



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DEL GEN DE LA HEMOAGLUTININA DEL
VIRUS DISTEMPER CANINO MEDIANTE LA REACCIÓN
EN CADENA DE LA POLIMERASA ASOCIADA A
TRANSCRIPCIÓN INVERSA**

**DETECTION OF THE HEMAGGLUTININ GENE FROM
CANINE DISTEMPER VIRUS BY REVERSE
TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION**

PABLO BENJAMÍN JARA BARRÍA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva
Animal

**PROFESOR GUÍA
CARLOS NAVARRO VENEGAS**

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FIV
CODIGO: 121014019102010

**SANTIAGO, CHILE
2011**



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
 ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN DEL GEN DE LA HEMOAGLUTININA DEL
 VIRUS DISTEMPER CANINO MEDIANTE LA REACCIÓN
 EN CADENA DE LA POLIMERASA ASOCIADA A
 TRANSCRIPCIÓN INVERSA**

**DETECTION OF THE HEMAGGLUTININ GENE FROM
 CANINE DISTEMPER VIRUS BY REVERSE
 TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION**

PABLO BENJAMÍN JARA BARRÍA

NOTA FINAL:

Memoria para optar al Título Profesional
 de Médico Veterinario.
 Departamento de Medicina Preventiva
 Animal

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : CARLOS NAVARRO VENEGAS
PROFESOR CONSEJERO: JOSE PIZARRO LUCERO
PROFESOR CONSEJERO: LEONARDO SÁENZ ITURRIAGA

SANTIAGO, CHILE
 2011

RESUMEN

En los últimos años, la aparición de una gran cantidad de casos de distemper canino en animales adultos con su plan de vacunación al día ha alarmado a los médicos veterinarios. Así, los casos de distemper canino se han vuelto una preocupación importante dentro del quehacer clínico veterinario.

El propósito de este trabajo realizado en los laboratorios de Virología y Microbiología del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, fue detectar el gen de la hemoaglutinina del virus distemper canino, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa asociado a transcripción inversa (RT-PCR), como confirmación del diagnóstico clínico de la enfermedad. Para esto se utilizaron muestras de sangre periférica de animales clínicamente enfermos y fueron agrupadas según su fecha de extracción y utilizando vacunas comerciales como control.

Los resultados permiten demostrar una alta sensibilidad de la técnica, además de permitir el uso de las muestras hasta siete días de almacenadas a 4°C, pese a la fragilidad del ARN viral.

La detección del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en muestras de campo y su alta sensibilidad, sugiere estudiar su uso como una herramienta de diagnóstico complementaria al diagnóstico clínico del distemper canino en nuestro país.

PALABRAS CLAVE: distemper canino, hemoaglutinina, diagnóstico temprano.

ABSTRACT

Cases of Canine Distemper have become a major concern within the veterinary clinical work. In recent years, the emergence of a large number of cases has alarmed veterinaries, since they have a special feature, the onset of the disease in adult animals and their daily vaccination schedule.

This work was conducted in the Laboratories of Virology and Microbiology, Department of Animal Preventive Medicine, Faculty of Veterinary and Animal Sciences from the University of Chile and its purpose was to detect the gene for hemagglutinin of Canine Distemper Virus, by use of RT-PCR, confirming the clinical diagnosis of the disease. For this were used peripheral blood samples from dogs clinically ill and were grouped according to their date of collection, as well as commercial vaccines used as controls.

The results demonstrate a high sensitivity of the technique and allow the use of samples stored up to seven days despite the fragility of the viral RNA.

The hemagglutinin gene detection of canine distemper virus suggests a prompt instauration of this molecular tool as complement to the clinical diagnosis of the canine distemper in our faculty.

KEYWORDS: canine distemper, hemoagglutinin, early diagnosis.

Etiología

El virus del distemper canino (VDC) está relacionado taxonómicamente con el virus del sarampión (VS), el virus de la peste bovina, el virus de la peste de los pequeños rumiantes, el virus del distemper de la foca y el virus del distemper del delfín, virus que son clasificados dentro del orden *Mononegavirales*, familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Morbillivirus* (12). Estos virus poseen envoltura y una cadena simple de ARN de polaridad negativa y ARN polimerasa. La lipoproteína de la envoltura es fácilmente destruida por los solventes lipídicos, y de este modo el virus pierde su capacidad infectiva. Posee además la proteína de membrana (M), dos glicoproteínas: la hemoaglutinina (H) y la proteína de fusión (F) que inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, dos proteínas asociadas a transcriptasas (P y L) y la proteína de núcleo cápside (N) que recubre el ARN viral (12).

A pesar de existir algunas diferencias antigénicas entre cepas de VDC demostradas por pruebas serológicas, se acepta generalmente que existe un sólo serotipo. Sin embargo, existen diferencias considerables en cuanto a la patogenicidad de las diferentes cepas aisladas (2).

Epizootiología

El distemper canino (DC) es enzoótico en el mundo y tiene un amplio rango de hospedadores. La mayoría de los carnívoros terrestres son susceptibles a la infección natural por VDC (2), incluyendo a los grandes felinos, que también son susceptibles a la infección y enfermedad por VDC (leones, leopardos y tigres en California en 1992 y leones en Tanzania en 1994) (1).

En Chile, la presencia del DC fue sugerida empíricamente hasta 1994 cuando se informó el primer aislamiento del virus en cultivos celulares inoculados con secreciones de un cachorro canino que presentaba signos nerviosos con mioclonía unilateral, movimientos involuntarios y paresia ascendente del tren posterior. El diagnóstico clínico se corroboró por estudios histopatológicos, microscopía electrónica e inmunofluorescencia directa (5, 16).

La enfermedad

El VDC causa una enfermedad febril, aguda o sub aguda y altamente infecciosa en perros y otros carnívoros. Los casos sobreagudos, caracterizados por aparición repentina de fiebre y muerte súbita son escasos, pero el proceso agudo es frecuente. Tras un período de incubación de tres a siete días, los animales presentan una elevación bifásica de temperatura, que alcanza los 41°C, con un segundo máximo correspondiente a la aparición de una severa leucopenia. Durante esta etapa son frecuentes la anorexia, catarro, conjuntivitis y depresión. Algunos animales presentan signos respiratorios, y otros presentan signos digestivos (15).

Tras el inicio de la enfermedad, algunos perros desarrollan signos nerviosos después de la enfermedad sistémica. Dependiendo de la cepa viral, estos signos pueden relacionarse con la enfermedad aguda (ataques y mioclonía con hiperestesia y depresión) o con la enfermedad sub aguda (incoordinación, ataxia, paresia, parálisis y temblores musculares). Algunas cepas virales producen hiperqueratosis de la almohadilla plantar y de la nariz. (7). Los perros infectados en forma aguda eliminan virus a través de todas las secreciones corporales. La ruta más importante de transmisión es a través de aerosoles de secreciones respiratorias (2). Esta eliminación de virus comienza aproximadamente a los siete días pos infección (PI). Los perros que se recuperan después de la infección por VDC no son inmunes de por vida, no permanecen persistentemente infectados ni eliminan virus (13).

Diagnóstico

Existen variadas técnicas para el diagnóstico del DC, entre ellas se encuentran: el diagnóstico histológico, donde pueden encontrarse cuerpos de inclusión en células de las mucosas oral y conjuntiva; el análisis del líquido céfalo raquídeo, donde es habitual que perros con compromiso nervioso tengan aumentada la concentración de proteínas y células mononucleares; o la prueba de ELISA para IgM específica, donde se buscan anticuerpos específicos para el virus. Sin embargo, algo que todas las pruebas comparten es la aparición de falsos positivos, cuando se realizan poco tiempo después de la vacunación del ejemplar. En el caso de resultados negativos, tampoco se puede afirmar la ausencia de la enfermedad,

ya que tanto en etapas tempranas de la infección como en muy tardías estas pruebas demuestran una sensibilidad muy baja, por lo que son solo aproximaciones diagnósticas.

Dentro de los diagnósticos definitivos destacan el aislamiento viral, que no constituye una técnica rutinaria dentro de los laboratorios diagnóstico y la técnica de RT-PCR, la cual permite detectar de manera más sensible la presencia del virus (2).

Actualmente, el diagnóstico del DC en Chile sigue principalmente en manos de la signología clínica, por lo cual aun no se ha informado de estudios que permitan detectar diferencias entre aislados nacionales de VDC a nivel genómico, antigénico o biológicos que pudieran explicar algo preocupante: la presentación del cuadro clínico en perros con su programa de vacunación al día.

Vacunas

El VDC se caracteriza por dañar la inmunidad innata y adaptativa desde momentos iniciales del cuadro infeccioso debido a su elevado linfotropismo y capacidad de generar cambio de funciones esenciales en células inmunes. Se ha descrito que los virus atenuados utilizados actualmente en vacunas vivas modificadas mantienen su linfotropismo y capacidad de inducir inmunosupresión, comprometiendo el equilibrio de las respuestas previamente mencionadas (6, 17).

En Chile, se aconseja vacunar con vacuna monovalente entre las diez y doce semanas; a las catorce o dieciséis semanas y a las veinticuatro semanas. Al utilizar la vacuna séxtuple (VDC, leptospira, virus hepatitis 1 y 2, parvovirus canino tipo 2 y parainfluenza tipo 2) el esquema aconseja aplicar la vacuna parvovirus a los ocho semanas; a las diez semanas la vacuna séxtuple y a las dieciséis semanas la vacuna séxtuple. La vacuna recombinante óctuple se aplica desde las seis semanas de edad y cada veintiún días hasta las doce semanas (tres dosis) (3).

En esta memoria de título se planteó como objetivo general detectar el gen de la hemoaglutinina (H) del virus Distemper canino, mediante RT-PCR, como confirmación al diagnóstico clínico de la enfermedad. Para esto se propuso: 1) detectar el gen de la Hemoaglutinina en vacunas comerciales NOBIVAC® PUPPY y CANIGEN MHA2PPi/L para VDC mediante RT-PCR, usadas como cepas de referencia y 2) detectar el gen de la Hemoaglutinina de VDC obtenido de muestras clínicas sospechosas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño experimental utilizado en este trabajo contempló la detección del gen H del VDC en muestras sanguíneas “frescas” (una semana de obtenidas) y muestras con uno o más meses de obtenidas.

Muestras.

Se tomaron treinta muestras consistentes en 2 mL de sangre periférica de perros de cualquier edad y sexo, sospechosos de estar cursando la enfermedad y positivos a la prueba de IgM específica para VDC. Para este efecto, se contó con el apoyo del Laboratorio Veterinario de Santiago, del Instituto Neurológico Veterinario y del laboratorio Vet-lab®. Las muestras con y sin anticoagulante fueron refrigeradas a 4°C para su posterior extracción. Como control positivo se utilizaron dos vacunas comerciales CANIGEN MHA2PPi/L (10^{3-5} DICT₅₀) y NOBIVAC® PUPPY (DIC50³⁻⁵) que contienen las cepas Lederle y Onderstepoort.

a) **Detección del gen de la hemoaglutinina en vacunas comerciales y aproximación a la sensibilidad expresada por la técnica.** Para este efecto, se utilizó la vacuna CANIGEN MHA2PPi/L (10^{3-5} DICT₅₀), la cual se reconstituyó en 1 ml de agua libre de nucleasas y se prepararon diluciones al décimo (10^{-1} a 10^{-7}), es decir desde un intervalo entre 50 y 0.5 DICT₅₀ hasta un intervalo entre 0,005 y 0,00005 DICT₅₀ para obtener una aproximación a la sensibilidad de la prueba diagnóstica frente a las cepas antiguas del VDC.

b) **Muestras de uno o más meses de antigüedad:** Se procesaron veinte muestras que fueron agrupadas en cuatro grupos con 5 muestras cada uno: muestras con anticoagulante de un mes de antigüedad, muestras sin anticoagulante de un mes de antigüedad, muestras con anticoagulante de dos o más meses de antigüedad y muestras sin anticoagulante de dos o más meses de antigüedad

Así, las muestras contenidas en tubos con anticoagulante fueron homogeneizadas suavemente, se tomó una alícuota de 250 uL y separadas en tubos, luego todas las muestras fueron centrifugadas a 200G por diez minutos. Se separó suero o plasma y su capa flogística. Se prepararon alícuotas de 250 uL y se procedió a la extracción de ARN.

c) **Muestras de una semana de antigüedad.** Se procesaron ocho muestras correspondientes a muestras clínicas de una semana de antigüedad almacenadas en tubos con anticoagulante y dos vacunas comerciales. Así, las muestras fueron homogeneizadas suavemente, se tomó una alícuota de 250 uL y separadas en tubos, luego se utilizó el producto Histopaque © 1077, Sigma-Aldrich® para la obtención de la capa flogística de la muestra y así obtener mayor concentración viral para proceder a la detección del virus. Se prepararon alícuotas de 250 uL y se procedió a la extracción de ARN. Paralelamente, dos muestras de una semana de antigüedad distintas a las anteriores, almacenadas en tubos con anticoagulante, positivas frente al kit de PCR utilizado por Vet-lab®, fueron procesadas para hacer la comparación en la sensibilidad de detección desde la muestra directa y una muestra siguiendo el protocolo para la extracción de la capa flogística.

Extracción ARN Viral.

El ARN viral se obtuvo mediante un kit de extracción (Trizol LS, Invitrogen®). Brevemente, 250 uL de muestra se mezclaron con 750uL de reactivo trizol. Se dejó a temperatura ambiente (TA) durante cinco minutos y posteriormente se agregaron 0,2 mL de cloroformo. Se mezclaron vigorosamente por quince segundos y se dejó en reposo a TA durante cinco minutos.

Posteriormente, se centrifugó a 7000G por quince minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregó un volumen de isopropanol. Se dejó a TA durante diez minutos y se centrifugó a 7000G durante diez minutos. Luego se eliminó el sobrenadante, se lavó tres veces con etanol (1mL; etanol 75%), se agitó mediante vortex por quince segundos y se centrifugó a 2000G durante cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante, el precipitado se secó al vacío durante diez minutos y se resuspendió en 100uL de agua estéril, libre de nucleasas. Finalmente, el ARN se incubó a 55-60° C por diez minutos y se guardó a -20°C.

RT-PCR.

Para la ejecución de esta técnica se empleó un termociclador Apollo (CLP, USA) de 96 pocillos de 0,2 ml.

La región a amplificar se encuentra ubicada en el gen de la hemoaglutinina del VDC. Para ello se utilizaron los partidores CDV H13: 5'-CAAGACAAGGTGGGTGCCTT-3' y CDV H18: 5'-CTTGGTGAAATCG AACTCCA-3', que se adhieren entre el nucleótido 7091-7110 y entre el 7265-7246 respectivamente, los cuales generan un fragmento de ADN de 174 pares de bases (pb) (10).

Mezcla de reacción.

En la reacción RT-PCR se utilizó el kit "SuperScript one step RT-PCR with platinum Taq" (Invitrogen®) siguiendo el protocolo propuesto por la empresa, el cual consistía en 25 uL del componente "2x Reaction Mix", el cual contiene 0.4 mM de cada desoxiribonucleótido y 3.2 mM de MgSO₄, 2uL de "SuperScript. III RT/ Platinum Taq Mix", 2uL de cada partidor y 19 uL del templado de ARN para llegar a un volumen final de 50uL.

Protocolo

El protocolo contempló una incubación a 50°C durante cuarenta minutos, luego a 94°C durante dos minutos, para después llevar a cabo treinta y cinco ciclos (94°C por un minuto; 55°C durante dos minutos; 72°C por dos minutos) y una extensión final a 72°C durante dos minutos (14). Los partidores fueron encargados a Bioscan® para su síntesis.

Visualización de productos amplificados:

La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Winkler®) al 2% en buffer Tris acetato EDTA (TAE) (Fermentas®) y posterior tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) (Fermelo®) durante treinta minutos.

RESULTADOS

Detección del gen H de VDC en vacunas comerciales NOBIVAC® PUPPY y CANIGEN MHA2PPi/L. Se visualizaron 2 bandas correspondientes a un fragmento de ADN de aproximadamente 174 pb, en los carriles de ambas vacunas comerciales (Figura I).

Detección del gen H de virus distemper canino en muestras almacenadas con una semana de antigüedad. Se logra visualizar un fragmento de aproximadamente 174 pb, tanto en los controles positivos como en cinco de seis muestras clínicas (Figura I).

Efecto del tiempo de tinción del gel de agarosa sobre la sensibilidad de detección de la técnica de RT-PCR. Al estudiar el efecto del tiempo de tinción sobre la sensibilidad de detección del RT-PCR, se pudo determinar que con 60 minutos de tinción se pudo detectar 5/6 muestras positivas a VDC, sin embargo, con 30 minutos de tinción, las seis muestras clínicas fueron negativas (Figuras I y II).

Aproximación a la sensibilidad de la técnica. Al realizar siete diluciones al décimo desde 10^{-1} hasta 10^{-7} a partir de la vacuna comercial CANIGEN MHA2PPi/L con 10^{3-5} DICT₅₀, y una tinción en bromuro de etidio de sesenta minutos se visualizaron bandas hasta una dilución de 10^{-6} DICT₅₀, es decir entre 0.0019 y 0.000019 DICT₅₀ (Figura III y IV).

Uso de Histopaque © 1077 (Sigma-Aldrich®). Al estudiar el efecto de la influencia del Histopaque © 1077 sobre la sensibilidad de la técnica, se observó que ambas muestras clínicas extraídas con Histopaque © 1077 resultaron positivas por RT-PCR, y solo una de ellas resultó positiva por extracción desde la muestra directa (Figura III).

Detección del gen H de virus distemper canino en muestras almacenadas con un mes o más de antigüedad. Las 20 muestras no presentaron bandas visibles en el transiluminador de luz UV. Solo en el caso de los controles positivos (vacunas comerciales) se logró la visualización de un fragmento de ADN de aproximadamente 174 pb (la imagen de los resultados no fueron adjuntadas en el trabajo).

DISCUSIÓN

Los casos de Distemper canino (DC) son una preocupación importante dentro del quehacer clínico veterinario. Así, en los últimos años, la aparición de una gran cantidad de casos ha alarmado a los médicos veterinarios, ya que estos poseen una característica especial, la aparición de la enfermedad en animales adultos y con su plan de vacunación al día. Esto lleva a la búsqueda de un método de diagnóstico confirmatorio de DC y que además permita el tratamiento oportuno de la enfermedad (10).

Mundialmente los casos de DC han sido asociados a un plan de vacunación mal realizado, o a la sospecha de una virulencia residual en las vacunas (11).

La técnica de RT-PCR para la detección del gen de la hemoaglutinina, fue seleccionada debido a que esta proteína expresada por el virus es la encargada de generar la respuesta inmune en el organismo, además de ser usada mundialmente para su diagnóstico (8).

El gen de la hemoaglutinina es el que posee una mayor variación, alcanzando un 10%, usándose generalmente para el establecimiento de árboles filogenéticos del virus (4).

En esta memoria se logró amplificar un fragmento de 174 pb tanto en muestras clínicas como en cepas vacunales, lo que permitiría su uso como una herramienta diagnóstica confirmatoria del diagnóstico clínico, como alternativa del kit diagnóstico de la empresa BioingenTech®, utilizado actualmente, independientemente de que en este kit al parecer se esté detectando un gen distinto: el gen N (18).

Los resultados sugieren una alta sensibilidad de la técnica implementada en esta memoria, que permitiría el uso de muestras de sangre de hasta siete días de haber sido extraídas desde el animal, pese a la fragilidad del ARN viral (15).

En relación a la detección del fragmento de 174 pb en las vacunas comerciales, se pudo realizar una estimación de la sensibilidad de la técnica y los resultados muestran una alta sensibilidad. RT-PCR diseñadas para el mismo segmento génico, alcanzan a detectar hasta 10^3 copias del ARN viral, sin embargo la estrategia utilizada en esta memoria impiden comparar ambos valores (12).

La utilización del reactivo Histopaque © 1077 (Sigma-Aldrich®), logró aumentar la sensibilidad de la técnica, convirtiéndose en un paso recomendado dentro del protocolo. Esto se debe a que permite separar la capa flogística de una muestra sanguínea, lugar donde se ubican las células de la línea blanca, blanco de infección del VDC, obteniendo así una mayor concentración viral.

Uno de los puntos críticos que deben tomarse en cuenta durante el proceso de la técnica es el tiempo de incubación en bromuro de etidio. En esta memoria se pudo establecer que al aumentar el tiempo de tinción del material genómico al doble (60 minutos), se pudo aumentar notablemente la sensibilidad de la técnica. Como este reactivo es de carácter cancerígeno, una alternativa a estudiar es el uso de un producto análogo como GelRed Nucleic Acid Gel Stain TM. Sin embargo, habría que analizar el efecto sobre la sensibilidad de la técnica.

Si bien, existen variaciones en el gen H representadas por sustituciones aminoacídicas críticas en epitopos clave de la proteína H, al parecer el fragmento de 174 pb es una buena elección como blanco de detección en muestras clínicas y probablemente la visualización de las bandas de ADN puedan ser mejoradas al aumentar de 35 a 40 ciclos en la etapa de del PCR, modificando el protocolo utilizado (14).

Este trabajo permitió la detección molecular para DC, lo cual representa un primer paso hacia la caracterización molecular de VDC en Chile. Es recomendable en un trabajo futuro, obtener las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de ADN obtenidos de las muestras clínicas y compararlas con aislados de VDC disponibles en GenBank®, base de datos internacional, tanto para confirmar la presencia del virus en las muestras, como para caracterizar genómicamente los aislados nacionales del VDC.

Además, se sugiere: a) comparar la sensibilidad de este protocolo con el kit “PCR Canine distemper virus kit” (BioingenTech®) para dilucidar si el protocolo presentado es de una sensibilidad comparable a la del kit comercial; b) realizar estudios de antigenicidad entre las cepas vacunales y los aislados nacionales del virus, pues se ha demostrado que animales enfermos pueden llegar a generar títulos neutralizantes frente a cepas de campo hasta diez veces más altos que frente a cepas vacunales (9).

CONCLUSIONES

La RT-PCR implementada en esta memoria de título fue capaz de detectar un fragmento específico del gen de la hemoaglutinina del VDC tanto de vacunas comerciales, usadas como controles positivos, como de muestras clínicas obtenidas desde perros infectados.

La RT-PCR es capaz de detectar el VDC desde muestras sanguíneas frescas y con siete días desde la extracción de la muestra.

La sensibilidad de la técnica aumenta considerablemente al incluir el reactivo Histopaque © 1077 (Sigma-Aldrich®) en el proceso de extracción del genoma viral.

El tiempo de tinción del material genómico obtenido post-PCR en bromuro de etidio es de gran importancia en la sensibilidad de la técnica, sugiriéndose no menos de 60 minutos como tiempo óptimo de tinción.

La técnica de RT-PCR implementada en esta memoria de título permitiría la detección de hasta 0.0019 - 0.000019 DICT₅₀ de la cepa vacunal Lederle, presente en la vacuna comercial CANIGEN MHA2PPi/L.

ANEXOS

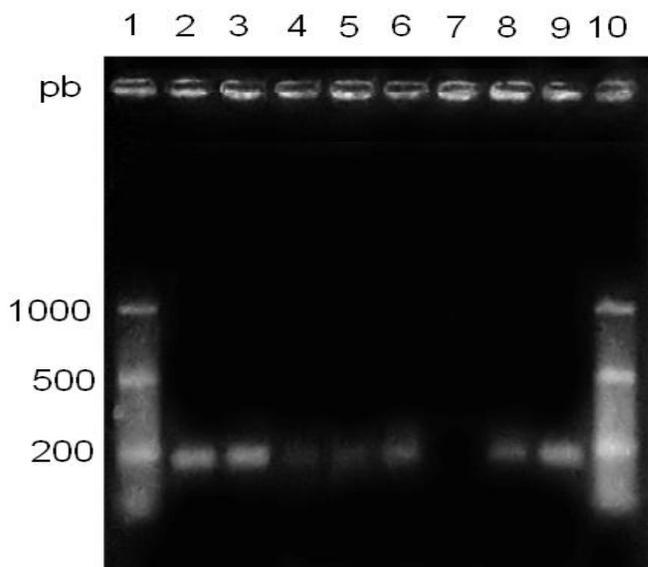


Fig. I. Detección del gen de la hemoaglutinina en muestras clínicas, con 60 minutos de tinción. Carril 1 y 10, marcador de tamaño molecular de 50 a 1000 pb.; carril 2, vacuna CANIGEN MHA2PPi/L; carril 3, vacuna NOBIVAC® PUPPY; carriles 4-9, muestras clínicas, con anticoagulante, de una semana de antigüedad.

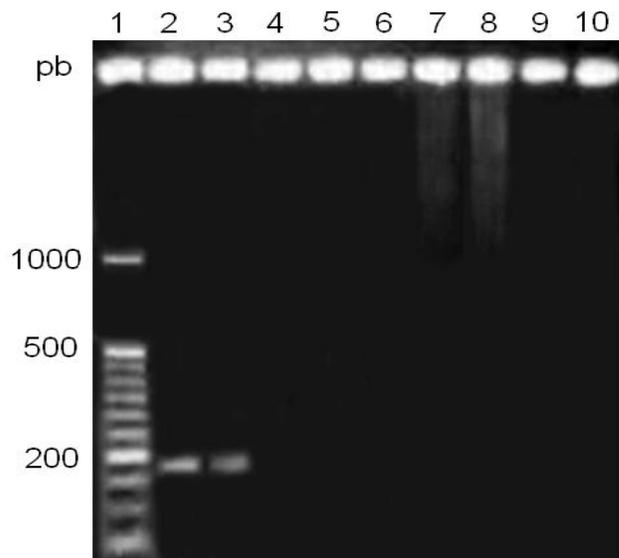


Fig. II. Detección del gen de la hemoaglutinina en muestras clínicas, con 30 minutos de tinción. Carril 1, marcador de tamaño molecular de 50 a 1000 pb.; carril 2, vacuna CANIGEN MHA2PPi/L; carril 3, vacuna NOBIVAC® PUPPY; carril 4-10, muestras clínicas, con anticoagulante, de una semana de antigüedad.

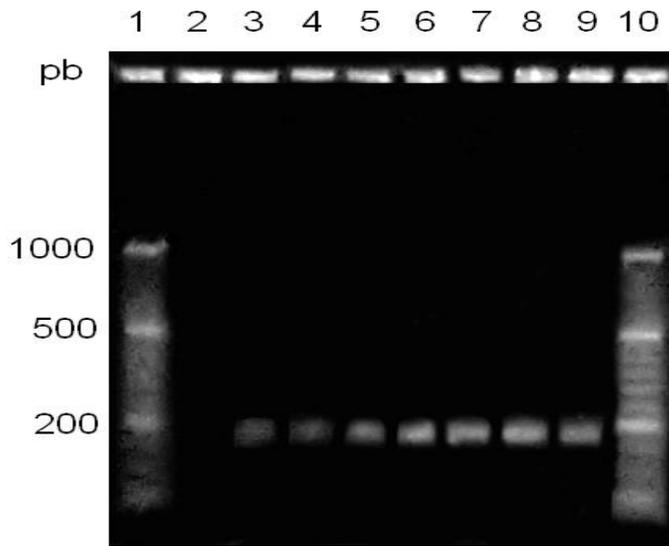


Fig. III. Comparación de sensibilidad de detección del gen de la hemoaglutinina, con tinción de 60 minutos. Carril1, marcador de tamaño molecular; carriles 2 y 4, muestra clínica directa; carriles 3 y 5, muestras procesadas con protocolo Histopaque (comparación entre 2/3 y 4/5); carriles 6-9, vacuna CANIGEN MHA2PPi/L diluida desde 10^{-1} a 10^{-4} .

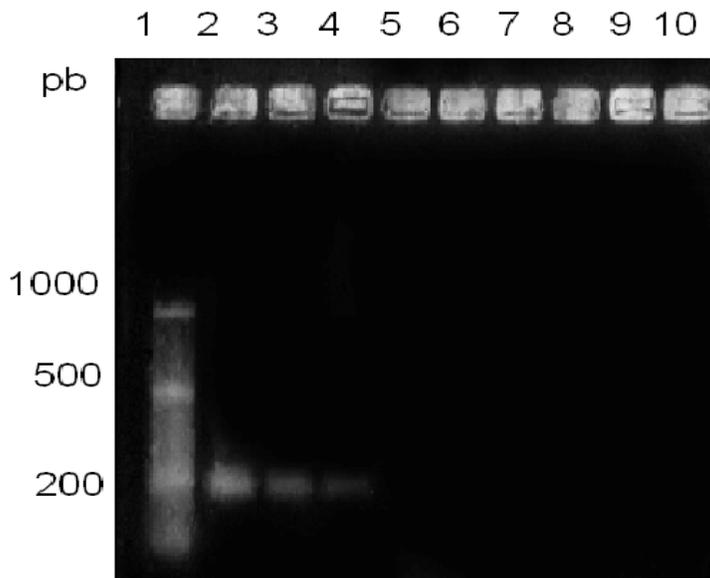


Fig. IV. Comparación de sensibilidad en detección del gen de la hemoaglutinina, con tinción de 60 minutos. Carril1, marcador de tamaño molecular; carril 2, vacuna CANIGEN MHA2PPi/L; carriles 3 y 4, vacuna CANIGEN MHA2PPi/L diluida desde 10^{-5} a 10^{-6} .

BIBLIOGRAFÍA

1. **APPEL, M.; YATES, R.; FOLEY, A.** 1994. Canine distemper virus epizootic in lions, tigers and leopards in North America. *J Vet Diagn Invest* 6: 277–288.
2. **APPEL, M.; SUMMERS, B.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol* 44: 187–191.
3. **BERRÍOS, P.; DURÁN, C.** 2005. Principales enfermedades virales de los caninos. Situación en Chile. *Monogr. Electron. Patol. Vet.* 2:68-93
4. **BLIXENKRONE-MØLLER, M.; SVANSSON, V.; APPEL M.; KROGSRUD, J.; HAVE, P.; ORVELL, C.** 1992. Antigenic relationship between field isolates of morbilliviruses from different carnivores. *Arch. Virol.* 123:279–294.
5. **CERDA, L.; MATHIEU, C.; QUINTEROS, G.** 1994. Primer aislamiento de virus distemper canino en Chile. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias.; Acapulco.; México.
6. **CESPEDES, PF.; CRUZ, P.; NAVARRO, C.** 2010. Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Arch Med Vet* 42: 15-28.
7. **FENNER, F.; BACHMANN, PA, GIBBS, EP.; MURPHY, FA.; STUDERT, MJ.; WHITE, DO.** 1992. *Virología Veterinaria*. Pp 349-386. Editorial Acribia, España.
8. **GEMMA, T.; MIYASHITA, N.; SHIN, Y.-S.; OKITA, M.; MORI, T.; IWATSUKI, K., MIKAMI, T. & KAI, C.** 1995. Serological survey of canine distemper virus infection using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Veterinary Medical Science* 57, 761±763.
9. **HARDER, T.; KENTER, M.; VOS, H.; SIEBELINK, K.; HUISMAN, W.; VAN AMERONGEN, G.; O' RVELL, C.; BARRETT, T.; APPEL, M.; OSTERHAUS, A.** 1996. Canine distemper virus from diseased large felids: biological properties and phylogenetic relationships. *J. Gen. Virol.* 77, 397–405.
10. **IWATSUKI, K.; MIYASHITA, N.; YOSHIDA, E.; GEMMA, T.; SHIN, Y.; MORI, T.; HIRAYAMA, N.; KAI, C.; MIKAMI, T.** 1997. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *Journal of General Virology* 78, 373–380
11. **MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M.; BELLACICCO, A.; BLIXENKRONE-MØLLER, M.; CARMICHAEL, L.; BUONAVOGLIA, C.** 2006. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology* 116, 301–309
12. **MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, MS.; BELLACICCO, A.; BLIXENKRONE-MØLLER,**

- M.; CARMICHAEL, LE, BUONAVOGLIA, C.** 2007. Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. *Vet Microbiol* 122: 32–42
13. **MELLA, N.** 1979. Determinación de cuerpos de inclusión del virus del distemper en perros vacunados. Memoria Título Médico Veterinario. Chillán, Chile. Universidad de Concepción. 37 p.
 14. **MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURO, S.** 1999. Genotypes of canine distemper virus determined by analysis of the hemagglutinin genes of recent isolates from dogs in Japan. *J Clin Microbiol* 37:2936-2942.
 15. **MURPHY, F.; GIBBS, E.; HORZINEK, M.; STUDDERT, M.** 1999. *Veterinary Virology: The Third Edition.* Elsevier. California, USA. 629p.
 16. **NAVARRO, C.; PIZARRO J.; CELEDÓN M.** 2002. Virus distemper canino en Chile. XII Congreso Nacional de Medicina Veterinaria, Chillán, Chile.
 17. **SEREDA, AD.; GAVRILOV, KE.; FUGINA, LG.** 1999. Distemper of carnivore: proliferative activity of lymphocytes in sick and vaccinated dogs. *Vopr Virusol.* 44: 257-261
 18. **SHIN, Y.; MORI, T.; OKITA, M.; GEMMA, T.; KAI, C.; MIKAMI, T.;** 1995. Detection of canine distemper virus nucleocapsid protein gene in canine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 439–445