

Formula Roja	Positivos	Negativos
Eritrocitos (x 10 ¹² /L)	6	6.72
Hemoglobina (g/L)	103	98
Hematocrito (L/L)	0.30	0.312
VGM (fl)	53.33	47.32
HGM (pg/cel)	16.5	14.6
CHGM (g/L)	337.5	315.78
Formula blanca	Positivos	Negativos
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	12.01	10.08
Linfocitos (x10 ⁹ /L)	1.56	1.71
Neutrófilos (x10 ⁹ /L)	9.68	7.05
Monocitos (x10 ⁹ /L)	0.489	0.728
Eosinófilos (x10 ⁹ /L)	0	0
Basófilos (x10 ⁹ /L)	0	0
Proteínas plasmáticas (g/L)	8.8	8.4

Cuadro 17. Comparación de medianas de los valores de los componentes del hemograma entre mapaches positivos y negativos al VDC en sangre (n= 23)

7.7 Recapturas

Para este estudio se recapturaron cuatro individuos que fueron positivos a la prueba de seroneutralización al menos en dos periodos de captura como se muestra en la cuadro 18. De los cuales un coatí tuvo anticuerpos en invierno 2013 y verano 2014 de 1:1000 y tres mapaches de los cuales todos tuvieron títulos en los periodos correspondientes a 1:100.

Especie	Identificación	Invierno 2012	Verano 2013	Invierno 2013	Verano 2014
Coatí	96			X	X
Mapache	32	X		X	
Mapache	16		X		X
Mapache	40		X	X	

Cuadro 18. Recapturas para seroneutralización.

En el caso de animales positivos a PCR no hubo recapturas, sin embargo, un coatí (identificación=86) que fue positivo en la prueba serológica con un título de anticuerpos de 1:1000 en el periodo de invierno 2013 y fue positivo a la RT-PCR en verano 2016.

8. Discusión

Se realizó la prueba de seroneutralización con sueros de coatíes y mapaches para la detección de anticuerpos neutralizantes contra el VDC de manera similar a como se ha realizado en otros estudios con animales silvestres y domésticos (Clancy *et al.* 2013; Rentería-Solís *et al.* 2014; Acosta-Jamett *et al.* 2015). Se utilizaron células Vero tanto para amplificar el VDC como para realizar la seroneutralización y se utilizó un título viral similar al de otros estudios (TCCI₅₀ 1:123; Takenaka *et al.* 2014; Sakai *et al.* 2013; Marcacci *et al.* 2014). Existieron variantes con otros trabajos como la toma y conservación de muestras, por ejemplo la utilización de tiras de papel filtro para conservarlas (Kamps *et al.* 2015), horas de incubación para la amplificación del virus así como uso de células Vero modificadas (Rentería-Solís *et al.* 2014), no obstante los títulos de anticuerpos neutralizantes reportados en el presente estudio son semejantes con los referidos en especies silvestres y domésticos.

Se efectuó la RT-PCR para evidenciar la presencia del VDC en ambas poblaciones, como se ha realizado en otros estudios con especies silvestres (Gowtage-Sequeira *et al.* 2009; Sekulin *et al.* 2011; Marcacci *et al.* 2014) y domésticas (Se-Yeoun *et al.* 2012; Di Francesco *et al.* 2012), a partir de sangre completa de los individuos (Frisk *et al.* 1999) detectando algún fragmento correspondiente a la hemaglutinina del VDC, con resultados similares a los de este estudio (Gowtage-Sequeira *et al.* 2009; Se-Yeoun *et al.* 2012; Rentería-Solís *et al.* 2014).

Se llevó a cabo la biometría hemática de cada individuo para ambas poblaciones como se realiza de manera rutinaria en muestreos con animales silvestres para conocer el estado de salud de la población, así como para proveer información relacionada con el diagnóstico de diversas enfermedades (Keller *et al.* 2008; Wirz *et al.* 2008). En este trabajo se encontraron, resultados semejantes a los descritos en coatíes en el Parque-Museo de la Venta en Villahermosa Tabasco (Rovirosa-Hernández *et al.* 2012).

El presente trabajo muestra por primera vez un estudio complementario de análisis serológico y molecular en procionidos silvestres. El único antecedente en México de este trabajo se realizó en la isla de Cozumel con 25 mapaches pigmeos (*Procyon pygmaeus*) determinando la presencia del VDC por RT-PCR en 3 individuos lo que representó una prevalencia de 12% en esa especie (Mena, 2007). Esto es semejante a lo reportado en mapaches (*Procyon lotor*) en este estudio con 17.39%, lo que puede asociarse a las semejanza de las condiciones de hábitat donde animales silvestres tienen contacto con animales domésticos y sus patógenos. En aquel estudio, también se incluyeron tres coaties (2 *Nasua narica* y 1 *Nasua narica nelsoni*) los cuales fueron negativos, (Mena, 2007). La diferencia que existe entre lo reportado en Cozumel y lo reportado en este estudio se atribuye a la falta de muestras de coatíes en la isla.

Se ha reportado la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el VDC en carnívoros domésticos (Canidae, Mustelidae) de 9.3% - 51% con títulos de anticuerpos que van desde 1:10 a 1:3040 (Bronson *et al.* 2007; Perpiñán *et al.* 2008; Akerstedt *et al.* 2010; Cha *et al.* 2012; Malzoni *et al.* 2013; Takenaka *et al.* 2014; Acosta-Jamett *et al.* 2015; Elia *et al.* 2015; Peper *et al.* 2016), mientras que en carnívoros silvestres (*Procyonidae*, *Ailuridae*, *Ursidae*, *Phocidae* y *Felidae*) las prevalencias se han encontrado entre 14.08% y 42%, con títulos entre 1:4 a 1:1536, (Akerstedt *et al.* 2010; Clancy *et al.* 2013; Malzoni *et al.* 2013; Acosta-Jamett *et al.* 2015). En mapaches (*Procyon lotor*) se han reportado títulos de anticuerpos neutralizantes a partir de 1:8 hasta 1:1,024 con prevalencias de 21% (Bronson *et al.* 2007; Junged *et al.* 2007; Kamps *et al.* 2015). El presente estudio reporta prevalencias para mapaches y coaties de 25.80% y 19.67% respectivamente y

títulos de anticuerpos de 1:100 y 1:1000 los cuales se encuentran dentro de los rangos reportados en animales domésticos y silvestres, lo que sugiere que animales con estos títulos están en constante contacto con el VDC, lo que induce una respuesta inmunológica que evita que haya un brote con alta mortalidad en las poblaciones de este estudio como sucede en otras especies animales (Welter *et al.* 2000; Ludes *et al.* 2016).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes encontrados en este estudio y que fueron similares para ambas poblaciones, sugiere que hay una circulación del virus de manera endémica como lo menciona Akerstedt *et al.* en el 2010 con cánidos silvestres. La variación tan amplia de los títulos de anticuerpos entre estudios puede deberse a varios factores como la recolección de muestras, métodos de procesamiento, tiempo transcurrido entre la recopilación y el procesamiento, si las muestras no fueron manipuladas correctamente (Kamps *et al.* 2015), especies estudiadas, lugar donde se realizó cada estudio, dinámica de las poblaciones y del patógeno, como se ha reportado con diferentes enfermedades, entre ellas el VDC.(Roelke *et al.* 1996; Altizer *et al.* 2003; Honer *et al.* 2012; Ezenwa *et al.* 2015).

Existen estudios que han reportado prevalencias de VDC por RT-PCR en carnívoros domésticos (Canidae, Mustelidae), y que oscilan entre 9.6% y 55% con una letalidad de hasta el 100% (Romanutti *et al.* 2016; Perpiñán *et al.* 2008; Cha *et al.* 2012; Malzoni *et al.* 2013; Elia *et al.* 2015; Pope *et al.* 2016) y en carnívoros silvestres en diferentes partes del mundo que van desde 9.6% a 86% (Sharon *et al.* 2000; Gowtage-Sequeira *et al.* 2009; Meli *et al.* 2010; Malzoni *et al.* 2013, Pope *et al.* 2016; Avendaño *et al.* 2016), estudios en mapaches (*Procyon lotor*) reportan prevalencias de 76%-86% en Estados Unidos y Alemania (Roscoe 1993; Rentería-Solís *et al.* 2014), mientras que en México en la isla de Cozumel se realizaron 2 estudios con mapaches (*Procyon pygmaeus*) donde se encontraron prevalencias del 4% y 12% (McFadden *et al.* 2005; Mena 2007). En este estudio se reportaron prevalencias para coatíes (*Nasua narica*) y mapaches (*Procyon lotor*) de 13.33% y 17.39% respectivamente, los cual se encuentra dentro del rango reportado en otras familias de animales domésticos y silvestres. Sin embargo, para especies de la misma familia (Procyonidae) las prevalencias son menores a las reportadas en otros estudios que han descrito brotes de VDC en especies silvestres, donde convergen hábitats rurales y urbanos, sumando a estos lugares, ambientes idóneos para congregarse grandes números de animales, propiciando el contacto interespecies con sus respectivos patógenos y cepas, creando así altas tasas de

infección y mortalidad en nuevos hospederos (Rentería-Solís et al. 2014). Similar situación de hábitat sucede con los prociénidos en el Parque-Museo de la Venta y la isla de Cozumel, donde, si bien especies silvestres y domésticas viven de manera simpátrica a lo largo del año, a diferencia de otras especies reportadas, existe un contacto directo y continuo con patógenos de dichas especies, particularmente con VDC, disminuyendo la probabilidad de un brote por una nueva cepa de VDC. Esto podría resultar en altas tasas de morbilidad y mortalidad (Ludes et al. 2016), y explicaría las menores prevalencias en RT-PCR en este estudio, que es apoyado por los altos títulos de anticuerpos encontrados también en este trabajo.

El presente reporte, confirmo la eficacia de la prueba de RT-PCR utilizando un fragmento de 175 pb específico del VDC, como se había publicado anteriormente (Se-Yeoun et al. 2012), usando en este caso ARN de la cepa Onderspoort del VDC con un título de 10^2 , similar a lo reportado en otros estudios con dosis que fueron de 10^4 a 10^{-3} (Józwik y Frymus et al. 2005; Carrasco, 2010), a partir de sangre completa de los individuos muestreados. El fragmento fue verificado con el uso de un ensayo de restricción con la enzima *AluI* (Frisk et al. 1999), lo cual aumenta su especificidad logrando obtener resultados semejantes a lo publicado anteriormente (Se-Yeoun et al. 2012). Pese a esto, las prevalencias de la presencia del VDC, podrían aumentar con el uso de una PCR anidada ya que aumenta la sensibilidad de la prueba de 25-50% dependiendo del origen de la muestra. (Józwik y Frymus et al. 2005; Shin et al. 2004). En cuanto a la detección mínima detectable por PCR en este estudio, se lograron detectar 30 fg del ADN blanco, lo que resultó similar a otros trabajos que utilizan la PCR, con sensibilidades de 100 ng a 100 fg (Vargas et al. 2004; Aguirre et al. 2008).

Al comparar la prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra el VDC, así como la detección del virus por PCR en las dos poblaciones de prociénidos, no se encontraron evidencias en este estudio de diferencias significativas, lo cual es congruente con casos como el reportado en Chile, donde al comparar estas variables en carnívoros silvestres contra domésticos viviendo en la misma zona, tampoco se encontraron diferencias (Acosta-Jamett et al 2015). Sin embargo este estudio sugiere que compartir un mismo hábitat durante todo el año entre especies, podría provocar una interacción y quizá la adaptación de cepas del VDC entre especies silvestres y domésticas (Acosta-Jamett et al. 2015; Nikolin et al. 2016). Apoyado con el caso de leones y perros domésticos en Africa, donde la prevalencia del VDC no siempre coincide entre especies silvestres y domésticas (Viana et al. 2015), debido a que este virus tiene afinidad de multihospederos, es decir

especies silvestres pueden mantener la presencia del virus sin la necesidad de animales domésticos (Craft *et al.* 2008).

Respecto a las diferencias por estratos de edad y sexo, en carnívoros silvestres (*Vulpes lagopus*) en Noruega hay reportes de que en hembras existe una mayor prevalencia que en machos de anticuerpos neutralizantes contra el VDC (Akerstedt *et al.* 2010). Esto coincide con lo reportado en este estudio con hembras en mapaches, lo cual podría deberse a un mayor número con respecto a los machos en la población, como también lo reporta Ceballos-Escalera *et al.* en el 2013. Caso similar en este estudio ocurre con hembras en coatíes que presentaron una mayor prevalencia para la prueba de PCR, con la diferencia de que los coatíes forman grupos de hembras lo cual facilitaría su diseminación en el género, ya que los machos suelen ser solitarios la mayor parte del tiempo (Valenzuela 1998; Beisiegel y Mantovan 2006).

Se presentó en este trabajo una mayor presencia del VDC en mapaches jóvenes similar a lo reportado en China en perros domésticos (Luo *et al.* 2017) esto se puede asociar a que animales jóvenes son más susceptibles a infectarse con el VDC ya que su sistema inmune está en desarrollo y los anticuerpos maternos disminuyen, provocando alta morbilidad y mortalidad (Wyllie *et al.* 2016; Luo *et al.* 2017)

Coatíes al contrario, presentaron una mayor prevalencia en PCR en adultos lo que es similar al caso de zorros rojos (*Vulpes vulpes*) y perros ferales (*Canis lupus*) donde las prevalencias, al menos en anticuerpos neutralizantes, son mayores en individuos adultos (Akerstedt *et al.* 2010), lo cual podría relacionarse en estas especies con el amplio desplazamiento que tienen individuos adultos respecto a los jóvenes que permanecen al cuidado de las hembras restringiendo su movilización (Valenzuela, 1998; Beisiegel y Mantovan, 2006)

Se detectó una asociación en coatíes para ambas pruebas respecto a los conteos de eritrocitos. Este hallazgo corresponde con el reportado por Bedón en el 2011, al realizar un estudio en perros domésticos donde si bien no hubo cambios mayores en el número de eritrocitos, si se presentaron anemias regenerativas y no regenerativas en animales con VDC. Sin embargo otra posible explicación es la asociación entre valores hemáticos y sexo de los individuos. En estudios previos en la población de coatíes en el Parque-Museo de la Venta en Villahermosa Tabasco, se reportó que machos clínicamente sanos tienen conteos superiores a las hembras en eritrocitos (Rovirosa-Hernández *et al.* 2012) lo que podría estar relacionado al resultado aquí presentado en la prueba de

seroneutralización, ya que la población de individuos positivos corresponde a machos con un 62.5% respecto a machos negativos que tienen un 38.7%, de igual manera se podría explicar para la PCR donde la mayor cantidad de machos son negativos 42.3% respecto a los positivos 12.5%, es decir, el mayor número de machos negativos a las pruebas podría estar influyendo poblacionalmente con su mayor conteo de eritocitos.

Otra tipo de leucocitos que presentó una elevación estadísticamente significativa en el conteo diferencial, fueron los monocitos en los coatis positivos por PCR, sin llegar a valores críticos, similar a lo reportado para perros domésticos (Stein *et al.* 2008). Entre las causas que pueden producir una elevación en el conteo de monocitos en el leucograma, se encuentran inflamaciones crónicas o agudas, presencia de corticosteroides o infecciones (Weiss *et al.* 2010). Para este trabajo su aumento en la población de coatis positivos a VDC se podría relacionar con la respuesta celular a la infección que pueda incrementar el número de monocitos en sangre como se ha reportado en perros, lo cual es poco común pero existen de reportes que lo sustentan (Stein *et al.* 2008), ya que los valores de monocitos se han monitoreado y oscilan en el transcurso de la infección de VDC, teniendo un aumento durante los primeros días post infección en mustélidos para posteriormente exhibir una disminución de los mismos (Nielsen *et al.* 2009). Esto es similar a lo que pasa con perros domésticos, con la diferencia de que la infección solo causa reducción del número de monocitos, a partir de los primeros 3 días post infección y siendo mas evidente en animales con persistencia del VDC al día 6, ya que se incrementa niveles de apoptosis en monocitos (Schobesberger *et al.* 2005). Por otro lado, este estudio también sugiere que los coatis están montando una respuesta inmune más eficaz que perros domésticos contra el VDC, ya que en esta especie no existen reportes de que la infección por VDC ocasione signos clínicos y muerte, a diferencia de los mapaches y perros que cuentan con reportes de que el VDC les genera signos clínicos y altas tasas de mortalidad, sin embargo en este estudio no se presentaron variaciones en el número de monocitos (Lednický *et al.* 2004; Pope *et al.* 2016).

Además, los resultados mostrados en este estudio sugieren que en ambas poblaciones de prociénidos, a lo largo de los periodos de muestreo, tuvieron contacto con el VDC. Sin embargo, para determinar el origen del virus es necesario realizar pruebas complementarias que puedan especificar el origen de este, ya que animales silvestres que están en estrecho contacto con animales domésticos podrían comportarse como vectores del VDC (Seimon *et al.* 2013). Esto se debe a que también se ha demostrado que este virus pueden circular en vida silvestre incluso cuando los niveles de infección sean bajos y

asíncronos a las infecciones encontradas en perros (Viana *et al.* 2015), considerando a especies silvestres como el mapache, reservorios del VDC que pueden diseminar la enfermedad a otros animales (Suzuki *et al.* 2015), lo cual puede llevar a mantener la infección activa por medio de multihospederos no necesariamente domésticos (Craft *et al.* 2008).

En este estudio se obtuvieron cuatro individuos recapturados positivos a anticuerpos neutralizantes en diversos periodos de muestreo y presentaron los mismo títulos en los diferentes periodos, esto es 1:100 en mapaches y 1:1000 en coatíes. Esto propone dos situaciones, los anticuerpos se mantienen por periodos de al menos 1 año o bien la presencia continua o intermitente de los anticuerpos es una respuesta a reinfecciones con el virus. Al menos en dos mapaches los títulos de anticuerpos no se pudieron medir durante seis meses, lo cual sugiere que la presencia del VDC en el Parque Museo de la Venta en Villahermosa Tabasco se mantiene de manera endémica (Junged *et al.* 2007).

La duración de los títulos de anticuerpos contra el VDC puede ser dependiente del número de contactos con el VDC y la dosis infectante, como se reporta para otros patógenos en coatís y mapaches (Jardine *et al.* 2011; De la Rosa-Arana *et al.* 2016; Gallardo-Romero *et al.* 2016). De esta manera la inmunidad generada puede no ser permanente y esto podría ser apoyado con el resultado obtenido de un coatí recapturado con títulos de anticuerpos 1:100 en invierno 2013 y que 42 meses después resultó positivo al VDC en sangre mediante PCR, es decir al no estar en contacto con el VDC durante un periodo de tiempo los anticuerpos podrían disminuir de manera que pueda ocurrir una reinfección con una cepa diferente (De la Rosa-Arana *et al.* 2016), Esto hace necesario realizar un seguimiento serológico de los individuos para poder verificarlo.

9.- Conclusiones

El presente estudio evidenció la presencia del VDC en coatíes y mapaches, en condiciones de infección natural, por medio de la RT-PCR utilizando iniciadores específicos para un fragmento de 175 pb del gen de la hemaglutinina, siendo el primer reporte para estas especies en el estado de Tabasco y el primero de coaties en el mundo. Adicionalmente se detectaron anticuerpos contra el VDC mediante la prueba de seroneutralización. En conjunto los datos serológicos y moleculares de este estudio sugieren que el VDC está presente de manera endémica en diferentes periodos de tiempo en ambas poblaciones de prociónidos (*Nasua narica* y *Porcyon lotor*) en el Parque-Museo de la Venta en Villahermosa Tabasco. Probablemente, ambas especies están generando una respuesta inmune adaptativa, la cual no es permanente.

10. Prospectivas

1. Incluir el uso de conjugados específicos para el VDC en la prueba de seroneutralización y pruebas como Westernblot y ELISA para incrementar la sensibilidad y especificidad.
2. Adicionalmente y con la finalidad de determinar la cronicidad de la respuesta inmune humoral, sería importante trabajar con conjugados específicos contra IgM e IgG para una prueba de ELISA de cada una de las especies.
3. Respecto al diagnóstico molecular es indispensable realizar la secuenciación de los amplificados de ambas especies, para determinar y/o descartar las relaciones filogenéticas entre las cepas de VDC circulantes en estas poblaciones o con el virus en el resto del mundo.

10. Literatura citada

1. Acosta-jamett, G; Chalmers, WSK; Cunningham, AA; Cleaveland, S; Handel, IG; 2011. Urban domestic dog populations as a source of canine distemper virus for wild carnivores in the Coquimbo region of Chile. *Veterinary microbiology* 152:247–257.
2. Aguirre, V; Alvarado, M; Luís, J; González, I. 2008. Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble duplex polymerase chain reaction as a rapid , effective diagnostic test for bovine brucellosis using blood samples. *Técnica pecuaria en México*. 46:147–158.
3. Akerstedt, D; Ramis, A; Tomás, A; Carpintero, E; Bargalló, F; 2010. Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in scandinavia and svalbard. *Journal of wildlife diseases*, 46: 474–480.
4. Altizer, S; Nunn, C; Thrall, P; Gittleman, J; Antonovics, J; Cunningham, A; Dobson, A; Ezenwa, V; Jones, K; Pedersen, A; Poss, M; Pulliam, J. 2003. Social organization and parasite risk in mammals: Integrating theory and empirical studies. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*. 34:517–47
5. Aranda, M; Sánchez-Cordero, V. 1996. Prey Spectra of Jaguar (*Panthera onca*) and Puma (*Puma concolor*) in Tropical Forests of Mexico. *studies on neotropical fauna and environment*, 31-2
6. Avendaño, R; Barrueta, F; Soto-Fournier, S; Monge, O; Gutiérrez-Espeleta, GA; Chaves, A. 2015. Canine distemper Virus in Wild Felids of Costa Rica. *Journal of Wildlife Disease*, 52:373–377.

7. Bedón, M. 2011. "evaluación de las alteraciones de los parámetros en hemograma y perfil hepático en distemper canino". Tesis Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
8. Beisiegel, B; Mantovani, W. 2006. Habitat use home range and foraging preferences of the coati *Nasua nasua* in a pluvial tropical Atlantic forest area. *Journal of zoology*. 269:77–87.
9. Bronson, E; Sanchez, V; Melanoleuca, A. 2007. Serologic response to a canarypox-vectored canine distemper virus vaccine in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) serologic response to a canarypox-vectored canine. *Journal of zoo and wildlife medicine*, 38:363-6.
10. Bronson, E; Emmons, S; Murray, EJ; Deem, SL. 2008. Serosurvey of pathogens in domestic dogs on the border of Noël Kempff Mercado National Park, Bolivia, *Journal of zoo and wildlife medicine*, 39:1 28-36.
11. Burts, H; Angelika, U. 2007. Evidence of canine distemper and suggestion of Preceding parvovirus-myocarditis in a Eurasian Badger (*Meles meles*). *journal of zoo and wildlife medicine* 38:1, 139–142.
12. Cattet, M; Duignan, C; House, Aubin, D. 2004. Antibodies to canine distemper and phocine distemper viruses in polar bears from the anadian arctic. *Journal of wildlife diseases*, 40:2, 338–342.
13. Cattaneo, R; Kaelin, K; Bacsko, K; Bileter, MA. 1989. Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*. 56,759-764.
14. Carrasco, L. 2010. Detección del gen de la glicoproteína B del virus herpes canino a través de la reacción de la polimerasa en cadena. Tesis Profesional de Médico Veterinario. Facultad de ciencias veterinarias y pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

15. Ceballos-Escalera, J; Lara, J; Montoro, J; García-Román, L; Herrera, J; González, J; García, F; López-nieva, P; Aramburu, M; Ortega, M; Cuesta, R. 2013. "Gestión de la población de mapache (*Procyon lotor* L.) en la comunidad de Madrid". En: Actas del 6º Congreso Forestal Español.
16. Céspedes, PF; Cruz, P; Navarro, CO. 2010. Modulation of immune response during canine distemper virus infection: therapeutic and vaccine development implications. *Archivos de medicina veterinaria*, 42:15–28.
17. Cha, S; Kim, E; Kang, M; Jang, S; Lee, H; Jang, H. 2012. Comparative Immunology, Microbiology and infectious diseases epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 35:497–504.
18. Chomczynski, P; Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biochemical*. 162. 156.
19. Clancy, MM; Gamble, KC; Travis, DA. 2013. Detection of canine distemper virus serum neutralizing antibodies in captive us phocids. *Journal of zoo and wildlife medicine* 44:70–78
19. Cottrell, WO; Keel, MK; Brooks, JW; Mead, DG; Phillips, JE. 2013. First report of clinical disease associated with canine distemper virus infection in a wild black bear (*Ursus americana*). *Journal of wildlife diseases*. 49:1024–7.
20. Craft ME., Hawthorne L., Packer C. 2008. Dynamics of a multihost pathogen in a carnivore community. *Journal of animal ecology*. 77: 1257–1264,
21. De la Rosa-Arana, J; Muñoz-García, C; Godínez-García, V; Villanueva-García, C; Gama-Campillo, L; Almanza-González, A; Rendón-Franco, E. 2016. Serological survey of anti- Salmonella antibodies in coatis (*Nasua narica*) and raccoons (*Procyon lotor*) in southeast Mexico. *Archivos médicos veterinarios* 48:283–288.

22. Elia, G; Camero, M; Losurdo, M; Lucente, MS; Larocca, V; Martella, V; Decaro, N; Buonavoglia, C; 2015. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *Journal of virological methods* 213:127–130.
23. Espinoza-García, CR; Martínez-Calderas, JM; Palacio-Núñez, J; Hernández-SaintMartín, AD. 2014. Distribución potencial del coatí (*Nasua narica*) en el noreste de México: implicaciones para su conservación. *Therya* 5:331–345.
24. Ezenwa, V; Roche, B; Bailly, X; Becquart, P; García, G; Hosseini, P; Keesing, F; 2015. Interdisciplinarity and infectious diseases: An ebola case study. *PLOS Pathogens* 11:8, e1004992
25. Flaiban, K; Spohr, KAH; Malanski, L; Svoboda, WK; Shiozawa, MM; Hilst, CLS; Aguiar, LM; Ludwig, G; Passos, FC; Navarro, IT; Balarin, MRS; Lisbôa, JAN. 2008. Hematologic values of free-ranging *Cebus cay* and *Cebus nigrinus* in Southern Brazil. *International journal of primatology* 29:1375–1382.
26. Francesco, CE; Francesco, Di; Martino, B; Speranza, R; Santori, D; Boari, A; Marsilio, F. 2012. Detection by hemi-nested reverse transcription polymerase chain reaction and genetic characterization of wild type strains of Canine distemper virus in suspected infected dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 24:107-15.
27. Frisk, A; Konig, M; Moritz, A; Baumgartner, W. 1999. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR Using Serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology* 37:3634–3643.
28. Gassen, U; Collins, F; Duprex, W; Rima B. 2000. Establishment of a Rescue System for Canine Distemper Virus. *Journal of virology*, 74:22, 10737–10744.
29. Gallardo-Romero, N. F; Aréchiga-Ceballos, N; Emerson, G. L; Martínez-Martínez, F.O; Doty, J. B; Nakazawa, Y. J; Rendon-Franco, E; Muñoz-García C.I.; Villanueva-García, C; Ramírez-Cid, C; Gama-Campillo, L.M; Gual-Sill, F; Aguilar-

- Setién, Á; Carroll D.S; Gama-Campillo, L. M. 2016. Endemic orthopoxvirus circulating in procyonids in Mexico. *Journal of wildlife diseases*, 52:3, 609-615.
30. García, J; García, F; Alda, J; González, M; Aramburu, Y; Cortés, B; Prieto, B; Pliego, M; Pérez, J; Herrera L; García-Román. 2011. Recent invasion and status of the raccoon (*Procyon lotor*) in Spain. *Biological invasions*, 14: 1305–1310.
31. Gowtage-Sequeira, S; Banyard, AC; Barrett, T; Buczkowski, H; Funk, SM; Cleaveland, S. 2009. Epidemiology, pathology, and genetic analysis of a canine distemper epidemic in Namibia. *Journal of wildlife diseases* 45:1008–1020.
32. Hashiguchi, T; Ose, T; Kubota, M; Maita, N; Kamishikiryo, J; Maenaka, K; Yanagi, Y. 2011. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nature structural & molecular biology. Biol.* 18:135–141.
33. Honer, O; Wachter, B; Goller, K; Hofer, H; Runyoro, V; Thierer, D; Fyumagwa, R; Muller, T; East, L. 2012. The impact of a pathogenic bacterium on a social carnivore population. *Journal of animale ecology*. 81: 36–46,
34. James, B; Corrie, C; Steven, P; Thomas, P; Jeremiah S; Salvatore R. 2004. Retrospective differentiation of canine distemper virus and phocine distemper virus in phocids. *Journal of wildlife diseases*. 40:1, 53–59.
35. Johannes, P; Langedijk, M; Jozef, J; Francesco, C; Origgi; Claes, O; Marc, V; Andreas, Z; Philippe, P. 2011. Canine distemper virus infects canine keratinocytes and immune cells by using overlapping and distinct regions located on one side of the attachment protein. *Journal of virology*. 85: 21, 11242–11254.
36. Józwik, A; Frymus, T. 2005. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Veterinary research communications*, 29:347–359.
37. Junged, RE; Gompperph, ED; Bauman, K; King M. 2007. A serologic assessment of exposure to viral pathogens and leptospira in an urban raccoon (*Procyon lotor*)

- population inhabiting a large zoological park. *Journal of zoo and wildlife medicine* 38:1, 18–26.
38. Kamps, AJ; Dubay, S; Langenberg, J; Maes, RK. 2015. Evaluation of trapper-collected nobuto filter-paper blood samples for distemper and parvovirus antibody detection in coyotes and raccoons. *Journal of wildlife diseases*, 51:3, 724-728.
39. Keller, SM; Gabriel, M; Terio, KA; Dubovi, EJ; Vanwormer, E; Sweitzer, R; Barret, R; Thompson, C; Purcell, K; Munson, L. 2012. Canine distemper in an isolated population of fishers (*Martes pennanti*) from California southern Sierra Nevada Mountains. *Journal of wildlife diseases* 48:1035–1041.
40. Kent, L; Tang-Martínez, Z. 2014. Evidence of individual odors and individual discrimination in the raccoon, *Procyon lotor*. *Journal of Mammalogy*, 95:6, 1254–1262.
41. Kouji, S; Noriyo, N; Yasushi, A; Fumio, S; Yuriko, S; Naoko, I; Tadaki, S; Shuetsu, F; Tetsuya, M; Tomoki, Y; Noriyuki, O; Ichiro, K; Katsuhiko, K; Ryoji, Y; Hideki, H; Masayuki, S; Makoto, T; Shigeru, M. 2008. Lethal canine distemper virus outbreak in cynomolgus monkeys in Japan. *Journal of virology*. 87:2, 1105–1114.
42. Kaufmann, J; Lanning, D; Poole, S. 1976. Current status and distribution of the coatí in the United States. *Journal of mammalogy*, 57:4, 621-637.
43. Lamb, RA; Kolakofsky, CP. 2003. *Paramyxoviridae: The viruses and their replication* in fields virology, National Center for Infectious Diseases, Atlanta, USA.
44. Latimer, K; Mahaffey, E; Prasse, K. 2005. Eritrocitos, Leucocitos en patología clínica veterinaria. Barcelona, España.
45. Ludes, E; Dupke, C; Harder, T; Baumgärtner, W; Haas, L; Teilmann, J; Dietz, R; Jensen L; Siebert U. 2016. Phocine distemper virus (PDV) seroprevalence as predictor for future outbreaks in harbour seals. *Veterinary microbiology*, 183:43–49.

46. Ludlow, M; Rennick, L; Nambulli S, Swart R; Duprex P. 2014. Using the ferret model to study morbillivirus entry, spread, transmission and cross-species infection *Current Opinion in Virology*, 4:15–23.
47. Weiss, D; Wardrop, J. 2010. Monocytes and macrophages and their disorders in veterinary hematology. Iowa, USA.
48. Li, W; Li, T; Liu, Y; Gao, Y. 2014. Genetic characterization of an isolate of canine distemper virus from a Tibetan Mastiff in China. *Virus Genes*. 49:1, 45-57.
49. Luo, H; Li, K; Zhang, H; 2017. Epidemiology of canine distemper and canine parvovirus in pet dogs in Wenzhou China. *Indian journal of animal research* 51:159–161.
50. Malzoni, F; Domingues, J; Correa, K; Coelho, C; Cruz, P; Yumi, C; Almeida, A; Oliveira, G; Silveira, P; Sollmann, R; Mundim, N; Ferreira, J. 2013. Serosurvey for selected viral infections in free-ranging jaguars (*Panthera onca*) and domestic carnivores in Brazilian cerrado, pantanal, and Amazon. *Journal of Wildlife Diseases*, 49:3, 510–521.
51. Martínez, H.F; Rendon, F.E; Gama, C.L; Villanueva, G.C; Romero, V.M; Maravilla, P; Alejandre, A.R; Rivas, N; Córdoba, A.A; Muñoz, G.C.I; Villalobos, G. 2014. Follow up of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in two mammal species, *Nasua narica* and *Procyon lotor* (Carnivora: Procyonidae): evidence of infection control? *Parasites & vectors*. 7:405
52. Marcacci, M; Ancora, M; Mangone, I; Teodori, L; Di Sabatino, D; De Massis, F; Camma, C; Savini, G; Lorusso, A. 2014. Whole genome sequence analysis of the arctic-lineage strain responsible for distemper in Italian wolves and dogs through a fast and robust next generation sequencing protocol. *Journal of virological methods* 202:64–68.
53. Mehrkens, L; Shender, L; Yabsley, L; Shock, B; Chinchilla, F; Suarez, J; Gilardi, K. 2013. White-nosed coatí (*Nasua narica*) are a potential reservoir of *trypanosoma*

cruzi and other potentially zoonotic pathogens in Monteverde, Costa Rica. *Journal of wildlife diseases*, 49:4, 1014–1018.

54. Mena, H. 2007. Presencia de *Leptospira* spp. y moquillo canino en poblaciones de perros y carnívoros silvestres en la Isla Cozumel. Tesis M. en C., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
55. Mcfadden, KW; Wade, SE; Dubovi, EJ; Gompper, ME; 2005. A serological and fecal parasitologic survey of the critically endangered pygmy raccoon (*Procyon pygmaeus*). *Journal of wildlife diseases* 41:615–617.
56. Meli, ML; Simmler, P; Cattori, V; Martínez, F; Vargas, A; Palomares, F; López-Bao, JV; Simón, MA; López, G; León-Vizcaino, L; Hofmann-Lehmann, R; Lutz, H. 2010. Importance of canine distemper virus (VDC) infection in free-ranging Iberian lynxes (*Lynx pardinus*). *Veterinary microbiology* 146:132–137.
57. Moss, WJ; Griffin, DE. 2006. Global measles elimination. *Nature Reviews microbiology*. 4:12, 900-8.
58. Noon, T; Heffelfinger, J; Olding, R; Lynn, S; Reggiardo, G, 2003. Serologic survey for antibodies to canine distemper virus in Collared Peccary (*Tayassu tajacu*) populations in Arizona. *Journal of wildlife Diseases*, 39;1, 221–223.
59. Nielsen, L; Søgaard, M; Jensen, T; Andersen, M; Aasted, B; Blixenkronemøller, M. 2017. Lymphotropism and host responses during acute wild-type canine distemper virus infections in a highly susceptible natural host. *Journal of general virology*, 90: 2157–2165.
60. Noyce, RS; Delpeut, S; Richardson, CD. 2013. Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, 436:1, 210-220.

61. Pan, Y; Liu, X, Meng, L, Zhu, G; Xia, Y; Chen, J; Yoshikawa, T. 2013. Pathogenesis of demyelinating encephalopathy in dogs with spontaneous acute canine distemper. *Journal of Integrative Agriculture*. 12:2, 334-343.
62. Peper, ST; Peper, RL; Mitcheltree, DH; George, V; Brooks, RP; Stevens, SS; Serfass, TL. 2015. Low titers of canine distemper virus antibody in wild fishers (*Martes pennanti*) in the eastern usa low titers of canine distemper virus antibody in wild fishers, *Journal of wildlife diseases*, 52:1, 150-3.
63. Perpiñán, D; Ramis, A; Tomás, A; Carpintero, E; Bargalló, F. 2006. Outbreak of canine distemper in domestic ferrets (*Mustela putorius furo*). *The veterinary record*, 163:8,246-50.
64. Pope, JP; Miller, DL; Riley, MC; Anis, E; Wilkes, RP; 2016. Characterization of a novel canine distemper virus causing disease in wildlife. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 28:5,506-13
65. Rentería-Solís, Z; Forster, C; Aue, A; Ulrich, W; Gudrun, W; Matthias, J. 2014. Canine distemper outbreak in raccoons suggests pathogen interspecies transmission amongst alien and native carnivores in urban areas from Germany. *Veterinary microbiology*. 174: 50–59
66. Roelke, M; Munson, L; Packer, C; Kock, R; Cleaveland, S; Carpenter, M; O'Brien, S; Pospischil, A; Hofmann, R; Lutz, H; Mwamengele, L; Mgasa, M; Machange, G; Summers, B; Appel, M. 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 1:379, 441-5.
67. Romanutti, C; Calderón, MG; Keller, L; Mattion, N; Torre, J. 2016. RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine Distemper Virus from domestic dogs. *Journal of virological methods* 228:79–83.
68. Roscoe E. 1993. Epizootiology of canine distemper in New Jersey raccoons. *Journal of wildlife diseases*, 29:3, 390-5.

69. Rovirosa-Hernández, M; García, F; Morales, J; Hernández, L; Hermiday, J; Lagunes, O. 2012. Hematological and blood chemistry values in a semi-free population of white-nosed coatís (*Nasua narica*) in la Venta Tabasco, México. *Acta zoológica mexicana*. 28:2, 391-400.
70. Sakai, K; Yoshikawa, T; Seki, F; Fukushi, S; Tahara, M; Nagata, N; Ami, Y; Mizutani, T; Kurane, I; Yamaguchi, R; Hasegawa, H; Saijo, M.; Komase, K; Morikawa, S; Takeda, M. 2013. Canine distemper virus associated with a lethal outbreak in monkeys readily adapted to use human receptors. *Journal of virology*, 87:7170–7175.
71. Se-Yeoun, C; Eun-Ju, K; Min, K; Sang-Ho, J; Hae-Beom, L; Hyung-Kwan J. 2012. Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. *One health*, 35: 497– 504.
72. Seimon, T; Miquelle, D; Chang, T; Newton, A; Korotkova, I; Ivanchuk, G; Lyubchenko, E; Tupikov, A; Slabe, E; McAloose, D. 2013. Canine distemper virus: an emerging disease in wild endangered Amur tigers (*Panthera tigris altaica*). *MBio*. 13:4 10-13.
73. Sharon, L; Spelman, H; Yates, R; Montali, R. 2000. Canine distemper in terrestrial carnivores: A review. *Journal of zoo and wildlife medicine*, 31:4, 441–451.
74. Schobesberger, M; Summerfield, A; Doherr, M; Zurbriggen, A; Griot, C. 2005. Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary Immunology and immunopathology*, 104:33–44
75. Sekulin, K; Hafner-Marx, A; Kolodziejek, J; Janik, D; Schmidt, P; Nowotny, N. 2011. Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino acid exchange in the haemagglutinin protein. *Veterinary journal* 187:399–401.
76. Simon-Martínez, J; Ulloa-Arvizu, R; Soriano, VE; Fajardo, R. 2008. Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *The veterinary journal*., 175 423–426.

77. Sintes, J; Engel, P. 2010. SLAM (CD150) is a multitasking immunoreceptor: from cosignalling to bacterial recognition. *Immunology and cell biology*. 89:161-163.
78. Stein, V; Schreiner, N; Moore, P; Vandeveld, M; Zurbriggen, A; Tipold, A. 2008. Immunophenotypical characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology* 131:237–246
79. Swati, D; Deka, S; Uppal, R. 2015. Isolation and phylogenetic characterization of canine distemper virus from India. *Indian virological society*, 26:3, 133–140.
80. Suzuki, J; Nishio, Y; Kameo, Y; Terada, Y; Kuwata, R; Shimoda, H; Suzuki, K; Maeda, K; 2015. Canine distemper virus infection among wildlife before and after the epidemic. *Journal of veterinary medical science*, 77:1457–1463.
81. Takayama, I; Kubo, M; Takenaka, A; Fujita, K; Sugiyama, T; Arai, T; Yoneda, M; Sato, H; Yanai, T; Kai, C. 2009. Pathological and phylogenetic features of prevalent canine distemper viruses in wild masked palm civets in Japan. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*. 32:6, 53-94.
82. Takenaka, A; Yoneda, M; Seki, T; Uema, M; Kooriyama, T; Nishi, T; Fujita, K; Miura, R; Tsukiyama-Kohara, K; Sato, H; Kai, C; 2014. Characterization of two recent Japanese field isolates of canine distemper virus and examination of the avirulent strain utility as an attenuated vaccine. *Veterinary microbiology* 174:372–381.
83. Valenzuela, D. 2008. Natural history of the white-nosed coati , *nasua narica* , in a tropical dry forest of western Mexico. *Revista mexicana de mastozoología* 3: 26-44.
84. Vandeveld, M; Zipperle, L; Langedijk, JPM; Claes, O; Zurbriggen, A; Plattet, P; 2010. Identification of Key Residues in Virulent Canine Distemper Virus Hemagglutinin That Control CD150 / SLAM-Binding Activity. *Journal of virology*, 84:9618–9624.

85. Vandeveld, M; Langedijk, JPM; Janda, J; Origi, FC; Claes, O; Zurbriggen, A; Plattet, P. 2011. Canine distemper virus infects canine keratinocytes and immune cells by using overlapping and distinct regions located on one side of the attachment protein. *Journal of virology*, 85:11242–11254.
86. Vargas, D; Bonet, R; Oliva, P; Campano S. 2004. Implementación de la técnica de PCR en la identificación de *Babesia ssp* en equinos. *Parasitología latinoamericana* 59: 179 - 182
87. Viana, M; Cleaveland, S; Matthiopoulos, J; Halliday, J; Packer, C; Craft, ME. 2015. Dynamics of a morbillivirus at the domestic – wildlife interface: Canine distemper virus in domestic dogs and lions. *Proceedings of the national academy of sciences* 112:5 1464–1469.
88. Messling, V; Zimmer, G; Haas, L; Catteno, R. 2001. The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. *Journal of virology*. 75, 6418-6427.
89. Messling, V; Milosevic, D; Devaux; Catteno, R. 2004. Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *Journal of virology*. 78, 7894-7903.
90. Welter, J; Taylor, J; Tartaglia, J; Paoletti, E; Stephensen, C. 2002. Vaccination against canine distemper virus infection in infant ferrets with and without maternal antibody protection, using recombinant attenuated poxvirus vaccines. *Journal of virology* 74:6358–6367.
91. Warren, B; Erich, H; Donald, G; Martin, D; Matthew A.. 2001. Rabies and canine distemper in an arctic fox population in Alaska. *Journal of Wildlife Diseases*. 37:1,133–137.
92. Wirz, A; Truppa, V; Riviello, M. 2008. Hematological and plasma biochemical values for captive tufted capuchin monkeys (*Cebus apella*). *American journal of primatology*. 70: 463-472.

93. Yanagi, Y; Takeda, M; Ohno, S; (2006). Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *Journal General Virol*, 87, 2767–2779.

Páginas web:

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Consultado 20-11-2016 en <http://www.inegi.org.mx>

11 Anexos

Anexo 1 Seroneutralización

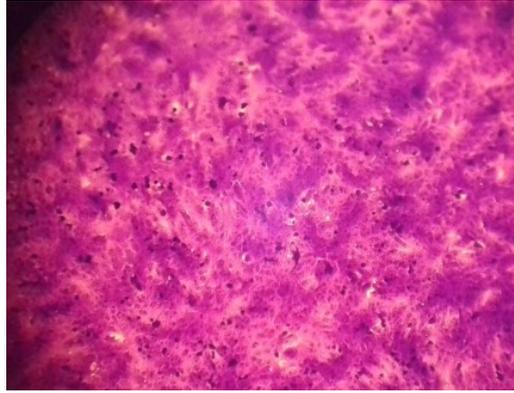


Figura 1. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB sin inóculo de VDC ni suero problema (Control negativo) y teñidas con Cristal Violeta.

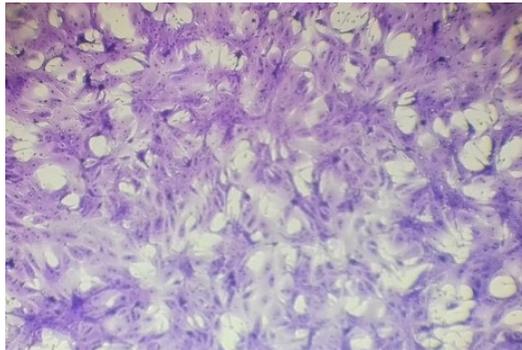


Figura 2. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB con inóculo de VDC cepa Onderspoort (Control positivo) y teñidas con Cristal Violeta.

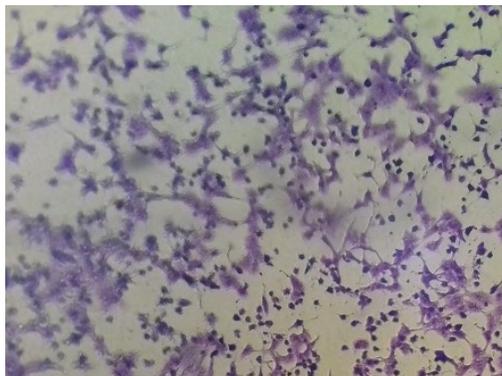


Figura 3. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB con suero problema en diluciones menores a 1:100 exhibiendo efecto citotóxico de sueros problema y teñidas con Cristal Violeta.

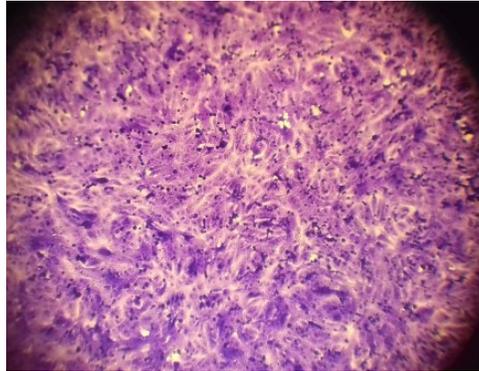


Figura 4. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB con suero problema en diluciones mayores a 1:100 sin efecto citotóxico de sueros problema y teñidas con Cristal Violeta.

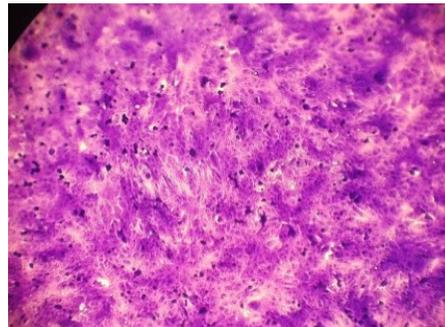


Figura 5. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB con suero problema positivos a anticuerpos neutralizantes con título de 1:100 y teñidas con Cristal Violeta.

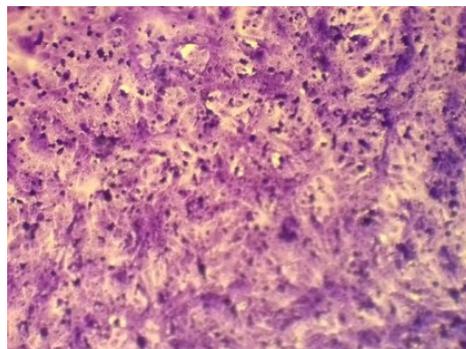


Figura 6. Foto de células Vero incubadas 72 horas con MEM 2%SFB con suero problema positivos a anticuerpos neutralizantes con título de 1:1000 y teñidas con Cristal Violeta

Anexo 2

Extracción de RNA

A partir del cultivo celular con la cepa Onderspoort y de encéfalo de perro (controles positivos) se pudo obtener RNA (figura 7) para los controles positivos y negativos, de igual manera se obtuvo RNA de glóbulos blancos a partir de sangre completa de coatíes y mapaches.

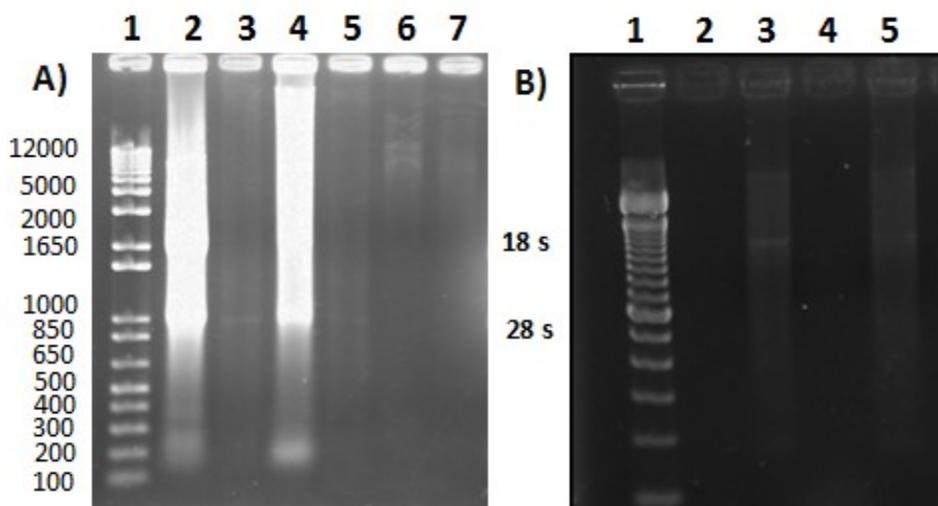


Figura 7.

Fotografías de geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observa la extracción de RNA total a partir de cerebro de perro, cultivo celular y globulos blancos de sangre completa de coatíes y mapaches. A) En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder y en los carriles 2 y 4 las bandas 18s y 28s de la extracción a partir del cerebro de perro, carriles 3 y 5 corresponden a RNA de mapaches y carriles 6 y 7 a RNA de globulos blancos de coatíes. B) En el carril 1 se encuentra el marcado de peso molecular 1 kb plus ladder, carril 3 extracción a partir de cultivo celular infectado por VDC cepa Onderspoort y en el carril 5 se encuentra la extracción del control negativo correspondiente a cultivo celular sin infectar.

Transcriptasa reversa

El ARN obtenido de las diferentes muestras se cuantifico como se muestra en el cuadro 1 para poder realizar la transcriptasa reversa

	Cerebro de perro (Control positivo)	Cultivo celular infectado con VDC (Control positivo)	Cultivo celular Sin infectar (Control negativo)	Coatíes	Mapaches
Cuantificación ng/μl	1760	750-996	717-879	20-145	26-236
Relación $A_{260/280nm}$	1.8	1.7	1.8	1.6	1.6
Microlitros μl	30	20	20	8	7

Cuadro 1.

Se muestra la cuantificación, relación $A_{260/280nm}$ y la cantidad de μl de ARN suspendido en agua de diferentes muestras y controles que se usaron en la PCR.

Se realizó la transcripción reversa de todas las muestras y controles a partir de $1\mu g$ de RNA o lo más cercano a esa cantidad (figura 8).

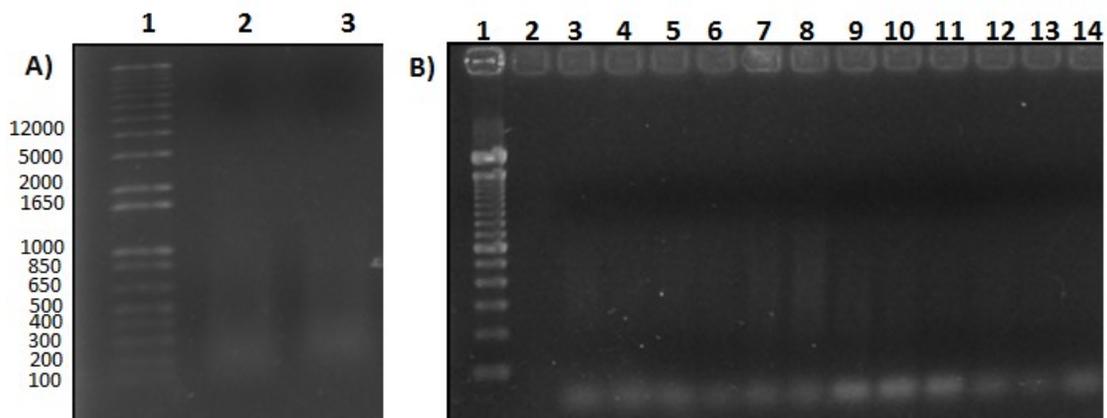


Figura 8.

Fotografías de geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observa un barrido correspondiente al ADNc. A) En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, en el carril 2 ADNc correspondiente al cerebro de perro y carril 3 al ADNc del cultivo celular (control positivo). B) Se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, del carril 3-8 ADNc de coatíes de verano 2016 y del carril 9-14 ADNc de mapaches verano 2016.

Reacción en cadena de la polimerasa

Se amplificó la secuencia correspondiente a la región de la hemaglutinina del VDC con los iniciadores previamente alineados *in silico* como se muestra en la figura 9, donde se utilizó la herramienta BLAST-Primer del sitio NCBI donde se aprecia la alineación específica para la región del gen H del VDC.

Primer pair 1

	Sequence (5'>3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAAGACAAGGTGGGTGCCT	19	59.85	57.89	3.00	0.00
Reverse primer	CTTGGTCAAATCGAACTCCA	20	55.69	45.00	4.00	2.00

Products on target templates

>NC_001921.1 Canine distemper virus, complete genome

product length = 175

Forward primer: 1 CAAGACAAGGTGGGTGCCT 19
Template: 7091 7109

Reverse primer: 1 CTTGGTCAAATCGAACTCCA 20
Template: 7265 7246

Figura 9. Alineamiento *in silico* de los iniciadores.

El amplificado que se observa en la figura 11 muestra un fragmento de 175pb específico para una parte de la hemagutina de VDC el cual proviene de los controles positivos (cerebro de perro y cultivo celular infectado con VDC) y control negativo de cultivo celular. En la figura 10 se aprecia un amplificado de 756pb correspondiente a una parte de la nucleoproteína, en esta imagen se aprecian bandas inespecíficas.

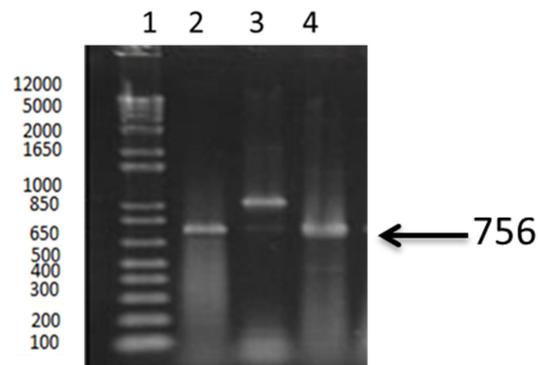


Figura 10.

Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de RT-PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2-4 productos de 756pb amplificados a partir de ARN de cerebro de perro infectado con VDC.

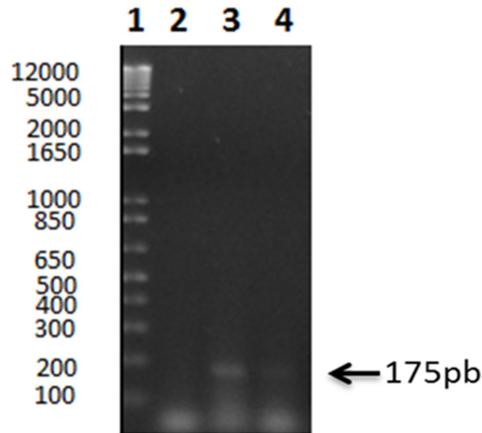


Figura 11.

Fotografía de un gel de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de RT-PCR. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2 control negativo, carril 3 y 4 producto de 175pb amplificado a partir de ARN de cerebro de perro infectado con VDC y células Vero infectadas con VDC cepa Onderspoort, respectivamente.

Ensayo con enzima de restricción para comprobar el fragmento amplificado

Se corrobora que el producto amplificado fuera el deseado mediante la digestión del mismo con la enzima *AluI*.

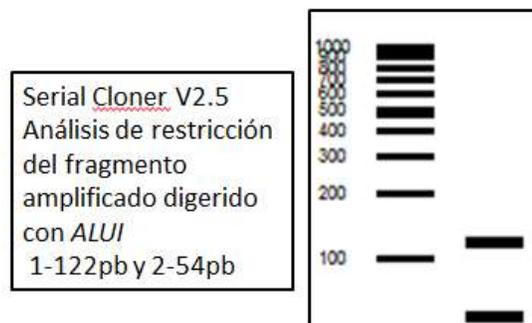


Figura 12.

Muestra el ensayo *in silico* de la digestión del fragmento de 175pb por la enzima *AluI*.

En la figura 13 se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observan el producto de la digestión que arroja fragmentos con una longitud de 122pb y 54pb, para el caso del segundo fragmento no fue posible visualizarlo debido a su reducida concentración.

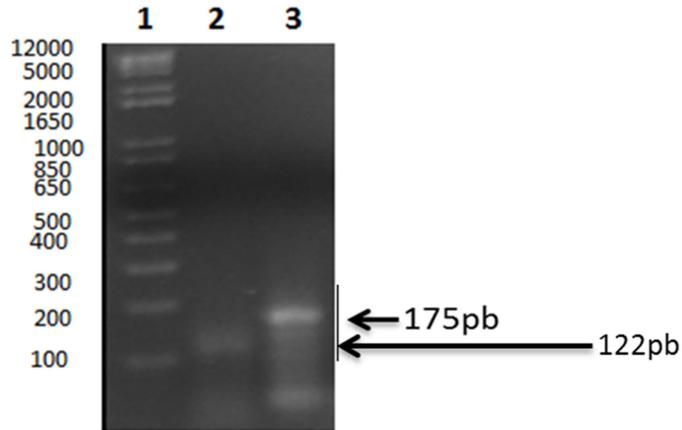


Figura 13.

Fotografía de un gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de RT-PCR y la digestión por la enzima *AfuI* del fragmento amplificado. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2 producto digerido de 122pb, carril 3 producto de 175pb sin digerir

Ensayo de concentración mínima detectable

En la figura 14, se observan dos gels con productos de la PCR con distintas concentraciones de ADNc. Se aprecia que después de la concentración de 30fg ya no es detectable la banda por este método.

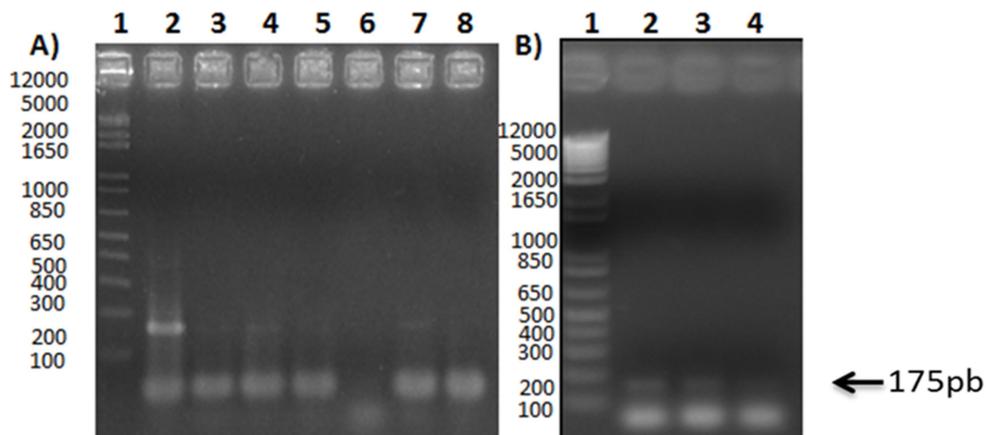


Figura 14.

Fotografía de dos gels de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio donde se observan los productos de PCR obtenidos de diferentes diluciones de ADNc. A) Carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb plus DNA Ladder, carril 2-5 productos de la PCR en las siguientes concentraciones 3ng, 300fg, 30fg y 3fg, carril 7 control positivo y carril 8 control negativo B) Repetición del ensayo, carril 1 Marcador de peso molecular, carril 2-4 concentraciones 3ng, 300fg y 30fg respectivamente.