UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS

***DISTEMPER CANINO*: ESTUDIO RETROSPECTIVO DE PREVALENCIA (2015–2017) EN PACIENTES ATENDIDOS EN EL HOSPITAL VETERINARIO DE PEQUEÑAS ESPECIES DEL IICV-UABC.**

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

RICARDO MARTINEZ AYALA

DIRECTOR DE TESIS

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO **OCTUBRE DE 2018**

***Distemper canino*: estudio retrospectivo de prevalencia (2015–2017) en pacientes atendidos en el hospital veterinario de pequeñas especies del IICV-UABC.** Tesis presentada por Ricardo Marinez Ayala, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

DR. GILBERTO LÓPEZ VALENCIA
DIRECTOR DE TESIS

DR. FRANCISCO JAVIER MONGE NAVARRO
CO-DIRECTOR

M.MVZ. ISSA CAROLINA GARCIA REYNOSO
ASESOR

M.C. CÉSAR AUGUSTO FLORES DUEÑAS
ASESOR

DR. LUIS TINOCO GRACIA
ASESOR

Mexicali. Baja California. México. Octubre 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gilberto López Valencia por la oportunidad, confianza, amistad y conocimientos que me ofreció para dar este importante paso en mi formación acádemica, pero sobre todo permitirme caminar a su lado. Por todos esos consejos y algunos regaños que me ayudaron a crecer como profesionista y persona. Muchas gracias.

Al Dr. Francisco Javier Monge Navarro por apoyarme en la realización de este trabajo, asesorarme y despejar las dudas surgidas durante el mismo.

Al Dr. Luis Tinoco Gracia por brindarme su apoyo para la realización de este trabajo.

A la M en MVZ. Issa Carolina Garcia Reynoso por compartir todos sus conocimientos conmigo, darme su apoyo incondicional, ofrecerme consejos, darme toda su confianza y permitirme aprender a su lado, pero sobre todo por su amistad, muchas gracias.

Al M.C C ésar Augusto Flores Dueñas por permitirme trabajar en el área en el cùal esta encargado y darme acceso a todos los datos requeridos para esta investigación, asi como si amistad.

A todos los profesores con los que tuve la oportunidad de trabajar y aprender, sin los cuales no habria podido llegar aqui.

A la Universidad por el permitirme formarme académicamente en sus instalaciones.

A todos mis amigos y conocidos por su amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres Agustin y Rosa por darme la vida, por apoyarme y permitirme dejarlos atrás para cumplir todos mis sueños, por hacer de mis metas las suyas, hacerme la persona que soy y siempre confiar en mi. Mil gracias.

A mis hermanos Christopher, Dario y Rosa por todos esos momentos que pasamos juntos, por su apoyo incondicional y permitirme tener a los mejores hermanos.

LISTA DE CONTENIDO

II. Introducción…….....1

III. Justificación……..…..…4

IV. Revisión de literatura……..... .5

Virus de Distemper canino…….……....5

Características estructurales del virus…….…….….5

Linajes del virus de Distemper canino……...8

Características ambientales del virus……9

Replicación……. .10

Factores de riesgo…….……..…12

Formas de transmisión……..……....15

Patogénesis……..…15

Formas de presentación……..……..17

Forma aguda…….……..17

Forma subaguda……..……...17

Forma Crónica……..…...18

Detección clínica……...…..19

Biometría hemática……...…..19

Prueba de serología……..….20

Biopsia de piel…….…..…..21

Prueba de inmunofluorescencia…….…….…21

Evaluación de líquido cefalorraquídeo…….…….…..21

Histopatología……..22

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)……..……..22

Vacunación……..23

Vacunas vivas modificadas……...25

Vacunas de virus muerto……...25

Vacunas recombinantes……..…26

Vacunas heterotrópicas contra sarampión……26

Programa de vacunación…….……..26

Interacción inmunológica……...27
V. Objetivo general y especificos……..28
VI. Material y métodos…….....…29
Localización del área del estudio……..29
Diseño y duración del estudio…….……..……....29
Base de datos……..…29
Confirmación de moquillo canino por PCR en tiempo real……...30
Extracción del ARN…….30
Oligonucleótidos…….……..30
Reconstitución de oligonucleótidos…….31
Protocolo de prueba RT-PCR para moquillo canino…….32
Interpretación de resultados……...……..32
Análisis estadísticos…….…….....33
VII. Resultados……34
VIII. Discusión……..…44
IX. Conclusiones……...49
X. Literatura consultada……..……..…..50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estructura del virus del moquillo canino……..……..……... ...6

Figura 2: Proceso de replicación viral del Morbillivirus……...…11

Figura 3: Conjuntivitis y secreción nasal de un paciente con moquillo canino……..…….....……16

Figura 4: Hiperqueratosis nasal, signo característico de la infección de moquillo canino……..18

Figura 5: Presencia de cuerpos de inclusión en eritrocitos y leucocitos caninos…….……..20

Figura 6: Número de casos positivos y sospechosos registrados por cuadrantes en la ciudad de Mexicali…….....39

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Cepas y linajes del virus de moquillo canino……..….9

Cuadro 2: Secuencias y características de los oligonuceotidos diseñados a partir del gen de la *NP*. ……31

Cuadro 3: Concentracción de reactivos para la estandarización……..32

Cuadro 4: Prevalencia de casos de moquillo canino en pacientes atendidos en el HVPE-IICV de 205 a 2017 dependiendo de su clasificación diagnóstica……34

Cuadro 5: Magnitud de asociación de casos positivos a moquillo canino entre los diferentes años. ……..35

Cuadro 6: Magnitud de asociación entre factores de riesgo y la enfermedad……37

Cuadro 7: Magnitud de asociación entre las razas de perros y la enfermedad……38

Cuadro 8: Resultados de la alineación……..…43

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1: Comportamiento mensual de los casos positivos a moquillo en los años de estudio…….35

Gráfica 2: Comportamiento mensual de los casos positivos y sospechosos a distemper en los años de estudio…….….36

Gráfica 3: Razas afectadas por distemper durante el periodo (2015-2017)……...36

Gráfica 4: Signos presentes en los perros positivos y sospechosos durante el periodo (2015-2017)…….40

Gráfica 5: Curvas de disociación en la estandarización del RT-PCR para moquillo canino apartir de muestras de capa flojistica de sangre de perros…..41

Gráfica 6: Curva estándar en diluciones seriadas con factor logarítmico para la estandarización del sistema de RT-PCR para moquillo canino……..…….42

I. RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico retrospectivo de prevalencia durante los años 2015, 2016 y 2017. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de Moquillo canino en el hospìtal veterinario de pequeñas especies (HVPE) del IICV-UABC, así como identificar los factores de riesgo asociados a la presencia de la enfermedad. Adicionalmente, se realizó la estandarización de una prueba de reaccion en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-time RT-PCR) para la detección genómica de la nucleocápside viral. Durante el periodo estudiado se analizaron un total de 1357 expedientes de pacientes atendidos en el HVPE detectando una prevalencia general de 1.8% (25/1357). Las prevalencias para 2015, 2016 y 2017 fueron de 0.2%, 3.8% y 1.3% respectivamente. Se observaron 19% más casos en 2016 en compraración con el 2015, mientras que no se observó diferencia estadísticamente significativa en el número de casos del 2017 con respecto al 2015. Con respecto a los factores de riesgo, los perros <1 año presentaron 3.5 (OR= 3.5; IC 1.5-8.1; $p<0.05$) veces más probabilidades de ser detectados con distemper en comparación con los >1 año. La raza labradora se afectado mas (OR=12; IC95% 1.4-99.6; $p<0.05$) en comparación con la raza schnauzer. Factores tales como época del año, vacunación, sexo y talla no fueron estadísticamente significativos. El 58% del total de los signos clinicos presentados por los perros con moquillo fueron: secresión nasal, diarrea, anorexia, vómito y depresión. Adicionalmente se estandarizó un sistema RT-PCR para el diagnóstico de moquillo canino donde fue posible detectar casos mismos que fueron enviados a secuenciación mostraron una similitud del 96% para el gen de la nucleocápside, demostrando la presencia del virus en los pacientes analizados por esta tecnica.

PALABRAS CLAVE: Virus del distemper canino, factor de riesgo, prevalencia, diagnostico.

SUMMARY

A retrospective epidemiological study of prevalence was carried out during the years 2015, 2016 and 2017. The objective of this work was to determine the prevalence of canine distemper in the veterinary hospital of small species (HVPE) of the IICV-UABC, as well as to identify the risk factors associated with the presence of the disease. Additionally, the standardization of a polymerase chain reaction test in real time (Real-time RT-PCR) for the genomic detection of the viral nucleocapsid was performed. During the period studied, a total of 1357 records of patients seen in HVPE were analyzed, detecting a general prevalence of 1.8% (25/1357). The prevalences for 2015, 2016 and 2017 were 0.2%, 3.8% and 1.3% respectively. There were 19% more cases in 2016 compared to 2015, while no statistically significant difference was observed in the number of cases in 2017 with respect to 2015. With regard to risk factors, dogs <1 year had 3.5 (OR = 3.5, CI 1.5-8.1, $p < 0.05$) times more likely to be detected with distemper compared to> 1 year. The Labrador race was more affected (OR = 12, 95% CI 1.4-99.6, $p < 0.05$) compared to the Schnauzer race. Factors such as time of year, vaccination, sex and height were not statistically significant. The 58% of the total clinical signs presented by dogs with distemper were: nasal discharge, diarrhea, anorexia, vomiting and depression. Additionally, an RT-PCR system was standardized for the diagnosis of canine distemper where it was possible to detect cases that were sent to sequencing showed a similarity of 96% for the nucleocapsid gene, demonstrating the presence of the virus in patients analyzed by this technique.

KEY WORDS: Canine distemper virus, risk factor, prevalence, diagnosis.

II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas que afectan a la población canina son de gran importancia en la práctica clínica diaria, esto, por la frecuencia en la que se presentan y por la severidad de los cuadros clínicos que producen (Budaszewski, 2016). Una de las enfermedades más comunes y de mayor importancia a nivel global es el *Distemper canino* o *Moquillo canino*, enfermedad viral multisistémica altamente contagiosa que afecta a los perros y otros carnívoros de la familia *Canidae, Mustelidae*, *Procyonidae*, *Felidae*, *Ailuridae*, *Hyaenidae*, *Ursidae* y *Viverridae*, sin embargo, puede afectar a una amplia variedad de especies (Sarute, 2013; Wilkes, 2014). Esta enfermedad está caracterizada por alteraciones respiratorias, desórdenes gastrointestinales, alteraciones de la piel y del sistema nervioso central, además de una inmunosupresión causada por la replicación en linfonodulos (Lempp et al., 2014).

El Di*stemper* canino está causado por un virus ARN del género *Morbillivirus* y de la familia de los *Paraximovirus* (Espinal et al., 2014; Romanutti et al, 2015). Es una enfermedad viral altamente contagiosa, siendo una de las principales causas de muerte en caninos domésticos y otros carnívoros. En los últimos años, la incidencia parece haber aumentado, documentándose la aparición de nuevas cepas; las razones que explicarían estos cambios y los efectos en su epidemiología aún son desconocidas (Retamal, 2013).

La enfermedad se ha reportado en todo el mundo, como por ejemplo Japón (Susuki et al; 2015), Irán (Aviseh et al; 2017), Turquia (Gencey et al; 2004), España (Sobrino et al; 2010), Portugal (Santos et al; 2009), Brazil (Curi et al; 2016), Venezuela (Arlinton y graca; 2000), Chile (Jamett et al; 2015), EE. UU, China, Rusia, Colombia, Dinarmarca solo por mencionar algunos.

Por su parte, en México, son escasos los estudios epidemiológicos de prevalencia sobre la enfermedad, la mayoría de ellos han sido realizados por universidades en diferentes regiones del país. Guadalajara (Chagoya, 1992), Estado de México (Gamiz et al; 2012), (Martinez et al; 2008), Monterrey (Vallejo; 2014), Coahuila (Vidaña; 2016). Gámiz y colaboradores (2012) afirmarón que no existían suficintes estudios en el país.

Actualmente los médicos veterinarios en todas partes del mundo han reportado una mayor incidencia de casos de *Distemper canino,* entre las causan que se citan están la atenuación insuficiente de cepas vacunales, cepas más virulentas o la incorrecta administración y seguimiento del calendario de vacunación. Los médicos veterinarios colombianos reportaron un aumento de casos sin precedentes. Por ello Espinal et al (2014) también efectuó estudios epidemiológicos en el valle de Aburrá en el departamento de Antioquia, Colombia, descubriendo una nueva posible nueva cepa, bautizándola como “Sudamérica 3”. Riley y Wilkes, (2015) por su parte afirman que en un brote detectado en los estados de Carolina del sur, Tennessee y Kentucky se detectó un décimo linaje al que han bautizado como linaje Tennesse. Lo anterior demuestrá que no estamos ante un fenómeno aislado, sino contra una enfermedad de la que aùn desconocemos bastante.

La prueba de oro para el diagnóstico de la enfermedad es la serología, pero presenta serias desventajas tales como requerir un tiempo considerable de minimo 8 dias para poder detectar los anticuerpos, los cuales a su vez están influenciados por muchas variables, por ello el diagnóstico se hace complicado (Jeremiah y Lehenbauer, 2001; Gray et al, 2012; Labrini et al; 2017).

Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que las pruebas moleculares pueden detectar el material genético viral a partir del segundo dia despues de la infección y con una minima cantidad de muestra, por lo cual seria

un candidato a considera en el diagnostico de la enfermedad. Actualmente las pruebas de diagnóstico molecular permiten detectar varias de las proteínas estructurales del virus, la más importante de ellas es la proteína de la nucleocápside (*NP)* que muestra un alto grado de conservación entre las diferentes cepas (Donx et al, 2014; Rommanutti et al, 2017) Las pruebas moleculares suelen presentar buenos resultados aún en presencia de una baja carga viral dada su alta sensilidad y especificidad en comparación con pruebas convencionales (Burgos, 2009; Dios et al., 2004; Dong. X. Y et.al, 2014; Gizzi et al., 2014) lo que las convierte idóneas para el diagnóstico. Por lo anteriormente discutido el **objetivo de esta investigación fue realizar un estudio epidemiológico de prevalencia de Distemper canino de los pacientes atendidos durante los años (2015-2017) en el HVPE del IICV-UABC.**

III. JUSTIFICACIÓN

Considerando que el distemper canino es una enfermedad de distribución mundial, la cual presenta una alta morbilidad y mortalidad, costos elevados asociados a los tratamientos y riesgos para otros animales que convivan en el ambiente del animal infectado hacen necesario realizar estudios epidemiológicos con el fin de conocer las características que aun desconocemos de la enfermedad, su distribución por consiguiente desarrollar una estrategia adecuada para disminuir la presencia de nuevos casos.

Además, entre los médicos veterinarios de pequeñas especies de la ciudad de Mexicali, existe la sospecha de que en los últimos años se ha presentado un aparente incremento de casos de *Distemper canino.* Ellos argumentan que una posible explicación a este evento es que las mascotas no llevan un calendario de medicina preventiva apropiado o que exista la presencia de nuevas cepas virales con la capacidad para evadir las defensas del sistema inmunológico. Sin embargo, no existen cifras sobre la frecuencia y distribución de la presencia de la enfermedad en la región que nos permita asegurar que se esta presentando un incremento en los casos. Considerando que el HVPE del IICV cuenta con registros confiables de todos los pacientes atendido se propone realizar un estudio retrospectivo de prevalencia que nos permitan comprender el comportamiento de la enfermedad asi como los posibles factores de riesgo asociados. Es por ello que este trabajo plantea la elaboración de un estudio de prevalenia en el hospital de pequeñas especies del IICV-UABC de los últimos 3 años, asi como estudiar la relación de las principales variables de interés y la implementación de la estandarización de una prueba de Real time RT-PCR para dar una explicación parcial de la epidemiologia de la enfermedad y como primer paso para estudios mas complejos.

IV.REVISION DE LITERATURA

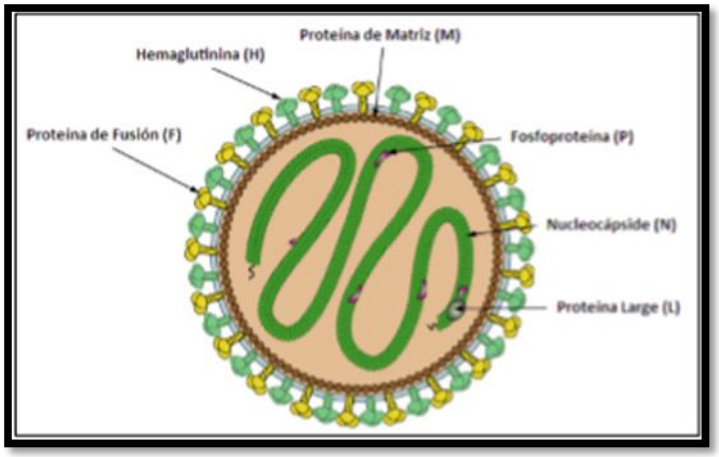
Virus del moquillo canino

La enfermedad de Distemper canino o moquillo canino es causada por el virus de Distemper canino, el cual causa una enfermedad sistémica, letal y altamente contagiosa con distribución a nivel mundial (Beineke et al., 2015). El virus infecta y produce enfermedad clínica en miembros del orden *Carnivorae* que incluye miembros de la familia *Canidae* (zorros, coyotes, lobos), *Mustelidae* (hurón, marta, visón, zorrillo, tejón), *Procyonidae* (mapache, coatí), *Felidae* (león, tigre, ocelote, jaguar), *Ailuridae* (panda rojo), *Hyaenidae* (hienas), *Ursidae* (Oso), *Herpestidae* (Mangosta, suricata) y *Viverridae* (Civeta, fosa). El virus causa enfermedad en los sistemas respiratorio, nervioso y digestivo (Sarute, 2013; Wilkes, 2014; Budaszewski, 2016; Riley y Wilkes, 2015).

Características estructurales del virus

Romanutti et al. (2015) afirma que el virus del Moquillo canino (VMC) es un miembro del género *Morbillivirus*, de la familia *Paramyxoviriridae*. Este virus es muy grande, midiendo de 150-250 nm. Los morbillivirus se caracterizan principalmente por causar enfermedades respiratorias, gastrointestinales moderadas a severas, urinarias, óseas, cutáneas y nerviosas, así, como una marcada inmunosupresión en sus huéspedes (Beineken et al., 2015; Budaszewski y messling 2016). Gómez y Guide (2010) mencionan que este virus afecta a perros domésticos, principalmente entre los 3 y 9 meses de edad, así como a una gran diversidad de especies animales. Este virus posee una cadena de ARN sencillo en sentido negativo de aproximadamente 15.7 kb, que codifica 8 proteínas virales: *Matriz (M), Fusión (F), Hemaglutinina (H), Nucleocápside (NP), Polimerasa (L), Fosfoproteína (P) y* las proteínas no estructurales *V y C* (Budaszewski, 2016).

Figura 1: Estructura del virus del moquillo canino.



Estructura del virus del Distemper canino: H (Hemaglutinina), F (proteína de fusión), M (proteína de matriz), E (Envoltura lipoproteinica), NP (nucleocápside), P (proteína de polimerasa) y L (proteína grande). *Tomado de Sarute et al., 2014.*

La proteína de matriz (*M)* juega un papel fundamental en el ensamblado de los *Paramixovirus,* dado que sirve como unión entre la nucleocápside y las glucoproteínas de la envoltura, se encarga de conectar las glicoproteínas de superficie y la nucleocápside durante la maduración viral (Tizzano, 2013; Yévenes, 2014).

Sarute et.al, (2014) Las proteínas *F* y *H* son las glucoproteínas responsables de la entrada y la fusión del virus en las membranas celulares. La glucoproteína H es importante en la infección porque determina el tropismo viral (Espinal et.al, 2014) y su variabilidad antigénica puede afectar el rango de huéspedes, virulencia y mecanismos de neutralización (Ke et al., 2015). Estas glicoproteínas son más variables que otras proteínas y presentan los principales determinantes antigénicos que inducen respuestas inmunes protectoras contra el virus. Dichas características han hecho que sean las glucoproteínas adecuadas para el estudio de la diversidad genética y antigénica de la enfermedad (Romanutti et al., 2015).

Castilho et.al, (2007) La nucleoproteína *NP* es la proteína viral más abundante y es la principal nucleoproteína reguladora de la replicación viral y la transcripción. Por lo tanto, la *NP* es altamente inmunogénica a pesar de su ubicación interna, dicha proteína forma la base de la mayoría de los ensayos de diagnóstico para VMC. Los anticuerpos contra esta proteína aparecen en estadios clínicos tempranos de la infección (Li Yi et.al, 2016).

Cheng, (2015) comenta que la proteína fosforilada *P* es vital para la replicación del virus, ya que está involucrada en todos los aspectos del ciclo viral. Unida a la proteína *L,* integra el complejo de polimerasa, encargado de la síntesis de ARN. La proteína *L* se asocia al ARN a través de la interacción con la proteína *P*, quien actúa como enlace para formar el complejo de transcripción (Tizzano, 2013, Yévenes, 2014).

Zhao, (2015) La naturaleza del genoma del VMC ocasiona altas tasas de mutación, lo cual implica una amplia variación genética, las proteínas *H* se unen a la molécula de activación de señalización linfocitaria (*CD150 Slam*) con lo cual se facilita la entrada y fusión del virus a las células del hospedero (Panzera, 2015; Sawatsky, 2012; Carvalho et al., 2012).

La nectina-4 es una proteína que se expresa en las neuronas y representa un receptor vital para la interacción del virus de Distemper canino con dichas células, esta interacción causa la inmunoreactivación neuronal con el subsecuente daño. Aunque dicha proteína no se ha estudiado lo bastante, se ha demostrado su presencia en pacientes con la forma crónica de la enfermedad por lo que su papel en el proceso inmunomediado ha demostrado su importancia en los últimos años (Di guardo et. al, 2016).

Aunque solo se ha identificado un serotipo del virus, se han detectado diferencias en cuanto a la patogenicidad de las diferentes cepas aisladas. Se han descrito las cepas *Snyder hill*, *A75-17, Convac* y *R252* (Gómez y Guide,

2010). 164,071, 01-2681, 5804P, Arg23, UY102, 19876, 18133, 21261, HL, W729B, GS0812-4, HeB(07)1, Th12, TW-KM2, 007Lm-1vp, M25CR, 011C, 50Con, Arg24, Arg25, Arg26, Edmonston-Zagred (Vallejo, 2014; Yeven és, 2014). Romanutti et al., (2015) reporta además la existencia de la cepa *Onderstepoort* para la cual está desarrollada la mayoría de las vacunas, además de la cepa *Lederle* y *Rockborn*. Ludlow et al., (2012) por su parte afirma que la infección en los perros con cepas de tipo salvaje como *Ohio R252* y *A75/17* da como resultado una encefalitis desmielinizante focal a largo plazo, en contrastes con la cepa *Snyder hill* que produce una encefalitis rápida, aguda y fatal. Aún se desconocen los factores que determinan las diferencias de virulencia en el sistema nervioso central. Pinotti et al., (2009) reporta la cepa *007Lm* que se aisló en Japón de un canino con enfermedad grave.

Linajes del virus del moquillo canino

Los linajes de VMC circulantes en el mundo se han descrito en base al análisis de la proteína hemaglutinina, esto debido a que posee un alto grado de heterogeneidad genética, permitiendo hasta la fecha, clasificar la mayoría de las cepas de campo en ocho linajes: África, América-1 (cepas vacunales), América-2, Asia-1, Asia-2, Europa-1, Europa-2 (Europe wild-life) y Europa-3 (Arctic). Sin embargo, nuevos estudios han detectado mayores variaciones en la secuencia aminoacídica de una región de la proteína de fusión (F) (Yévenes, 2014).

Un estudio desarrollado en Colombia detecto un noveno linaje bautizado como Sudamérica 3, basándose en estudios en base a la hemaglutinina (Espinal et al, 2014).

Riley y Wilkes, (2015) afirman que en un brote recientemente detectado en los estados de Carolina del sur, Tennessee y Kentucky se detectó un décimo linaje que ha sido bautizado como linaje Tennesse.

Cuadro 1: Cepas y linajes del virus de moquillo canino.

Cepa	Origen	Linaje
Onderstepoort	Vacuna/EE.UU	América 1
Snyder Hill	Vacuna/Canadá	América 1
Lederle	Vacuna/EE.UU	América 1
Rockborn	Vacuna/EE.UU	América 1
A75/17	Suiza	América 2
164071	EE.UU	América 2
01-2689	EE.UU	América 2
5804P	EE.UU	Europa 1
Arq23	Argentina	Europa 1
UY102	Uruguay	Europa 1
19876	EE.UU	Europa 2
18133	EE.UU	Europa 3
HL	China	Europa 3
21261	EE.UU	Europa 3
W729B	Japón	Asia 1
GS-0812-4	China	Asia 1
HeB(07)1	China	Asia 1
Th12	Tailandia	Asia 1
TW-KM2	Taiwán	Asia 1
007Lm	Japón	Asia 2
007Lm-1vp	Japón	Asia 2
M25CR	Japón	Asia 2
011C	Japón	Asia 2
50Con	Japón	Asia 2
Arg24	Argentina	Sudamérica
Arg25	Argentina	Sudamérica
Arg26	Argentina	Sudamérica
Edmonston-Zagred	Vacuna/EE.UU	----------

Modificado de Yevenés, 2014.

Características ambientales del virus

El VMC es bastante susceptible a la luz ultravioleta, aunque sus proteínas y antioxidantes ayudan a protegerlo de la inactivación. Sobrevive una hora a 37°C, 3 horas aproximadamente a temperatura ambiente de 20°C y por lo menos 20 minutos en exudados. Es extremadamente vulnerable al calor y la desecación, por lo que, en climas cálidos, se destruye entre 50 y 60°C durante

30 minutos. En climas tropicales el virus no se mantiene viable en las perreras después de ser eliminado por los perros infectados, mientras que en ambientes de 0°C a -40°C permanece viable durante semanas. En temperaturas de –70°c a -192°c (nitrógeno líquido) se mantiene activo durante varios años. En cuanto al pH, el virus solo es estable en ambientes de 4.5 a 9.0. Al ser un virus envuelto, es sensible al éter, cloroformo, soluciones diluidas de formalina al 0.5%, fenol al 0.75% y a los compuestos cuaternarios de amonio al 0.3% (Greene, 2008).

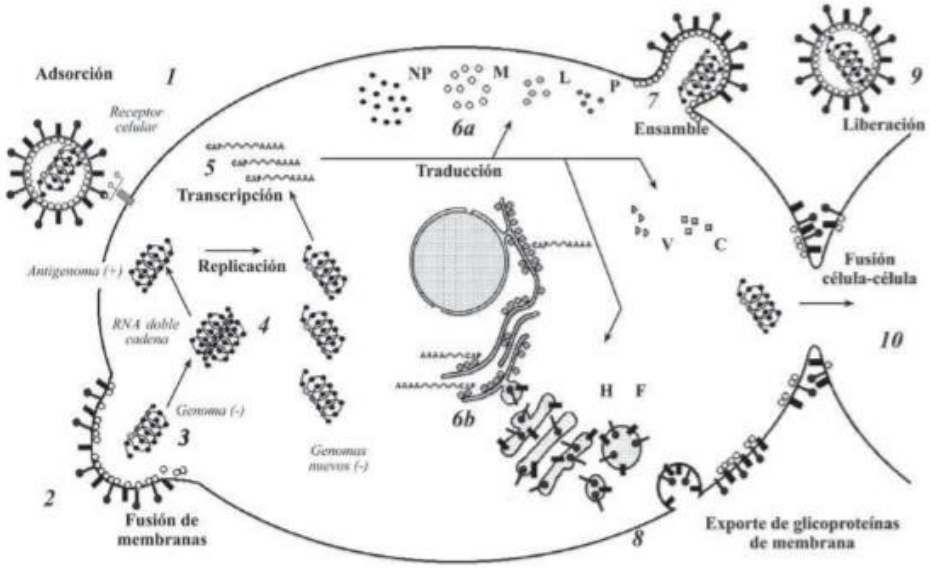
Replicación

Panzera, (2015) afirma que las partículas virales reconocen a las células hospedadoras por medio de la interacción de la hemaglutinina viral con dos receptores presentes: la *CD46*, una proteína cofactor de unión que inhibe la activación de complemento y la *CD150* o *SLAM*, un receptor presente en linfocitos y células dendríticas que participa en la activación de estas células (Di guardo et.al, 2016; Galán et al, 2014; Khosravi et al., 2016). Después del reconocimiento del receptor en la membrana celular, la proteína *H* provoca una serie de cambios conformacionales sobre la proteína *F* en la cual la región hidrofóbica del péptido de fusión queda expuesta y se inserta en la membrana plasmática de la célula hospedadora induciendo la fusión de las membranas, permitiendo de esta forma el ingreso del virus a la célula. Luego del ingreso, la polimerasa se asocia a la nucleocápside para la replicación y transcripción (Zhao, 2015). A partir de la hebra de ARN genómico se lleva a cabo la transcripción de los diversos genes virales. Una vez que existen componentes proteicos para formar suficientes viriones comienza la replicación, la cual consiste en la producción de copias de polaridad positiva a partir del ARN genómico, las cuales son denominadas antigenómicas y se utilizan como molde para la síntesis de ARN genómico (Budaszewski y messling, 2016).

La partícula viral no necesita formarse para que se infecten otras células, ya que con la expresión de las glicoproteínas de envoltura se induce la fusión de la membrana de la célula hospedera con células vecinas y de esta manera se transfieren las nucleocápsides de una célula a otra sin exponerse al exterior de las células (Tizzano, 2013; Khosravi et al., 2016).

La liberación de los viriones maduros es por medio del proceso de gemación, los viriones están cubiertos por una envoltura que contiene lípidos y glucoproteínas virales. El ARN recién formado se asocia a proteínas de la nucleocápside, que se producen en exceso y se acumulan en el citoplasma, dando lugar a la formación de los cuerpos de inclusión característicos (Pinotti et al., 2009).

Figura 2: Proceso de replicación viral del género *Morbillivirus*



Ciclo de Replicación del *Morbillivirus*: 1) Adsorción de la partícula viral a la membrana de la célula hospedera; 2) Fusión de las membranas celular y viral; 3) Liberación de la nucleocápside al citoplasma; 4) Síntesis de ARN de cadena positiva (antigenoma) y replicación de genoma; 5)Producción de ARN mensajero; 6a) Síntesis de proteínas virales; 6b) Las proteínas *F* y *H* son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y glicosiladas en el aparato de Golgi; 7) Las proteínas *N, P* y *L* son acopladas al ARN recién sintetizado y la proteína M se ubica en la parte interna de la membrana celular; 8) Las proteínas *F* y *H* son exportadas a la

membrana citoplásmica en contacto íntimo con la proteína M; 9) La afinidad de las proteínas *N, P* y *L* con la *M* y ésta con la *F* y *H* es determinante para el ensamble del virión, el cual es liberado por exocitosis; 10) los viriones pueden infectar las células inmediatamente vecinas a través de la fusión membrana célula-célula, debido a la expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula hospedera.

Pinotti, 2013.

Factores de riesgo

Son muchos los factores que favorecen la infección, así como la irresponsabilidad de algunos dueños de no seguir el calendario de vacunación apropiadamente, ocasionando que los perros con el tiempo vayan perdiendo la inmunidad que han adquirido y se encuentren susceptibles al virus (Jensen et al., 2015).

La vacunación es la principal estrátegia para el control de la enfermedad. Las vacunas con virus vivos atenuados (VVA) estimulan la respuesta inmune humoral y celular e inducen memoria inmunológica. La utilización de este tipo de vacunas ha logrado disminuir la incidencia, sin embargo, recientemente se han observado brotes de la enfermedad en poblaciones inmunizadas en diversas áreas geográficas. Aunque no se han determinado las causas, se ha planteado la posibilidad de una reversión de cepas atenuadas o la existencia de nuevas cepas lo suficientemente variables para evadir la respuesta inmune generada por las vacunas, sin descartar la posibilidad de fallas en la administración de dichas vacunas y el estado inmunológico del animal (Budaszewski y messling, 2016).

La vacunación antes de las 6 semanas causa una protección insuficiente ya que aun están presentes los anticuerpos maternos, si bien, dichos anticuerpos desaparecen a las 12 semanas, a partir de las 8 semanas de edad los títulos de anticuerpos se encuentran en un nivel que permite una correcta

inmunización. Para una mayor certeza se recomienda hacer un estudio de titulación a la hembra y realizar la inmunización cuando haya títulos de 1:100. Ademas de esto se recomienda mantener una correcta alimentación (Povey, 1986).

Una mala alimentación es sinónimo de una deficiente protección, por lo que es importante mantener una alimentación adecuada. Algunos fármacos como las tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, griseofulvina, ácido nalidixico, sulfas y glucocorticoides están asociados a una deficiente respuesta inmunológica por lo cual no se debe someter a ningún perro a un proceso de inmunización si se encuentra bajo alguno de estos tratamientos (Kruth y Ellis, 1998).

El manejo referente al cultivo de los virus que serán usados en la elaboración de los biológicos, debe de llevarse a cabo con la mayor delicadeza y de la forma correcta, ya que es común que los virus sufran daños considerables durante su manipulación, lo que ocasiona que no logren ofrecer una reacción aceptable en la respuesta inmunológica de los pacientes. Si bien, este problema se describió desde hace más de 80 años, aún sigue siendo un aspecto importante y vital en la elaboración de los biológicos (Bresalier y Worboys, 2014).

La viabilidad de las vacunas es un factor importante en el fracaso en la vacunación. Las influencias ambientales adversas pueden afectar la respuesta a la vacunación, la humedad de 85 a 90% y las altas temperaturas que provoca que los perros tengas temperaturas rectales en promedio de 38.9ºC reducen la respuesta inmunológica después de la vacunación (Greene, 2008).

Phillps et al., (1989) junto con Céspedes y Navarro (2010) han comentado que el uso de vacunas polivalentes reduce significativamente la protección contra la enfermedad, ya que la interacción entre el adenovirus canino y el virus

de distemper no resulta beneficiosa, ya que el primero es mas activo que el segundo y logra bloquear la interacción de este con el sistema inmunologìco, además dichas vacunas polivalentes causan una deplección linfocitarìa y favorecen una infección bacteriana por la disminución en la cantidad de neutrófilos circulantes.

El tamaño de la población canina es un factor demográfico importante que influencia en la persistencia de la infección. Estudios previos determinaron que mientras mayor es el número de individuos que existe en la población mayor será la susceptibilidad que presenten (Santos de la torre, 2014).

El contacto de las poblaciones caninas con fauna silvestre carnivora, favorece una mayor presencia del virus, ya que est é, puede permanecer en cualquier especie de mamífero carnívoro. Esta documentada la muerte de cientos de especies salvajes asociados a brotes de distemper canino. El problema toma mayor importancia por el daño que el virus ocasionaría en poblaciones animales en peligro de extinción, por lo que se debe de evitar la interacción de fauna silvestre y dom éstica (Curi et al., 2016).

Aunque todas las razas caninas son susceptibles a la infección, la mayor incidencia de la enfermedad es en perros mestizos con edades que oscila de 3 a 6 meses, siendo los machos los que tienen el mayor riesgo en comparación con las hembras (Morales et al., 1997).

Campos (2014) por su parte indica que los perros braquiocefálicos tienen una menor prevalencia, mortalidad y secuelas comparadas con las razas dolicocefálicas, siendo, la raza Pastor Alemán la más predisponente, seguido de las razas Greyhound, Husky, Weinmaraner, Samoyedo y Alaska Malamute.

Se ha observado que los cambios climáticos juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad, el 11% de la variación en la prevalencia de Distemper se presenta debido a variaciones climáticas, siendo los factores más importantes la temperatura y la humedad. La mayor parte de los casos se presentan en primavera e invierno Aùn así la naturaleza de la enfermedad es variable y su curso depende en gran medida de las complejas interacciones entre las características biológicas del virus (atenuación, tropismo y polimorfismo genético) y el sistema inmune del hospedero (grado de madurez, refuerzo, especificidad y eficiencia) siendo éste último uno de los principales factores en determinar el curso, consecuencias y letalidad de la infección (Morales et al., 1997).

Formas de transmisión

Campos, (2014); Gutiérrez y Sáenz (2016) La transmisión de los virus respiratorios se produce a través del contacto directo o indirecto entre los animales, principalmente por las secreciones y aerosoles nasales que están contaminados, los cachorros de menos de 90 días son más susceptibles, así como los perros inmunodeprimidos y animales sin antecedentes de vacunación. Los fracasos en la vacunación o inmunidad materna también contribuyen en gran medida (Monteiro et al., 2016).

Patogénesis

Inicialmente, el VMC entra en contacto con el huésped por medio de la inhalación de aerosoles contaminados y toma contacto con el epitelio del tracto respiratorio superior. Dentro de las primeras 24 horas se multiplica en los macrófagos tisulares ya que son el blanco principal y se propaga en dichas células a través de los vasos linfáticos locales hacia las amígdalas. Entre el 2do-4to día posinfección, aumenta la cantidad de virus en las amígdalas y

además se encuentran pequeñas cantidades en otros órganos linfoides (Beineken et.al, 2015).

Basurto y Marín (2009) Mencionan que después de la exposición se produce fiebre y leucopenia transitoria entre el cuarto y séptimo día, sin que se presenten manifestaciones de la enfermedad. Después, la temperatura regresa al rango normal durante siete a catorce días, luego viene una segunda elevación de la temperatura acompañada de conjuntivitis y rinitis.

Figura 3: Conjuntivitis y secreción nasal purulenta en un paciente con moquillo canino.

Figueroa y Victoria 2015.

Greene (2008) explica que entre el cuarto a sexto día, ocurre la multiplicación del virus dentro de los folículos linfoides del bazo, la lámina propia del estómago, el tejido linfoide del intestino delgado y las células de Kupfter en el hígado. La proliferación del virus en los nódulos linfoides corresponde con el aumento inicial de la temperatura corporal y la leucopenia entre el 3er y 6to día posinfección La propagación posterior a los tejidos epiteliales y del SNC en el 8vo a 9no día posinfección (PI) probablemente ocurra en forma hematógena como una viremia de fase plasmática y asociada a células y dependiendo del estado inmunológico del perro. La liberación del virus comienza en el momento de la colonización epitelial y se produce a través de todas las secreciones corporales. Para el día 14 los animales con adecuados títulos de anticuerpos

para el VMC y citotoxicidad mediada por células eliminan el virus de la mayoría de los tejidos y no muestran signos clínicos de enfermedad (Pope et. al, 2016).

Formas de presentación

La infección por el virus del Distemper canino se presenta como una enfermedad multisistémica potencialmente fatal que puede involucrar al SNC. Los perros pueden desarrollar una infección clínica o subclínica. Se piensa que la mayoría de las infecciones de VMC son subclínicas, y no requieren tratamiento. La infección clínica se manifiesta de tres formas: aguda, subaguda y crónica (Morales et al., 1997; Pope et.al, 2016).

Forma aguda

Campos, (2014) Es la forma más común de presentación, el período de incubación normalmente es de 7 a 14 días. Entre los 3 a 7 días, se presenta fiebre y leucopenia que casi siempre pasan inadvertidas. Pope et.al, (2016) La fiebre disminuye durante algunos días hasta que se desarrolla una segunda fase febril que normalmente va acompañada de conjuntivitis, rinitis y anorexia. Los signos gastrointestinales y respiratorios como tos, diarrea, vómitos, anorexia, deshidratación y pérdida de peso pueden aparecer poco después. Las infecciones bacterianas secundarias usualmente complican este cuadro (Piewbang et.al, 2016; Villalba, 2010; Wheeler, 2007).

Forma subaguda

Villalba (2010) En esta etapa los síntomas respiratorios y digestivos son discretos. Entre los días 14 a 21 se pueden observar algunos signos nerviosos como son incoordinación, hiperestesia, convulsiones, ataxia, paresia, parálisis, sialorrea y temblores musculares. Una forma típica de manifestación de las convulsiones del distemper canino es aquella donde el animal saliva

profusamente y mueve sus mandíbulas asemejando la acción de masticar chicle, los ataques pueden hacerse cada vez más frecuentes y severos, hasta el punto en que el animal se echa al suelo y realiza movimientos con sus patas, además de presentar incontinencia urinaria y fecal, vocalizaciones y ceguera (Willi et al., 2015).

Figura 4: Hiperqueratosis nasal, signo característico de la infección por moquillo canino.

.

Castro S/A

Forma crónica

Vidaña, (2016) ha reconocido dos formas crónicas en perros adultos. La primera se presenta como consecuencia de un proceso inmunomediado que produce una encefalitis multifocal que progresa lentamente. Esta forma de presentación normalmente ocurre en los perros de 4 a 8 años. Se presenta con debilidad en miembros posteriores, falta de respuesta a la amenaza, parálisis y temblores de la cabeza. Esta encefalitis crónica va acompañada de un incremento de anticuerpos antimielina, que se piensa es una reacción secundaria al proceso inflamatorio (Torrejón, 2009).

La segunda forma de presentación es conocida como encefalitis crónica del perro viejo. Es un desorden progresivo que afecta usualmente a perros

mayores de 6 años. Se presenta con ataxia, movimientos en círculo, presión de la cabeza contra objetos y cambios en la conducta. La persistencia en el SNC provoca una reacción inflamatoria, ocasionando una encefalitis crónica (Galán et al, 2014). Se ha demostrado que la infección del epitelio del plexo coroideo se desarrolla durante todo el curso de la misma porque el virus se reproduce de manera continua. Estos animales no son infecciosos, pero si la diseminación del virus en el SNC ha sido extensa entonces ocurre un daño difuso (Torrejón, 2009).

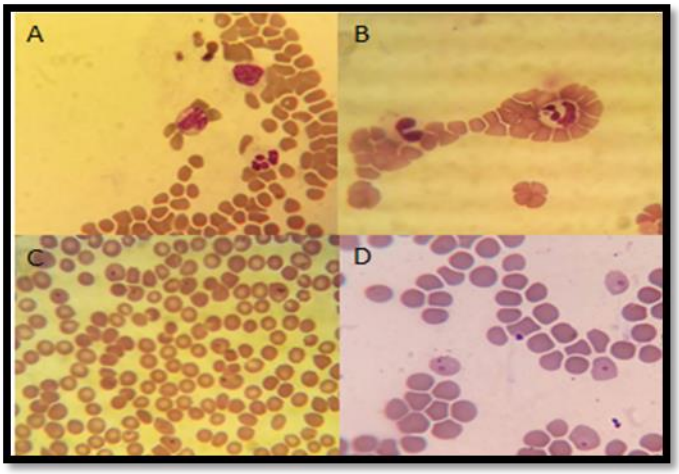
Detección clínica

Un amplio número de parámetros clínicos y ensayos de laboratorio se han sugerido para el diagnóstico antemortem definitivo de la enfermedad. Sin embargo, el curso impredecible y variable de la enfermedad, así como la duración de la viremia, los signos clínicos, la inmunidad humoral tardía o bien la respuesta inmune celular dificultan el diagnóstico correcto de la patología (Elia et al., 2014).

Biometría hemática

En la hematología puede verse linfopenia durante las primeras fases de la infección acompañada de monocitosis, en algunos casos llega a presentarse trombocitopenia (menos común). En la fase inicial de la enfermedad pueden detectarse cuerpos de inclusión en el interior de leucocitos, principalmente en linfocitos y en eritrocitos, sin embargo, se ha reportado que pueden aparecer también en células de descamación en el epitelio corneal y/o conjuntival. Lamentablemente dichos cuerpos de inclusión solo pueden verse entre los días 2 a 9 luego de la infección y no suelen estar presentes cuando los síntomas clínicos aparecen (Giné, 2012; Willi et al., 2015; Raurell y Cendellas, 2014).

Figura 5: Presencia de cuerpos de inclusión en eritrocitos y leucocitos caninos.



Los incisos A Y B muestran un cuerpo de inclusión de Distemper canino en un monocito y en un neutrófilo respectivamente, mientras que los incisos C y D muestran varias inclusiones virales en eritrocitos.

Cortesía del laboratorio veterinario Hema

Pruebas de serología

Un amplio número de técnicas inmunodiagnósticas se han desarrollado para la detección de la infección por VMC en los perros, incluyendo ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) específicos para la proteína de la nucleocápside (Ki-hyun Cho et al., 2014; Han, 2015). Actualmente las pruebas serológicas se consideran las pruebas de referencia. En el caso de las pruebas serologías para conocer de manera cuantitativa el título de anticuerpos, permite diseñar calendarios de vacunación personalizados para cada canino, sin embargo, su uso es limitado ya que el tiempo para obtener resultados es de 4 a 8 días y se requiere de equipo especial (Messling et al., 1999)

El kit de ELISA se basa en la detección de anticuerpos contra el virus por medio de antianticuerpos monoclonales basadose en el análisis cromatográfico encargado de la detección cualitativa del anticuerpo en la secreción conjuntival, descarga nasal, saliva, orina, suero o plasma (Li et al., 2013).

Biopsias de piel

Un estudio reciente ha descubierto que el virus puede ser encontrado en biopsias superficiales de 1 cm de piel normal del cuello dorsal. La biopsia de piel es una prueba ante-mortem viable. El efecto de la vacunación en esta prueba, es incierto y probablemente sea menos confiable durante la fase neurológica avanzada de la enfermedad (Lempp et al., 2014).

Pruebas de inmunofluorescencia

Actualmente el diagnóstico rutinario del virus del distemper canino por inmunofluorescencia se basa en la demostración de antígenos, dicha prueba se aplica a varios especímenes como son frotis conjuntivales, vaginales, espécimenes nasales, lavados traqueales y sedimento de orina usando anticuerpos policlonales o monoclonales (Amude et al., 2006; Elia et al., 2006).

Kapil y Neel. (2015) han evaluado una prueba con anticuerpos policlonales fluorescentes con un conjugado de la compañía (VMRD, Inc., Pullman WA) para detectar la replicación viral en el citoplasma del epitelio conjuntival, nasal y genital. Las mucosas externas ofrecen un acceso fácil y muestras altamente celulares, sin embargo, la sensibilidad de la prueba es baja (80%) en comparación con la prueba de PCR con transcriptasa inversa, además de que no permite estimar las diferencias de los anticuerpos con respecto a la vacunación.

Evaluación de líquido cefalorraquídeo

Los signos neurológicos suelen aparecer entre 1 y 3 semanas, luego de que el perro se ha recuperado de los signos gastrointestinales y/o respiratorios. La determinación de anticuerpos específicos contra el VMC en LCR es diagnóstico de encefalitis por Distemper. Si los títulos de la muestra de LCR son más altos

que los del suero, se considera que esos anticuerpos se han producido localmente y demuestran una infección activa. También puede diagnosticarse Distemper de forma presuntiva, detectando un aumento en la concentración de proteínas del LCR, pleocitosis linfocitaria, además se puede detectar los anticuerpos específicos en una muestra, siempre y cuando no esté contaminada con sangre periférica (Greene, 2008).

Histopatología

La histopatología es una prueba de diagnóstico de mucha importancia en la práctica clínica diaria por lo cual se recomienda evaluar muestras de bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, estómago, duodeno, vejiga y cerebro debido a que el virus puede localizarse en diferentes tejidos. Al examen postmortem comúnmente se observan lesiones macroscópicas representadas por una neumonía bilateral, la cual puede ser moderada o severa, consolidación, congestión y edema de ambos pulmones, los cuales fallan y colapsan. Histológicamente, los hallazgos más comunes son neumonía broncointersticial no supurativa, caracterizada por hiperplasia y formación de sincicios, así como encefalitis no supurativa multifocal, asociada con una severa y generalizada depleción linfoide tisular. Es común la presencia de inclusiones eosinofílicas a nivel intracitoplasmático e intranuclear dentro del epitelio bronquial y bronquiolar (Jara, 2007).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los recientes desarrollos en técnicas moleculares revelaron la idoneidad de estos métodos en el diagnóstico de la infección por VMC. Sin embargo, la gran mayoría dichos estudios se llevaron a cabo en perros infectados experimentalmente, por lo cual se requieren de más estudios (Elia et al., 2014).

Esta prueba permite detectar la proteína *NP* de la nucleocápside viral y puede resultar positiva aun cuando las pruebas de aislamiento y de inmunocitoquímica no logren detectar la presencia viral. Una prueba de PCR puede incluso detectar infecciones en el segundo día posinfección. Es posible encontrar falsos positivos alrededor de 1 a 2 semanas luego de la vacunación (Sehata et al., 2015).

García et al., (2014) establece que la PCR en tiempo real permite medir los productos amplificados en un punto en el cual la reacción se encuentra en un rango exponencial. En un estudio realizado para la detección, se logró detectar a los pacientes enfermos, aunque la carga viral de estos era demasiado discreta para ser detectada por otros métodos.

El virus del distemper canino da lugar a un gran número de muertes cada año, causando importantes pérdidas económicas. En los últimos años, con el uso de métodos basados en técnicas de biología molecular, se han realizado diagnósticos precisos, específicos y sensibles de la infección por el VMC. Dicha prueba se utilizó para detectar el gen de la Hemaglutinina *H* de VMC. En un estudio realizado con 67 perros, la prueba mostró buenas cualidades para diferenciar de manera efectiva entre perros infectados naturalmente de aquellos vacunados (Dong.X. Y et al., 2014).

Vacunación

De todas las medidas existentes para prevenir enfermedades infecciosas, la vacunación es sin duda la más útil (Pastoret et al, 2007). Bresalier y Worboys (2014) Mencionan que durante la primera guerra mundial los científicos británicos Laidlaw y Dunkin empezaron a buscar un método de protección contra la enfermedad, la cual había sido descrita por Carr é unos años atrás, para ello utilizaron virus que habían sido obtenidos de hurones infectados experimentalmente, descubriendo que cuando se elaboraban

vacunas con cultivos desarrollados en las células de la misma especie que se pretende proteger ofrecen una mejor protección.

La rapidez con que se desarrolla la inmunidad después de la vacunación dependerá de las condiciones del animal y de la vacuna. Generalmente, se toma de 3 a 8 días en empezar a desarrollarse inmunidad, principalmente, cuando se trata de una primera exposición al antígeno. La medición de los títulos de anticuerpos séricos, generalmente IgG e IgM, representa el método disponible para valorar la eficacia y duración de la protección vacunal. Aunque los resultados de los test serológicos deben ser interpretados con mucho cuidado y precisión (Campos, 2014).

El propósito de la mayoría de las vacunas es inducir la inmunidad a largo plazo contra los virus, mediante el establecimiento de la memoria inmunológica, que se activa cada vez que el virus invade el cuerpo (Brindis, 2011). El desarrollo y la utilización de vacunas con virus vivos atenuados ha contribuido a una drástica reducción en la incidencia de *Distemper* canino. Los veterinarios han informado que el número de casos de distemper se ha incrementado, presentándose en perros que habían sido inmunizados, incluso repetidas veces, con las diferentes clases de vacunas, dando la impresión de que ninguna vacuna comercial ofrece una inmunización total. Llama la atención que desde 1980 veterinarios del Reino Unido, Australia, Suiza y Nueva Zelanda también han observado una mayor presentación de distemper y un incremento en la frecuencia de fallas vacunales. Esto indica que no sólo en México se ha aumentado la incidencia de distemper (Yévenes, 2014).

Otro grupo de fracasos aparentemente en las vacunas guarda relación con ciertas circunstancias en las cuales queda reprimida la respuesta inmune, por ejemplo, no se debe vacunar a los animales intensamente parasitados o desnutridos, en cualquier situación de estrés en general, incluyendo la preñez, el frío o calor extremoso, la fatiga o la desnutrición, éstos inhibirán la respuesta

inmune normal. Otras causas de fracaso real de vacunación pueden obedecer a que el animal vacunado ya estuviera incubando el padecimiento antes de la vacunación. Pero la más importante es la interferencia por inhibición de los niveles de anticuerpos maternos. En el perro sólo una pequeña porción de éstos atraviesa la placenta para llegar a la sangre fetal. La mayoría se ingieren a partir del calostro, durante las primeras horas de vida del cachorro (Meeusen et al., 2007).

Vacunas vivas modificadas

Las vacunas vivas modificadas se atenúan de tal manera que retienen la inmunogenicidad y la capacidad de replicación en el huésped sin ocasionar la enfermedad. La mayoría de las vacunas disponibles actualmente se obtienen a partir de cultivos de células caninas o células aviares. Promueven tanto la inmunidad humoral como celular de una manera más eficiente y por más tiempo que las vacunas muertas. Un inconveniente que posee este tipo de vacunas es que presentan susceptibilidad a inactivarse y pueden provocar enfermedad si no están correctamente atenuadas o si se aplican en animales con las defensas bajas. Este tipo de vacunas son muy efectivas, ya que logran una inmunidad prolongada (no menor a 1 año en la mayoría de los perros); sin embargo, aunque estas cepas virales son capaces de inmunizar al 100% de los perros susceptibles, esporádicamente pueden producir encefalitis o desmielinización posvacunal (Meeusen et al., 2007).

Vacunas de virus muertos

Las vacunas inactivadas están hechas de agentes virales desnaturalizados sin destrucción de su inmunogenicidad. Son más seguras puesto que no tienen riesgo de virulencia, pero no simulan una infección natural y, en consecuencia, poseen una eficiencia y duración menor, sobre todo la relativa a la inmunidad celular. Por esta razón, en la mayoría de los casos, se

debe añadir un adyuvante para incrementar la duración y alcanzar un grado de estimulación inmunológica similar al de las vacunas vivas modificadas. El hidróxido de aluminio (Al(OH)3) es uno de los adyuvantes más usados al mantiener el antígeno en un sitio específico mediante un efecto de depósito intensificando la respuesta inmune del organismo hacia éste (Meeusen et al., 2007).

Vacunas recombinantes

El desarrollo de las vacunas recombinantes (VR) comenzó en la década de 1970, y su perfeccionamiento continúa. Están constituidas por un microrganismo no patogénico que funciona como vector, al cual se le insertan los genes que codifican las proteínas capsulares H y F del virus del distemper. Debido a que estas vacunas contienen sólo los genes específicos, no inducen la enfermedad en el animal vacunado, no revierten su virulencia y tampoco pueden replicarse ni difundirse en el ambiente (Meeusen et al., 2007; Stephensen et al., 1997).

Vacunas heterotópicas contra Sarampión

Las vacunas a virus heterotópico tienen la ventaja de no interferir con la inmunidad que proporcionan los anticuerpos maternos. Sin embargo, induce una inmunidad limitada contra la infección por VDC. Se puede utilizar en combinación con vacunas atenuadas de VDC en cachorros de 6 a 10 semanas de vida, o sólo como sustituta de la primera vacunación (Meeusen et al., 2007).

Programa de vacunación

Se recomienda que el protocolo de vacunación en cachorros comience a las seis u ocho semanas. A esta edad se deben dar mínimo tres dosis cada una con tres o cuatro semanas de separación, seguido de una revacunación anual.

Si bien las vacunas polivalentes convencionales son capaces de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes, éstas sólo tienen una distribución sérica y un limitado poder de difusión a superficies mucosas (Retamal, 2013).

Interacción inmunológica

El virus distemper se caracteriza por dañar la inmunidad innata y adaptativa desde momentos iniciales del cuadro infeccioso gracias a su elevado linfotrópismo y capacidad de generar disrupción en funciones esenciales de células inmunes. Lo anterior se explica por complejas interacciones entre las proteínas virales y elementos propios de cada vía de señalización, que limita el desarrollo de una respuesta inmune antiviral Th1 efectiva y en perfecto equilibrio con una respuesta de mucosas Th2. Esta última cumple el rol fundamental de evitar infecciones productivas neutralizando agentes patógenos a nivel de superficies mucosas, mediante la secreción de anticuerpos IgA específicos. La respuesta Th1 permite eliminar infecciones ya establecidas utilizando linfocitos T citotóxicos CD8+ secretores de IFNγ y células plasmáticas secretoras de anticuerpos neutralizantes de los isotipos IgG2a e IgG2c séricos. Considerando esta diferenciación funcional, una estrategia de vacunación óptima debe ser capaz de estimular ambas respuestas, de forma sólida y equilibrada (Céspedes y Navarro, 2010).

No obstante, se ha descrito que los virus atenuados utilizados en vacunas polivalentes poseen un linfotrópismo y capacidad de inducir inmunosupresión residual, comprometiendo el balance de las respuestas inmunes mencionadas (Phillps et al., 1989; Gumley, 1999).

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia sobre Distemper canino en pacientes atendidos en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies del IICV-UABC durante el periodo 2015 a 2017.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la frecuencia de distemper canino en pacientes atendidos en el Hospital Veterinario de Pequeñas Especies del IICV.
2. Establecer los factores de riesgo asociados a la enfermedad (raza, edad, sexo, época, vacunación).
3. Diseño e instrumentación de un sistema de PCR en tiempo real para la confirmación del diagnóstico clínico y/o serológico.
4. Obtencion de las secuencias de los casos positivos de moquillo canino con el fin de verificar que se trata del virus de interés.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del área de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Hospital Veterinario de pequeñas especies (HVPE) de la UABC, el cual se encuentra ubicado en el Ex ejido Coahuila y colinda con las colonias Independencia, Avenida Lázaro Cárdenas y Boulevar Benito juar éz. El HVPE es reconocido por brindar servicios veterinarios de excelencia, anualmente se atienden en promedio 650 pacientes (consultas) entre perros y gatos.

Diseño y duración del estudio

Se llevó a cabo un estudio epidemiológico observacional retrospectivo con el fin de determinar la prevalencia de casos de distemper canino durante los años 2015, 2016 y 2017 en la población canina de pacientes atendidos en el HVPE-IICV. Fueron incluidos en el estudio todos los expedientes de pacientes que estaban completos y que llegaron a consulta por cualquier motivo. Un caso de distemper fue aquel que resultó positivo a la prueba de ELISA, un caso sospechoso fue aquel que fue declarado como sospechoso a la enfermedad sobre la base de signos compatibles a la enfermedad de acuerdo al criterio del médico tratante y que el dueño no aceptó que se realizara la prueba de ELISA.

Base de datos

Se diseñó una base de datos en un programa de Excel para la captura y manejo de la información generada en el HVPE. Algunas de las variables capturadas fueron: fecha, nombre del perro, raza, sexo, edad, talla, motivo de consulta, signologìa, diagnostico del caso entre otros.

Confirmación de Moquillo canino por PCR de tiempo real.

Con el propósito de confirmar la infección con el virus del moquillo canino, se diseñó y estandarizó un sistema de PCR en tiempo real que amplifica un fragmento de 88 pares de bases del gen que codifica para la nucleocápside viral (Del Puerto et al., 2010), de acuerdo con la secuencia disponible en las bases de datos de GenBank con número de identificación KU552083.1, publicada el 12 de mayo de 2016. El gen que codifica para la nucelocápside del virus del moquillo canino fue selecionada sobre la base que es altamente conservada en las diferentes cepas del virus y es la proteína más abundantemente expresada.

Como controles positivos se tomarón muestras sanguineas de 3 perros que fueron atendidos en consulta y cumplieron con los siguientes criterios: 1) signos y síntomas compatibles con la enfermedad; 2) resultado positivo a moquillo canino por serología y; 3) identificación de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos en globulos blancos. Los controles negativos consistieron en mezcla maestra sin DNA y agua grado biología molecular.

Extraccion del ARN

Para la extracción del ARN se utilizó el juego de reactivos *Total RNA Fatty AND Fibrous Tissue (Bio Rad Autorum*^{TM}) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Del producto de las extracciones (100 µl) de las muestras se procedió a realizar un combinado de DNA para la estandarización de la técnica.

Oligonucleótidos

Para la amplificación del fragmento de 88 pb del gen que codifica para la nucelocápside del virus del moquillo canino, se diseñaron los oligonucleótidos 5´-GGACAGACTTGTTAGATTGG-3´ en sentido positivo y 5´-GTATCCTCTCCCTTGTTCGTG-3’ en sentido negativo (Cuadro 2); empleando

los programas GeneRunner versión 6.1 y Primer3Plus versión 2.4, disponibles en (*http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)* y Oligocalc versión 3.2. Los oligonuceótidos fueron sintetizados por GeneScript Inc. (New Jersey, USA). Para la estandarización y ejecución de las pruebas RT-PCT se utilizó un termociclador BioRad de tiempo real con paquetería CFX Manager software, asi como material de laboratorio diverso.

Cuadro 2. Secuencias y características de los oligonucleótidos diseñados a partir del gen de la nuceocápside del virus del moquillo canino

Foward	**GGACAGACTTGTTAGATTGG**		
	Longitud: 20 pb	Tm: 50.4ºC	GC: 45%
Reverse	**GTATCCTCTCCCTTGTTCGTG**		
	Longitud: 21 pb	Tm:52.4ºC	GC: 50%
	Amplicon: 88 pb		

Reconstitución de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron reconstituidos con agua grado biología molecular a una concentración de 10 µM y estandarizados a concentraciones de 200, 400 y 800 Nm con 1, 2 o 3 µL de DNA templete, utilizando la mezcla maestra BioRad *I Script One-Step RT-PCR (*Biorad, Hercules, CA*)* formulada con el fluróforo SYBR Green I, tal y como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Concentración de reactivos para la estandarización

Reactivo	***200 nM***	***400 nM***	***800 Nm***
Cantidad	1 reacción	1 reacción	1 reacción
Maxter mix	5 µl	5 µl	5 µl
DNA templete	1-2-3 µl	1-2-3 µl	1-2-3 µl
Primer F	0.25 µl	0.5 µl	1.0 µl
Primer R	0.25 µl	0.5 µl	1.0 µl
H2O	4.0 µl	3.0 µl	2.0 µl
Volumen final	10 µl	10 µl	10 µl

Protocolos de pruebas RT-PCR para moquillo canino

Los parámetros de desnaturalización, hibridación y extensión fueron calculados empleando la herramienta *Protocol Autowriter* de la paquetería CFX96, tomando en consideración el tamaño del producto del PCR, la secuencia de oligonucleótidos y el tipo de enzima de la mezcla maestra, resultando en un ciclo de 95°C durante 3 minutos, 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 20 segundos de hibridación a 51.2°C y un ciclo final de extensión de 20 segundos a 72°C durante 40 ciclos. Asimismo, para cada corrida se realizó el análisis de curva de disociación a partir de 65°C y hasta 95°C para la identificación de curvas de amplificación dentro de la temperatura estimada de 75.5°C +/- 1°C del producto del PCR de 88 pb y discriminar entre artefactos distintos a la amplificación del templete de ADN esperado.

Interpretación de resultados

Los resultados de la prueba RT-PCR para distemper canino fueron considerados positivos cuando la muestra correspondiente obtuvo una señal

fluorescente de amplificación antes del ciclo 40, por encima de la línea umbral de control que el programa CFX96 establece automáticamente y que corresponde a 10 veces la desviación estándar del promedio de índice de fluorescencia generada por todas las muestras durante los 10 primeros ciclos de cada corrida. Los resultados fueron considerados negativos cuando la muestra correspondiente no logro desarrollar una señal fluorescente de amplificación por encima de la línea umbral del control negativo de referencia en un máximo de 40 ciclos.

Análisis estadísticos

La prevalencia de la enfermedad se determinó apartir del cociente del número de casos positivos de acuerdo a la prueba de ELISA entre el número de pacientes atendidos por año. Además, se utilizó el programa Statistix para determinar si la enfermedad resultó asociada estadísticamente a los factores de riesgo evaluados. Además, con el fin de determinar la magnitud de asociación entre la enfermedad y los factores de riesgo se calculó la tasa de momios (OR) y su intervalo de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

Prevalencia de casos de moquillo canino en pacientes atendidos en el HVPE-IICV.

El cuadro 4 muestra la prevalencia de casos de distemper canino en pacientes atendidos en el HVPE-IICV del 2015 al 2017 dependiendo de su clasificación diagnóstica. La prevalencia general de casos positivos durante el periodo de estudio fue de 1.8% observándose un incremento durante el año 2016 (3.8%) y 2017 (1.3%) con respecto al 2015. Al sumar los casos positivos y sospechosos para el cálculo de la prevalencia se observa una prevalencia general de 4.3%. Ademas se observa una tendencia similar, es decir incremento en 2016 y 2017 con relación a 2015.

Cuadro 4 Prevalencia de casos de moquillo canino en pacientes atendidos en el HVPE-IICV del 2015 al 2017 dependiendo de su clasificación diagnóstica.

Año	Pacientes atendidos	Positivos (Prevalencia %)	Sospechosos (prevalencia %)	Pos+Sosp (Prevalencia %)
2015	479	1 (0.2)	10 (2.1)	11 (2.3)
2016	492	19 (3.8)	10 (2.1)	29 (6.1)
2017	386	5 (1.3)	13 (3.4)	18 (4.7)
Total	1357	25 (1.8)	33 (2.4)	58 (4.3)

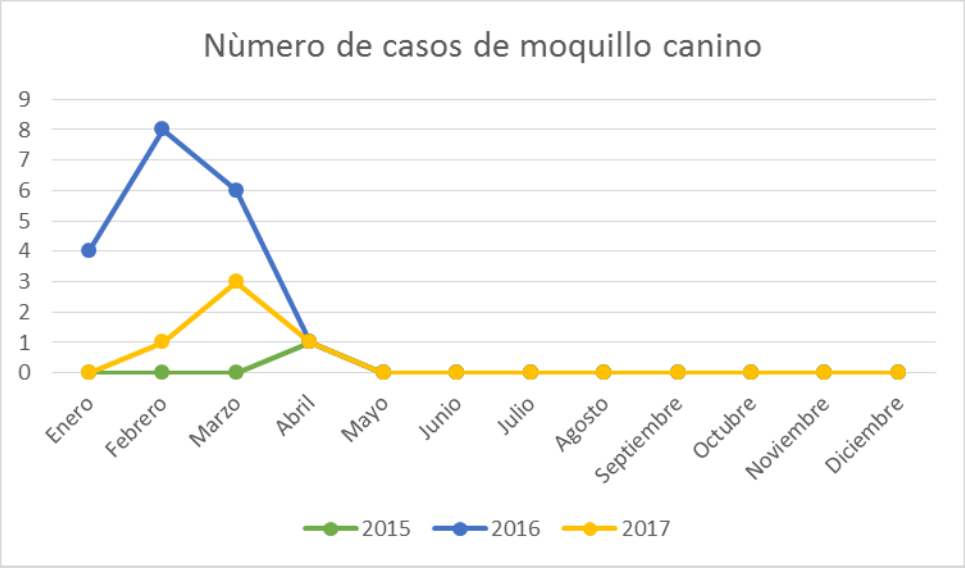
Magnitud de asociación de casos de distemper entre los diferentes años de estudio.

Como se puede observar en el cuadro 5, los perros atendidos durante 2016 presentaron 19 (OR=19.2; $P<0.05$) veces más probabilidad de ser detectados con distemper con relación a 2015 que fue utilizado como referencia. Sin embargo, al comparar 2015 con 2017 no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los casos.

Cuadro 5 Magnitud de asociación de casos positivos a moquillo entre los diferentes años.

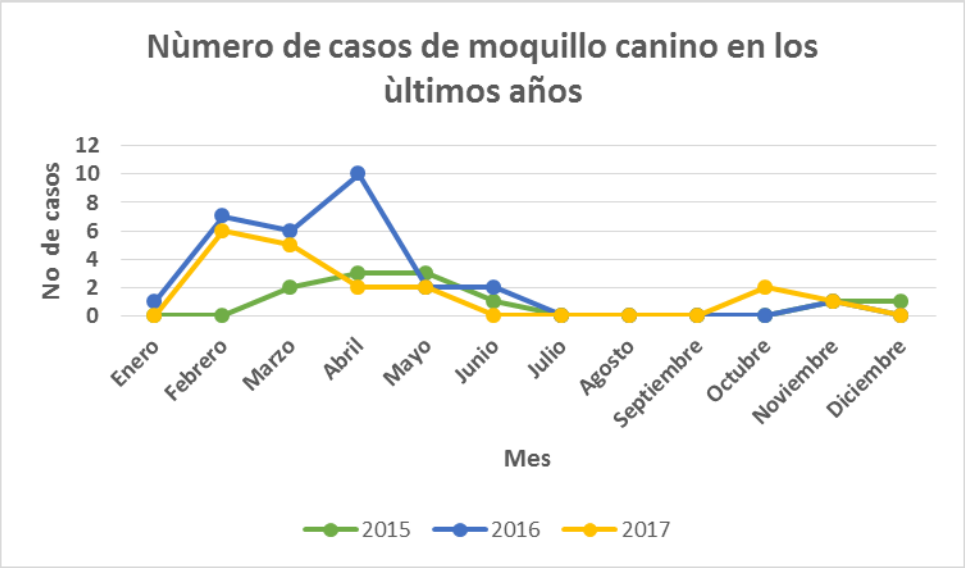
Año	*Positivos*	*Negativos*	*Prevalencia*	*OR*	*IC95%*	*P value*
2015	1	478	0.2	Ref		
2016	19	473	3.8	19.2	(2.5-14.4)	P<0.05
2017	5	381	1.3	6.2	(0.7-53.9)	P=0.13 NS

Gráfica 1: Comportamiento mensual de los casos positivos de moquillo canino y los años de estudio.



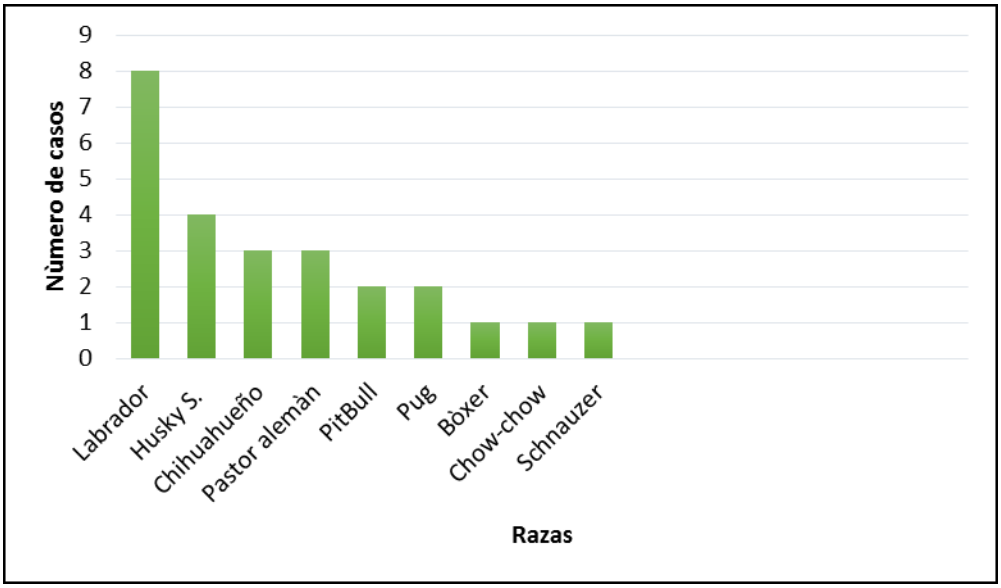
La gráfica 1, muestra que el mayor número de casos se presentaron durante durante invierno y primavera, siendo los meses de enero a marzo donde se presentan los mayores picos de incidencia.

Gráfica 2: Comportamiento mensual de los casos positivos + sospechosos de moquillo canino y los años de estudio.



La gráfica 2, muestra que el mayor número de casos se presentaron durante durante el invierno, primavera y el verano siendo los meses de enero a junio donde se presentan la mayor cantidad de casos.

Gráfica 3: Razas afectadas por moquillo canino durante el periodo 2015-2017.



Razas más afectadas por distemper canino

Se calculó la prevalencia de las razas más afectadas de distemper canino observándose que las 4 razas más afectadas fueron: labrador, husky, chihuahueño y pastor alemán aportando un 72% del total de casos.

Factores de riesgo asociados a la enfermedad

Como se puede observar en el cuadro 6, la única variable estadísticamente significativa fue la edad del animal a la que fue detectada la enfermedad. Los perros <1 año presentaron 3.5 veces más probabilidades de enfermar en comparación con los >1 año. Aunque el efecto de la vacunación no fue estadísticamente significativo es importante señalar que el 23% (311/1357) del total de registros (pacientes) analizados refirieron haber sido vacunados, aunque solo 29 (9.3%) de ellos recordaron la marca de la vacuna utilizada. De estos 29, el 69% utilizó vacuna Canigen® MHA2 Puppy (Virbac) y el resto fueron otras marcas comerciales.

Cuadro 6: Magnitud de asociación entre factores de riesgo y la enfermedad.

Factor de riesgo	Estrato	Positivo	Negativo	OR	IC95%	Valor p
Edad	<1 año	17	503	3.5	(1.5-8.1)	0.001
	>1 año	8	829			
Época	P-V	13	752	1.1	(0.5-2.6)	NS
	O-I	12	580			
Vacunación	No	23	1023	3.4	(0.8-14.8)	NS
	Si	2	309			
Raza	Puro	25	1206	2.6	(0.3-19.0)	NS
	Mestizo	0*	126			
Sexo	Macho	9	667	1.7	(0.7-4.0)	NS
	Hembra	16	665			
Talla	Peq-med	23	1001	3.8	(0.8-16.2	NS
	Grande	2	331			

*En esta columna se coloco el 1 para hacer la prueba.

El cuadro 7 muestra la magnitud de asociación entre las razas de perros y la enfermedad. La raza schnauzer fue la menos afectada y utilizada como referencia para el análisis donde se observa que la raza labrador presentó 12 veces más probalilidad de ser detectado con distemper en relación al schnauzer. El análisis de las otras razas no fue significativo.

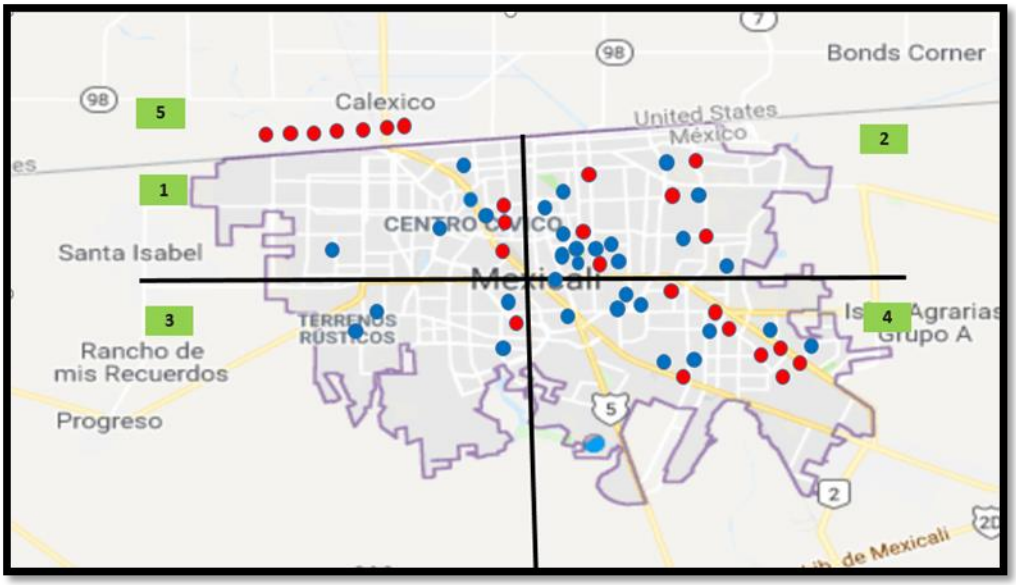
Cuadro 7. Magnitud de asociación entre las razas de perros y la enfermedad.

Razas	Animales atendidos	No de casos	OR	IC95%	Valor P
Schnauzer	75	1	1.0	Referencia	
Labrador	49	8	12.0	(1.4-99.6)	0.01
Chow-chow	9	1	8.2	(0.4-143.1)	NS
Bóxer	36	1	2.0	(0.1-33.8)	NS
Pug	74	2	2.0	(0.2-22.5)	NS
Pitbull	135	2	1.1	(0.1-12.3)	NS
Pastor Alemán	95	3	2.3	(0.2-22.9)	NS
Chihuahueño	212	3	1.0	(0.1-10.2)	NS
Husky	34	4	0.1	(0.01-1.0)	NS

Distribucion espacial de caso de distemper canino en Mexicali.

Con el fin de ubicar la distribución de casos en Mexicali, este fue dividido en 4 cuadrantes y un cuadradante adicional que representa a California. El 56% (14/25) de los casos se presentaron en las zonas 2 y 4. Es importante señalar que el 28% (7/25) de los casos fueron pacientes procedentes de Calexico.

Figura 6: Número de casos positivos y sospechosos registrados en la ciudad de Mexicali.

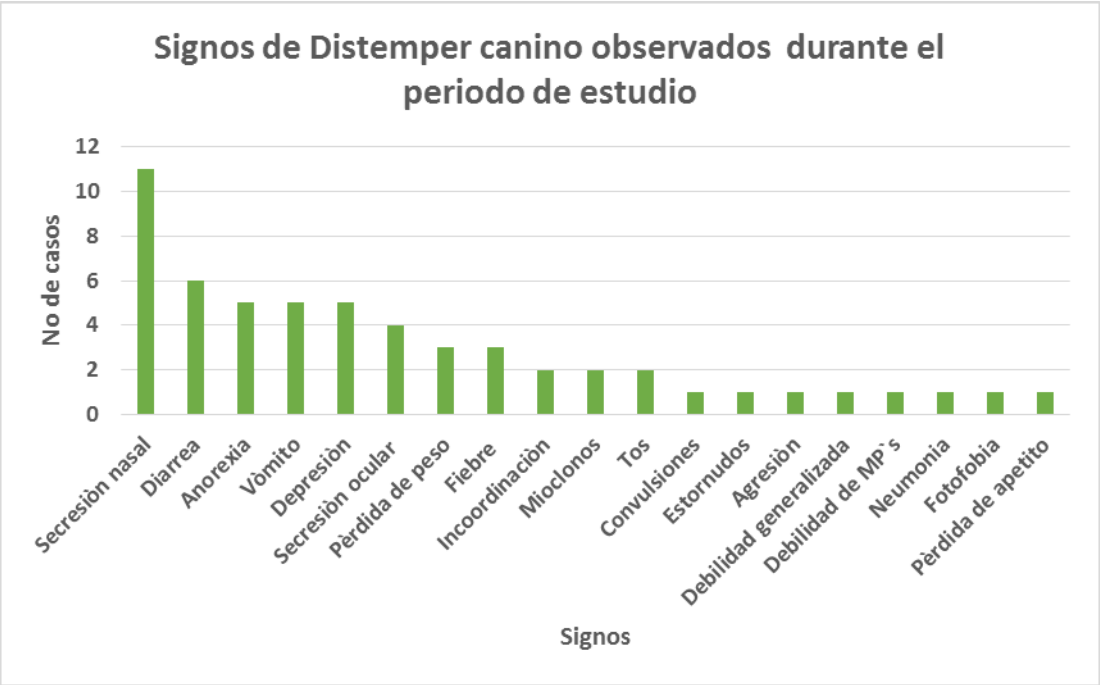


*Los puntos rojos indican casos positivos, mientras que los puntos azules muestran a los casos sospechosos.

Principales signos que presentaron los perros diagnosticados con distemper (n=25).

En total fueron referidos 56 signos. La secresión nasal, diarrea, anorexia, vómito y depresión contribuyeron con el 58% (gráfica 4).

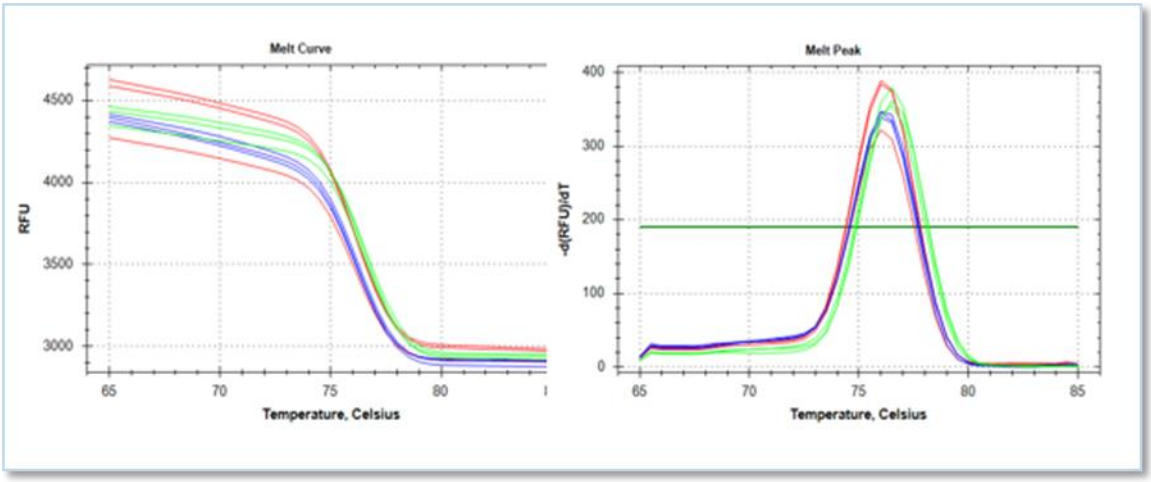
Gráfica 4: Signos presentes en los perros positivos y sospechosos de moquillo durante el periodo (2015-2017).



Estandarizacion de la prueba de RT-PCR para el diagnóstico de distemper canino.

El mejor desempeño del sistema RT-PCR para moquillo canino se obtuvo mezclando los oligonucleótidos a una concentración de 400 nM con 2 µl de DNA temlpete en mezcla maestra con un volúmen final de 20 µl por reacción. El promedio del ciclo umbral de amplificación (Threshond cycle/Ct) para los controles negativos fue 16.69. Ninguno de los controles negativos de mezcla maestra o agua grado biología molecular desarrollaron amplificación alguna.

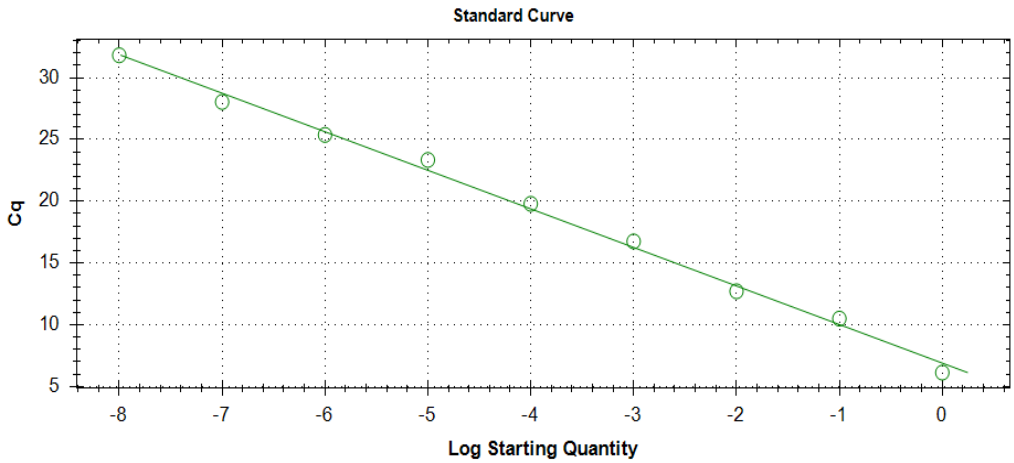
Gráfica 5: Curvas de disociación en la estandarización del RT-PCR para moquillo canino a partir de muestras de capa flogística de sangre de perros.



La curva de la derecha muestra el producto de amplificación del fragmento de 88 pb del gen que codifica para el moquillo canino con una Tm estimada en 75.5 ºC. Los controles negativos no presentaron amplificación detectable, haciendo válida la prueba.

La grafica de la curva estándar confirma la validéz de la prueba RT-PCR para moquillo canino al cumplirse los parámetros de eficiencia (E) entre 90% y 110%, correlación (R2) mayor a 0.995 y con una amplitud (slope) entre diluciones con promedio de 3.316.

Grafica 6: Curva estándar en diluciones seriadas con factor logarítmico para la estandarización del sistema RT-PCR para moquillo canino



E = 107.7 % R2 = 0.996 Slope = 3.316 Y-int = 8.932

Para comprobar que la amplificación detectada en el espectofotómetro corresponde a la secuencia de nucleótidos que codifican para la nucleocápside viral de moquillo canino se mandarón a secuenciar a (*eurofins Genomics 12701 Plantside Dr. Louisville, KY 40299*) 4 muestras de productos del Real time RT-PCR (Pool de muestras) mismas que fueron amplificados por medio de la PCR de punto final siguiendo las mismas indicaciones técnicas de la PCR anterior. Posteriormente se corrió un gel de agararosa al 2% detectando fragmentos menores a 100 pb. Dado que en la amplificación se trabajó con un pool de muestras positivas, se envió una muestra con un duplicado tanto en su forma foward como reverse, quedando de la siguiente forma: muestra 1 foward, muestra 1 reverse, muestra 2 foward y muestra 2 reverse. Las muestras fueron enviadas en el volumen y bajo las indicaciones recomendadas por la compañía.

Los resultados obtenidos en la secuenciación fueron analizados en la herramienta de alineación de secuencias (Blast) del Genbank mostrando una similitud del 96% para el gen que codifica para la nucleocápside del virus de moquillo canino, obtenido del mismo banco genético con número de indentificación KU552083.1. Lo anterior demuestra que el material genético amplificado corresponde al genoma viral y que la estandarización y los primers fueron perfectamente diseñados, obteniendo resultados seguros y confiables con está metodología.

Cuadro 8: Resultados de la alineación.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Canine morbillivirus isolate CDV/LDM-BTU-3, complete genome	71.3	71.3	100%	9e-10	96%	MH349541.1
Canine morbillivirus strain HL001, complete genome	71.3	71.3	100%	9e-10	96%	KX709880.1
Canine distemper virus isolate CDV-AH, complete genome	71.3	71.3	100%	9e-10	96%	KX347928.1
Canine distemper virus isolate SDWD/14/9 nucleocapsid protein gene, complete cds	71.3	71.3	100%	9e-10	96%	KU552083.1
Canine distemper virus strain SD/14/11, complete genome	71.3	71.3	100%	9e-10	96%	KP738610.1

VIII. DISCUSIÓN

En nuestro estudio la prevalencia general detectada de *Distemper* canino durante el periodo 2015 al 2017 en el HVPE fue de 1.8%. Esta cifra esta muy por debajo de lo encontrado en otros países ya que Gencay et al., (2004) reportaron en Turquia una prevalencia del 9% (55/609) en perros utilizando la prueba de neutralización viral. En otro estudio Jamett et al., (2015) reportaron una prevalencia del 52% (257/501) en perros no vacunados en la región de Aracaunia, Chile empleando pruebas serológicas de Elisa. Ademas Curi et al., (2016) analizaron 380 muestras de perros de zonas rurales de Brazil detectando una prevalencia del 15%. La prevalencia general de nuestro trabajo (1.8%) no pueden ser comparados con otros estudios en México ya que los pocos reportes que existen solo consideran tamaños de muestras reducidos y estratos de población muy especificos. Tal es el caso de Vidaña (2016) quien reporta una prevalencia de 23.3% (7/30) de una pequeña población de la comarca lagunera (Coahuila), sin embargo, todos los pacientes incluidos en el estudio eran sospechosos a la enfermedad. Otro estudio realizado por Vallejo (2014) en la ciudad de Monterrey reportó una prevalencia de 71% (73/102) utilizando t écnicas moleculares. En 2017, dueños de clinicas veterinarias en Mexicali mostraban preocupación por el incremento de casos de distemper en los pacientes que llegaban a consulta. Sin embargo, no se contaba con cifras de prevalencias anuales que permitieran evaluar el comportamiento de la enfermedad y verificar si efectivamente se estaba presentando una mayor cantidad de casos. Si bien es cierto que las prevalencias encontradas en nuestro trabajo están muy por debajo de lo reportado en otros países. Nuestro trabajo permitio identificar un incremento sustancial de la prevalencia del 2015 (0.2%) con relación al 2016 (3.8%) ya que los perros atendidos durante 2016 presentaron 19 veces más probabilidad de ser detectados con distemper con relación a 2015 este comportamiento no puede ser explicado debido a las limitaciones que tienen los estudios descriptivos como el nuestro ya que solo

permite conocer las dimensiones del problema, pero no identificar las causas de este incremento.

Factores de riesgo

En nuestro trabajo, de todas las variables analizadas solamente la variable edad (<1 año y > 1 año) mostró diferencia estadísticamente significativa. Es decir, los perros <1 año presentaron 3.5 veces más probabilidades de ser detectados con distemper con relación a los >1 año (p=0.001, IC95% 1.5-8.1).

Aunque el tipo de raza (puro–mestizo) no fue significativa; se encontró una asociación estadísticamente significativa al analizar dos razas puras; los resultados indican que la raza labrador presentó 12.0 veces más probabilidades de enfermar de distemper en comparación con la raza schanuzer (p=0.01, IC95% 1.4-99.6). Otros estudios realizados por Avizeh et al (2017) y Morales et al (2007) no encontraron significancia estadística al anlizar la raza, sexo, edad y época. Lo anterior demuestra que las variables que principalmente se atribuyen a la enfermedad no siempre resultan ser significativas y quizás existan otros aspectos (densidad de población, prevalencia de la enfermedad en la región, tenencia responsable de la mascota, medicina preventiva, entre otras) que intervienen en el comportamiento y presencia de la enfermedad.

Vacunacion

La vacunación es el método mas eficaz para cotrolar las enfermedades infecciosas en las personas y en los animales. Además es una de las estrategias de medida preventiva primaria que representa una accion muy importante para la prevención y control de las enfermedades (Tizard, 2009). En nuestro estudio la vacunación no fue estadísticamente significativa este comportamiento puede ser explicado en parte porque quizás las vacunas que

se utilizan en Mexicali contienen cepas diferentes a las que circulan en el campo y por lo tanto no genera inmunidad activa contra las cepas que puedan estar circulando en la región y por lo tanto pudieran no proteger al animal. Demeter et al., (2010) en Hungria analizaron la variación genética de las proteínas N, M, P y F vacunales (Vacuna Vanguard® Plus; Pfizer Animal Health) y de las cepas de campo en la región. Se reportó que la vacuna contiene la cepa (Snyder Hill) que correponde al linaje (America-1) y dentro del cual se encuentran todas las cepas vacunales. Sin embargo, las cepas de campo aisladas fueron del linaje (Ámerica-2), por lo cual esas vacunas aparentemente no ofrecen ninguna protección a los perros inmunizados. En nuestro estudio la utilización de la vacuna no mostró ningún efecto sobre la prevención de la enfermedad; del total de pacientes que refirieron vacunacion y que recordaron la marca, el 69% utilizó vacuna Canigen® MHA2 Puppy (Virbac) y el resto fueron otras marcas comerciales. Por lo anterior, es imperativo realizar los estudios necesarios para evaluar si los hallazgos encontrados por Demeter et al., (2010) se están presentando en nuestra región.

Durante bastante tiempo se ha intentado dar una explicación a la creciente cantidad de brotes registrados en todo el mundo, para ello se han propuesto varias posibles causas. Una de ellas es la presencia de nuevas cepas virales. Riley y Wilkes (2015) determinaron el origen de una nueva cepa viral que fue encontrada en EE. UU (Tennesse y Kentucky) y bautizada como cepa Tennesse. La genotipificación reveló que esta cepa apareció por primera vez en 2011 y se detectó en perros de varios estados en la región sudeste de los Estados Unidos. Pero no han sido las únicas cepas descritas se ha comunicado el descubrimiento de nuevas cepas virales que difieren de las cepas vacunales y de campo por todo el mundo, lo que demuestra que es una problemática global, por ejemplo, se han descrito nuevas cepas en Colombia (Restrepo et al, 2014), India (Swati et al, 2015) y China (Feng et al, 2016) solo por mencionar algunos. En nuestro país Martinez et al., (2008) y Gámiz et al., (2012) realizaron estudios moleculares en el Estado de M éxico reportando un

nuevo genotipo del virus de moquillo canino, aunque no se puede asegurar que solo es excusivo de esta región ya que no se han realizado estudio a nivel nacional.

Signos de la enfermedad

Con respecto a la signologìa de Distemper canino, no existe un signo patognomónico, sin embargo, la presencia conjunta de varios de ellos en un animal constituye una buena evidencia diagnóstica. La signologìa que se puede presentar durante la enfermedad es muy variable ya que depende de varios factores tales como: la cepa del virus, la carga viral, la etapa de infección, la inmunidad del paciente entre otros (Greene, 2008). En nuestro estudio los signos reportados más frecuentemente fueron la secreción nasal, diarrea, anorexia y vómito, los cuales contibuyeron con el 58% de la signologìa observada en los 25 perros positivos registrados. Por su parte Rodriguez (2017) encontró en un estudio realizado en 52 perros que los signos respiratorios, digestivos y nerviosos fueron los más comunes. Lo anterior demuestra que los signos nerviosos no siempre se van a presentar como se suele pensar, lo que nos obliga a ser más precávidos y nunca descartar que el paciente curse con la enfermedad al observar solo signos poco especificos.

Estandarizacion RT-PCR

En este trabajo se diseño, estandarizó e instrumentó exitosamente un sistema RT-PCR que permtió la confirmación de la presencia de cDNA del virus del moquillo canino empleando el RT-PCR en muestras positivas a serología o sospechosas sobre la base de la historia clínica del animal. En la actualidad, este tipo de pruebas se estan convirtiendo en una parte fundamental del diagnostico de esta y otras enfermedades, ya que ofrecen alta sensibilidad y especificidad y permite obtener resultados en cortos periodos de tiempo a

comparación con otros tipos de pruebas. Wang et al., (2011) desarrollo en china una prueba de RT-PCR para diferenciar cepas vacunales y de campo, utilizando las secuencias genéticas registradas en el GenBank incluida la cepa A75/17. La técnica demostró ser eficiente y precisa para llevar a cabo la diferenciación, ya que inclusive logro detectar cepas mutantes. Dong et al., (2014) y Wang et al., (2017) tambien diseñaron pruebas de RT-PCR multiplex para detectar y diferenciar cepas vacunales y de campo y concluyeron que el diagnóstico molecular buenos resultados, ya que se requiere una cantidad pequeña de muestra y los resultados son muy rápidos. Como se puede observar, las pruebas de diagnóstico molecular, en este caso la técnica de PCR y sus variantes ofrecen las características de una pueba rápida y confiable, ya que, a comparación de otras pruebas, se puede emitir un diagnóstico desde el segundo dia posinfección y detecta una cantidadtan pequeña de material viral de hasta 8 pg/ml. En nuestra estandarización pudimos observar que se detectó el virus en todas las diluciones probadas, por lo cual también concordamos en la gran versatilidad y eficacia de las pruebas moleculares en las detecciones virales.

Una limitante de nuestro estudio es que solo incluyó el análisis de información de un solo hospital y por supuesto estas cifras no pueden ser extrapoladas a toda la poblacion de Mexicali, pero si consideramos que anteriormente no existía información disponible sobre esta enfermedad, este trabajo nos brinda información de línea base sobre la situación epidemiológica de la enfermedad en el área de influencia del HVPE-UABC. Es importante señalar que hace falta realizar estudios epidemiologicos en el área de pequeñas especies de compañía (perros, gatos y animales exóticos) que nos permitan dimensionar el impacto de sus enfermedades tanto en la salud animal como en la salud humana.

IX.CONCLUCIONES

La prevalencia general de casos positivos a distemper durante el periodo de estudio fue de 1.8% observándose un incremento durante el año 2016 (3.8%) y 2017 (1.3%) con respecto al 2015.

Los perros atendidos durante 2016 presentaron 19 (OR=19.2; $P<0.05$) veces más probabilidad de ser detectados con distemper con relación a 2015. Sin embargo, al comparar 2015 con 2017 no se detectó diferencia estadísticamente significativa entre los casos.

Las 4 razas más afectadas de distemper canino fueron: labrador, husky, chihuahueño y pastor alemán aportando un 72% del total de casos.

Los perros <1 año presentaron 3.5 veces más probabilidades de enfermar en comparación con los >1 año.

Los factores evaluados tales como época, vacunación, raza, sexo y talla no fueron estadísticamente significativos.

En total fueron referidos 56 signos en los perros positivos a distemper. La secresión nasal, diarrea, anorexia, vómito y depresión contribuyeron con el 58% de ellos.

Las pruebas de diagnóstico molecular (Real time RT-PCR) han mostrado buena respuesta para la detección temprana de la enfermedad.

Existe la duda razonable de que quizás las vacunas no estén funcionan adecuadamente para prevenir la enfermedad en la región.

X. LITERATURA CONSULTADA

Avizeh. R, Shaupori. M. R, Akhlaghi. N. 2017. Antibody titers against canine distemper virus in unvaccinated rural dogs from ahvaz, Irán. Science alert. 10 (3923) 3970-3972.

Amude. A.M, Alfieri A.A, y Alfieri A.F. 2006. Antemorten Diagnosis of CDV Infection by RT-PCR in Distemper Dogs With Neurological Deficits Without the Typical Clinical Presentation. Vet Rearc. 30: 679-687.

Arlington. S. H. Graca.D. L. 2000. Canine distemper: epidemiological finding of 250 cases. Braz. J. Vet. Res. Sci. 37 (2).

Bresalier. M, Worboys. M. 2014. “Saving the lives our of dogs” The development of canine Distemper vaccine in interwar britain. BJHC 47(2) 305-335.

Beineken. A, Baumgârtner. W, Wohlsein. P. 2015. Cross-species transmission of canine distemper virus-an update. One health 1(2015) 49-59.

Burgos. V. C. 2009. PCR en tiempo real: la nueva era de la información genética celular. Redvet 10(2): 1-14.

Budaszewki. Renata da Fontoura, Streck. André Felipe, Weber. Matheus Nunes, Siquiera. Franciele Maboni, Guedes Muniz Rafael Lucas, Cana. Wageck. Cláudio. 2016. Influence of vaccine strains on the evolution of canine Distemper virus. J. Infection, Genetics and Evolution. (41) 262-269.

Budaszewsky. R. F, Messling. V.V. 2016. Morbillivirus experimental animal models: Measles virus pathogenesis insights from canine Distemper virus. Viruses 8 (274).

Carvalho. O. V, Botelho.C. V, Ferreira. C. G.T, Scherer. P.O, Martins. J.A, Almeida R. E, Jùnior. A. S. 2012. Inmunopatogenic and Neurologycal Mechanisms of Canine Distemper Virus. Virologic advances.

Castilho. J.G, Brandáo. P. E, Carnieli. P, Oliveira. R.N, Macedo. C.I, Peixoto. M.L, Kotait. C. I. 2007. Molecular Analysis of the N Gene of Canine Distemper Virus in Dogs in Brazil. Med. Vet. Zootec. 59 (3) 654- 659.

Castro. L. C. L. S/A. Actualización en la terapéutica del moquillo canino. Uso del interferon feline. Virbac. No 11.

Cordero. C. A. M. 2013 Molecular Diagnosis of Canine Distemper Virus By Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction of the Viral Nucleocapsid Protein Gene. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile.

Curi. N.H, Massara. R.L, Paschoal. A.M.O, Araùjo. A.S, Lobato. Z.E, Dem étrio.G.R, Chiarello. A.D, Passamani. M. 2016. Prevalence and risk factors for viralexposure in rural dogs around protected áreas of the atlantic forest. Vet. Research 12(21) 1-10.

Chagoya. M. A. C. 1992. Evaluación de pruebas de seguridad con la cepa vacunal Lederle de Distemper canino. Tesis de licenciatura. Universidad de Guadalajara.

Craig E. Greene. 2008. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. (3ra Ed). Inter-médica Buenos aires.28-46.

Demeter. Z, Palade. E. A, Hornyák. A and Rusvaia. M, 2010. Controversial results of the genetic análysis of a canine distemper vaccine strain. Veterinary microbiology 142 (2010) 420-426.

Del Puerto. H, Vasconcelos. A, Moro. L, Fabiana. B, Gissandra. F, Martins. A. 2010. Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. Pesquisa *Veterinária Brasileira*, *30*(2), 132-138.

Di Guardo. G, Stuffler. R, Mazzariol. S. 2016. Commentary: SLAM- and Nectin-4-Independent Noncytolitic Spread of Canine Distemper Virus in Astrocytes. Front. Microbiol 7 (20)11.

Dios. T. L, Ibarra. C y Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigrafic 2(2): 70-78.

Dong. X. Y, Li. W. H, Zhu. J. L, Liu. W. J, Zhao. M, Luo. Y. M, y Chen. J. D. 2014. Detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper virus by a duplex reverse transcription polymerase chain reaction. Iranian J vet Resear 16: 172-175.

Elia. G, D. N, Martella. Vito, Cirone. Francesco, Lucente. M. S, Lorruso. E, Trani. L. D, y Bounavoglia. C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. J. Virol. Meth. 137: 171-176.

Elia. G, D. M, Losurto. M, Lucente. M. S, Larocca. V, Martella. Vito, Decaro. N y Bounavoglia. C. 2014. Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. J. Virol Metd. 213: 127-130.

Espinal. M. A. R, Dìaz.F.J, Saenz. J. R. 2014. Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. Vet. Microbiology 172 (2014) 168-176.

Feng. N, Liu. Y, Wang. J, Xu. W, Li. T, Wang. T, Wang. L, Yu. Y, Wanh. H, Zhao. H, Yang. S, Gao. Y, Hu. G, Xia. X. 2016. Canine distemper vitus isolated from a monkey efficiently replicates on vero cell expresing non-human primate SLAM receptors but not human SLAM receptor. BMC Verterinary Research. 12 (160).

Figueroa. B. A. V. 2015. Determinación de la incidencia de Distemper canino por el método de test rápido CDV en el canton naranjal. Tesis de licenciatura. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil.

Flores. I. M, E. V. G. 2004. Canine ecology and socieconomic factors associated with dogs unvaccinated against rabies in Mexican city across the US-Mexican border. Prev. Vet. Med 62(2) 79-87.

Gámiz. M. C. E, Martinez. J. S, Muñoz. F. C. F. 2012. Identification of new genovariants of canine distemper virus in dog from the State of Mexico by analizing the nucleocapsid gene. Arch Med Vet 44, 53-58.

Galán. A, Gamito. A, Carletti. B, Guisado. A, Mulas. J. E, Pérez. J, Martin. E. M. 2014. Uncommon acute neurologic presentation of canine distemper in 4 adult dogs. Can Vet J 4(55) 373-378.

Gencay. A, Oncel. T, Karaoglu. T, Sancak. A.A, Demir. A.B, Ozkul. A. 2004. Antibody prevalence to canine distemper virus (CDV) in stray dogs in turkey. Red. Med. Vet 155 (8-9) 432-439.

Guiserix. M, Jaber. N. B, Fouchet. D, Sauvage. F, Pontier D. 2007. The canine distemper epidemic in Serengueti: Are lions victims of a new highly

virulent canine distemper canine strains ori s pathogen criculation stochasticity to blame?. J. R. Soc. Interfase. (4) 1127-1134.

Gilbert. M, Miquelle. D. G, Goodrich. J. M, Reeve. R, Cleaveland. S, Matthews. L, Joly. D. O. 2014. Estimating the potencial impact of canine Distemper virus on the Amur Tiger populations *(Panthera Tigris Altaica*) in Russia. PlosOne 9 (10).

Giné R, Roura. X, Rodriguez. A. S, Rey. M. L, Cortadellas. O, Tabar. M. D. 2012. Actualización en diagnóstico y control en enfermedades infecciosas del perro y el gato. IDEXX Laboratories.

Gizzi. A. B. R, Oliveira. S. T, Leuteneger. C. M, Estrada. M, Kosemjazin. D, Marcondes. M, Biondo. A. W. 2014. Presence of Infectious Agents And Co-infections in Diarrheic Dogs Determined With A Real-Time Polymerase chein Reaction-Based Panel. Vet. Research. 10(23) 1746-6148.

Gómez. N y Guide. N. 2010. Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. (1ra Ed). Inter-médica. Buenos Aires. 113-126.

Gutierrez. M. M y Saenz. J. R. 2016. Diversity of susceptible host in canine distemper virus infection: a systematic review and data synthesis. Vet. Resear. 12:78.

Gumley. N. 1999. Update on revaccination protocols. Can. Vet. J. Vol 40. Pag 323-324.

Gray. L. K, Crawford. P. C, Levy. J. K, Dubovy J.E. 2012. Comparison of two assays for detection of antibodys against canine parvovirus and canine distemper virus in dog admitted to a florida animal shelter. Journal of the American veterinary medical association. 240 (9) 1084 – 1087.

Han. Jae-Ik, Chang, Dong-Woo, Na. Ki-Jeong. 2015. A multiplex quantitative real-time polymerase chain reaction panel for detecting neurologic pathogens in dogs with meningoencephalitis. J. Vet Sci. 16 (3), 341-347.

Hammond. J. A, Pomeroy. P. P, Hall. A. J, Smith. V. J. 2005. Identification and real- time PCR quantification of Phocine distemper virus from two

colonies of scottish grey seals in 2002. Journal of General Virology. 86. 2563-2567.

Jamett. G. A, Surot. D, Cortés. M, Valenzuela. V. Vallverdu. A, Ward. M.P. 2015. Epidemiology of canine distemper virus and canine parvovirus in domestic dogs in urban and rural áreas of the Araucania región in Chile. Veterinary Microbiology.

Jara. C, Matus. P y Moreira. R. 2007. Distemper canino en isla Robinson crusoe (Archipiélago Juan Fernández, V región): antecedentes de un brote epidémico 2007.

Jensen. L.G, Agger. J. F, Hammer. A. S, Andresen. L, Chriel. M, Hagberg. M, Jensen. M. K, Hansen. M. S, Hjulsager. C. K. Struve. T. 2015. Associations between Biosecurity and Outbreaks of Distemper Canine On Danisk Mink Farms in 2012-2013. Acta. Vet. Scand 57(66) 1-7.

Jeremiah. T. S, Lehenbauer. T. W. 2001. Monoclonal antibody-based competitive enzyme-linked immonosorbent assay for detectión of Morbillivirus antibody in marina mammal será. Journal of clinical microbiology. 39 (5) 1877-1881.

Yin.Y, Zhang. X, Ma. Y, Quiao. Y, Liu. X, Zhao. K, Zhang. Y, Lin. D, Fu. X, Xu. X, Wang. Y, Wang. H. 2017. Canine distemper virus infection threatens the giant panda population in China. Impact. Journal. 8 (69) 113910-113919.

Labrini. A. V, Kantere. M. A, Kyriaquis. C. S, Dimitra. P, Adamama. M. K, Zoe. P. S. 2017. Evaluation of a direct immonofluorescent assay and/or conjunctival cytology for detection of canine distemper virus antigen. Viral immunology. 0 (0).

Lempp. C, Spitzbarth. I, Puff. C, Cana. A, Kegler. K, Techangamzuwan. S, Baumgarther. W, Seehusen. F. 2014. New aspect of pathogenesis of canine distemper Leukoencephalitis. Viruses J. (6) 2571-2601.

Li. Yi. Cheng. Y, Zhang. M, Cao. Z, Tong. M, Wang. J, Zhao. H, Lin. P, Cheng. S. 2016. Identification of a novel canine distemper virus B-cell epitope

using a monoclonal antibody against nucleocapsid protein. Virus research 213 (1)5.

Li. Z, Zhang Y, Wang. H, Jin. J, Li. W. 2013. Sandwich-dot Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay for The Detection of Canine Distemper Virus. Canadian. J. Vet. Research (77) 303-308.

Ludlow. M, Nguyen. D. T, Silin. D, Lyubomska. O, Vries. R. D, Messling. V. V, Mcquaid. S, Swart. R. L y Duprex. W.P. 2012. Recombinat Canine Distemper Virus Strain Snyder Hill expressing Green or Red Fluorescent Proteins Causes Meningoencephalitis in the Ferret. J. Virology. 1128:7508-7519.

Martinez. J. S, Arvizu. R. A, Soriano. V. E, Fajardo. R. 2018. Identification of a genetic variant of canine distemper virus fom clinical cases in two vaccinated dog in México. Veterinary Journal. (175) 423-426.

Martinez. C. A, Rincón S.E.P. M étodos fisico-quimicos en biontecnologìa. UNAM.

Meeusen. E. N. T, Walker. J, Peters. A, Pastoret. P. P, Jungersen. G. 2007. Current Status of Veterinary Vaccines. Clinical. Microbiology Review 20 (3) 489-510.

Messling. V. V, Harder. T. C, Moening. V, Rautemberg. P, Nolte. I, Haas. L. 1999. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid Protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microb 37(4) 1049-1056.

Morales, M. A. Mora. L. V, Salazar. J. M. 2007. Canine distemper: Survival analysis by age, breed and season. Advan Sci Vet. 12:41-45.

Mora. N. M. Z. 2015. Distemper canino como enfermedad infecciosa y las barreras de defense que se activan durante el proceso infeccioso. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Machala.

Monteiro. F. L, Cargnelutti. J. F, Martins. M, Anziliero. D, Erhardt. M. M, Weiblen. Rudi y Flores. E. F. 2016. Detection of respiratory viruses in shelter dogs maintained under varying environmental conditions. 121:1-6.

Kapil S y Neel T. 2015. Canine Distemper Virus Antigen Detection in External Epithelia of Recently Vaccinated, Sick Dogs by Fluorescence Macroscopy Is a Valuable Prognostic Indicator. J Clin Microbiology. 53: 687-691.

Ke. G. M, Ho. C. H, Chiang. M. G, Duanda. B.S, Chung. C. S, Lin. M. Y, Shi. Y. Y, Yang. M. H, Tyang. Y. C, Liao. P. C, Chu. P. Y. 2015. Phylodynamic Analisis of Canine Distemper Virus Hemagglutinin Gene. Vet. Research 11:164.

Kruth. S.A, Ellis. J.A. 1998. Vaccination of dogs and cats: General principles and duration of immunity. Can. Vet. J. Vol 39. 423-426

Ki-hYun C, Jeongmi K, Hyun A. Y, Dae H. K, Seung Y. P, Chang S. S, In S. C y Joong B L. 2014. Use of hydrophilic extra-viral domain of canine distemper virus H protein for enzyme-linked immunosorbent assay development. Vet. Sci 15: 503-509.

Khosravi. M, Bringolf. F, Silvan. R, Bieringer. M, Schaulles. J. S, Zurbrigen. S, Origgi. F, Plattet. P. 2016. Canine distemper virus fusión activation: Critical role of residue E123 of CD150/Slam. Virologic Journal. Vol 90(3) 1622-1637.

Panzera. Y, Sarute. N, Iraola. G, Hernández. M y Pérez. R. 2015. Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. J mol. Phylo and evol. 92: 147-154. Virol. J. 90(3) 1622-1637.

Pastoret. P, Lombard. M, Schudel. M. 2007. Animal Vaccination. Sci and Tech rev 27(1) 49-62.

Phillips T. R, Jensen. J. L, Rubino. M. J, Yang. W.C, Schultz. R.D. 1989. Effects of vaccines on the canine inmune system. Can. J. Vet. Resear 53: 154-160.

Pinotti. M. A, Gollan. A, Delgado. A, Pacceggi. A, Occhi. H, Blaind. L y Canavesio. M. 2009. Distemper canino. Sci Vet. 8(2): 31-45.

Pope. J.P, Miller. D.L, Matthew. C. R, Anis. E, Wilkes. R. P. 2016. Characterization of a novel canine Distemper virus causing disease in wildlife. J. Vet. Diag. Inv 28(5) 506-513.

Povey R.C. 1986. Distemper vaccination of dogs: Factors wich could cause vaccine failure. Can. Vet. J 27:321-323.

Raurell. X y Centellas. C. 2014. Moquillo canino neurológico. Annardx. No. 3.

Riley. M. C, Wilkes. R. P. 2015. Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. Virol. J 12(219).

Rodriguez. R. A. P. S. 2017. Detección Molecular del virus de Distemper canino en casos clinicos de caninos dom ésticos no vacunados y determinación de los factores de riesgo. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de San Marcos.

Romanutti. C, Calderón. G. C, Keller. L, Mattion y Torre. J. 2015. RT-PCR and sequence analysis of the full-length fusion protein of Canine Distemper Virus from domestic dogs. J virol Meth 228:79-83.

Sarute N, Pérez. R, Francia. L, Hérnandez. M, Bédo. G, Bonilla. B, Guasco. S, Cardeillac. A y Panzera. Y 2011. Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay. Veterinary 47: 7-13.

Thalwizer. S, Wachter. B, Robert. N, Wibbelt. G, Muller. T, Lonzer. J, Meli. M. L, Bay. G, Hofer. H, Lutz. H. 2010. Seroprevalences to viral pathogensin free-ranging and captive Cheetahs (Acinonix jubatus) on Namibian farmland. 17 (2) 232 – 238.

Tizzano.M. A. 2013. Análisis de las propiedades inmunogénicas de las glicoproteínas de envoltura del virus de distemper canino expresadas en Pichia Pastoris. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de la Plata.

Tizard. I. R. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. Editorial Elsevier, 8ª edición. Barcelona, España.

Torrejón J. M. A. 2010. Patogenia del virus del moquillo canino. Sirivs, 1-12.

Sarute. N, Calderón. Gallo. Marina, Pérez. Rubén, La torre. José, Hernández. Lourdes, Panzera. Yanina. 2013. The fusión protein signal-peptide-coding región of canine distempe virus: A useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. J. Plos One. 8(5).

Sarute. N. 2015. Detección del virus de distemper canino por RT-PCR en tiempo real y caracterizaión gen ética de aislamientos del rio de la plata mediante el análisis de los genes de la hemaglutinina y la proteina de fusion. Tesis de maestria. Universidad de la Repùblica de Uruguay.

Sawatsky. B, Wong. X. X, Hinkelmann. S, Cattaneo. R y Messling. V. V. 2012. Canine Distemper Virus Epithelial Cell infection Is Required for Clinical Disease but Not for Immunosuppression. J Virology. 1128: 3658-3666.

Santos de la torre. J. F. 2014. Presencia de anticuerpos contra el virus de distemper canino en perros domésticos (*Canis Lupus Familiaris*) de áreas rurales habitadas por el zorro sechura (Lycalopex Sechurae). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Santos. N, Almendra. C, Tavares. L. 2009. Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. Journal of wild life diasease. 45(1) 221-226.

Swati, Deka. D, Uppal. S.K, Verma. R. 2015. Isolation and philogenetic characterization of canine distemper virus from India. Virus Dis. 26 (3) 133-140.

Sehata. G, Sato. H, Ito. T, Imaizumi. Y, Noro. T, Oishi. E 2015. Use of quantitative real-time RT-PCR to investigate the correlation between viremia and viral shedding of canine distemper virus, and infection outcomes in experimentally infected dogs. 77(7): 851-855.

Seimon. T. A, Miquelle. D. G, Chang T. Y, Newton. A. L, Korotkova. I, Ivanchuck. 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. 4 (4) 410-413.

Stephensen. C.B, Welter. J, Thaker. S, Taylor. J, Tartaglia. J, Paoletti. E. 1997. Canine Distemper Virus (CDV) Infection od Ferrets as a Model for Testing *Morbillivirus* Vaccine Strategies: NYVAC and ALVAC Based CDV recombinants Protect Againts Syntomatic Infection. Journal of Virology. 71(2) 1506-1513.

Sobrino. R, Arnal. M. C, Luco. D. F, Cortázar. C. 2010. Prevalence of antibodies against canine distemper virus and canine parvovirus among foxes and wolves from spain. Veterinary of microbiology. 126 (1-3) 251.

Susuky. J, Nishio. K, Kameo. K, Terada. K, Kuwata. R, Shimoda. H, Suzuky. K, and Maeda. K. 2015. Canine distemper virus infection among wild life before and and after the epidemic. J. Vet Med Sci 77(11)1457-1463.

Y évenes. C. A. V. 2014. Genomic Variability In Fsp Region From Fusion Protein Gene of Canine Distemper Virus: A preliminary study. Tesis de licenciatura. Universidad Austral de Chile.

Vallejo. M.V.G. 2014. Detección molecular de virus asociados con el complejo respiratorio canino en perro del área metropolitana de Monterrey. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Vidaña. V.G. J. 2016. Diagnóstico de Distemper canino por medio de prueba rápida para detección de antígeno en perros. Tesis de licenciatura. Universidad Autonóma Agraria Antonio Narro.

Villalba. S. E. L, Salgado. A. M. C, Garzón. L. H. V. 2010. Diagnóstico de Moquillo Canino con la prueba Dot Elisa*. Vet. Zootec 4(2) 77-84.

Wang. J, Wang. J. Li. R, Liu. L, Yuan. W. 2017. Rapid and sensitive etection of canine distemper virus by real time reverse transcription recombinase polymerase amplification. BMC Veterinary Research. 13 (241) 1180-1187.

Wang. F, Yan. X, Chai. X, Zhang. H, Zhao. J, Wen. J, Wu. W. 2011. Differentiation of canine distemper virus isolates in fur animals from various Vaccine strains by reverse transcription –polymerase chain reaction-restriction fragment lengh polymorphism according to phylogenetic relations in China. Virol. J. 8(85) 1-8.

Wang. F, Yan. X, Chai. X, Zhang. H, Zhao. J, Wen. Y, Wu. W. 2011. Differentiation of canine distemper virus in isolates in fur animals from various vaccine strains by reverse transcription –polymerase chain reaction-restriction fragment leng polymorfhism according to philogenetic relations in china. Virology Journal 8 (85).

Willi. B, Spiri. A. M, Meli. M. L, Grimm. F, Beatrice. L, Riond. B, Bley. T, Jordy. R, Dennler. M, Rehmann. L. H. 2015. Clinical and Molecular Investigaction of Canine Distemper outbreaks and Vector-Borne Infections in a Group od Rescue Dogs Imported From Hungary to Switzerland. Vet research 11(154).

Wilkes. Rebecca. P, Tsai. Yun-Long, Lee. Pei-Yu, Lee. Fu-Chun, Fen. Hiao, Chang. Grace, Wang. Thomas. Hwa-Tang. Rapid and sensitive detection of canine Distemper virus by one-tube reverse transcription-insulated isothemal polymerase chain recation. Veterinary Research 10: 213.

Zhao. J, Shi. N, Sun. Y, Martella. V, Nikolin. V, Zhu. C, Zhang. H, Hu. B, Bai, X y Yan. X. 2015. Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccon dogs, foxes, and minks. J. Antiv Res. 122:1-11.