

2016

Caracterización molecular de genotipos vacunales y de campo del virus del distemper canino en Bogotá D.C. Colombia

Norma Rocio Forero Muñoz
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria



Part of the [Veterinary Medicine Commons](#)

Citación recomendada

Forero Muñoz, N. R. (2016). Caracterización molecular de genotipos vacunales y de campo del virus del distemper canino en Bogotá D.C. Colombia. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/187

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Medicina Veterinaria by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE GENOTIPOS VACUNALES Y DE
CAMPO DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO EN BOGOTÁ D.C. –
COLOMBIA

Norma Rocio Forero Muñoz

Tutor.

Paola Barato, PhD

Universidad de La Salle

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Programa de Medicina Veterinaria

Bogotá DC. – Colombia

2016

Contenido

1. Introducción	5
2. Resumen.....	7
3. Planteamiento del problema	8
4. Objetivos	10
4.1 Objetivo general.....	10
4.2. Objetivos específicos.....	10
5. Hipótesis.....	11
6. Materiales y métodos	12
6.1 Muestras	12
6.2 RT-PCR.....	12
6.3 Secuenciación, alineamiento y análisis filogenético.....	13
7. Marco teórico.....	14
7.1. Historia	14
7.2. Características virales y replicación celular	14
7.3 Patogénesis.....	17
7.4 Huéspedes.....	19
7.5. Epidemiología	20
7.6. Diagnóstico.....	21
7.7. Interés en salud publica.....	22
8. Resultados.....	24
8.1 Secuenciación y análisis del gen <i>fsp</i>	24
8.2. Sintomatología clínica	24
8.3. Muestra según la sintomatología.	26
8.4 Raza y género	27
9. Discusión	28
9.1 Variedad filogenética de CDV	28
9.2. RT-PCR para CDV	29
9.3 Sintomatología de CDV asociado a la edad.....	30

9.5. Vacunación.....	31
10. Impacto e indicadores.....	32
11. Referencias.....	33

Tabla de Figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de una partícula de CDV en corte transversal.....	15
Figura 2. Diagrama esquemático de una partícula CDV en corte transversal, inoculando el material genético viral al citoplasma de la célula huésped.	16
Figura 3. Diagrama esquemático de replicación intracelular del virus CDV.....	16
Figura 4. Mapa filogenético del virus de distemper canino con el análisis del gen fsp	24
Figura 5. Casos de CDV por edad	25
Figura 6 Presentación de CDV por edad y síntomas	26
Figura 7. Relación tipo de muestra con sintomatología.....	27
Figura 8 Mapa político de Sur América con especies infectadas con CDV caracterizados con el gen H y los linajes descritos para cada país (Panzer et al., 2014)	29

Agradecimientos.

Se dice popularmente “Si quieres ir rápido, ve solo. Si quieres llegar lejos, ve acompañado”, por lo tanto los agradecimientos incluirían un gran grupo de personas que me han acompañado a lo largo de no solo la realización de mi carrera sino de mi vida en general.

Inicialmente agradezco a la doctora Paola Barato, directora científica de Corpavet, cuyo esfuerzo, comprensión, acompañamiento, entre otros, la convirtieron en un excelente modelo a seguir por su compromiso, dedicación y cualidades humanas que la caracterizan.

Debo resaltar el equipo de Corpavet, pues su acompañamiento me permitió llegar cada vez más lejos en la realización de este trabajo.

La universidad de la Salle, como fuente de formación personal y profesional; destacando a los docentes, amigos, compañeros u otros, que participaron en algún momento de mi vida y ocuparon un espacio en esta experiencia.

Finalmente, la labor de mi familia por su apoyo en todos los momentos de mi vida.

1. Introducción

El distemper canino es una enfermedad sistémica inmunosupresora con altas tasas de morbilidad y mortalidad en cachorros. A pesar de que existen programas de vacunación contra la enfermedad, se ha encontrado la emergencia de casos en pacientes inmunizados y hay evidencia científica de divergencias entre los genotipos vacúnales y los nuevos linajes genéticos circulantes en Suramérica que podrían explicar las deficiencias en la vacunación (Panzer et al., 2014). En Colombia solo existe un estudio de caracterización molecular entre las cepas de campo de distemper canino y cepas vacúnales en el Valle de Aburrá (Espinal et al., 2014), en el resto del país no se ha hecho dicha investigación. Esta propuesta busca determinar la variabilidad genotípica del virus de distemper canino vacunal y de campo en Bogotá D.C. y comparar la información con los reportes de los genotipos circulantes del virus en Colombia y Sur América.

2. Resumen

El virus del Distemper Canino (CDV) causa una enfermedad altamente contagiosa que afecta a varias especies de carnívoros domésticos y silvestres. El gen H ha sido el más utilizado para caracterizar filogenéticamente genotipos de distemper, sin embargo, recientemente se ha encontrado que el gen fsp tiene un alto poder de divergencia y permite realizar análisis filogenéticos con mayor facilidad que los realizados con el gen H. Actualmente, se reconocen en el mundo 11 genotipos circulantes, siendo Sur América la región con mayor diversidad de cepas de CDV. A partir de muestras de caninos de Bogotá- Colombia, se realizó un análisis filogenético con el gen fsp de las cepas de CDV colombianas con otros virus de CDV aislados en diferentes partes del mundo, incluyendo las cepas vacunales. Los resultados sugieren que en la población de caninos domésticos de Bogotá circula una variante genética del virus del distemper canino, no reportada previamente con la caracterización del gen fsp, que denominamos SA4. Un genotipo similar fue descrito en el valle de Aburrá pero con la caracterización del gen H, que es altamente divergente de las cepas vacunales y otros linajes reportados hasta el momento.

3. Planteamiento del problema

Ha sido demostrado el impacto benéfico que tienen las mascotas en el bienestar físico y emocional de sus propietarios, así como el creciente número de caninos que hacen parte de las familias actualmente, en el ámbito mundial y colombiano (Westgarth *et al.*, 2007). Solo en Bogotá, se calcula que hay 1 perro por cada 10 habitantes, siendo entonces 775.000 caninos de los cuales 90.000 son callejeros (Concejo de Bogotá, 2006). Parte de la responsabilidad que asumen los dueños que adoptan o compran una mascota, está en el cuidado de la salud de la misma que afecta directamente a quienes conviven con ella. Una de las enfermedades que mayor mortalidad y morbilidad representa para los cachorros y perros viejos es el distemper o moquillo (Martella *et al.*, 2008). Aunque el distemper no es zoonótico, las diferentes formas clínicas inmunosupresoras de la enfermedad (respiratoria, nerviosa y/o digestiva), conllevan riesgos para la salud humana por la presentación concomitante con infecciones por *Salmonella*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Bordetella bronchiseptica* y/o *Toxoplasma*, de las que ha sido demostrada su transmisión a humanos sanos e inmunocomprometidos a partir de los caninos (Fukushima and Helman, 1984; Turnwald *et al.*, 1988; Svobodová *et al.*, 1995; Toman *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2006; Mani *et al.*, 2009; Sykes, 2010).

A pesar de contar con vacunas y programas de vacunación contra el virus del distemper canino (morbillivirus) desde hace más de 60 años, en el mundo y en Colombia es común encontrar casos clínicos en pacientes caninos inmunizados (González HE, 1984; Rico, *et al.*, 2001; Pardo *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2007; Martella *et al.*, 2008). Diversos factores pueden llevar al fracaso de la vacunación, entre ellos la ruptura de la cadena de frío para la conservación del inmunógeno, el mal manejo de los protocolos de vacunación o la desconocida diversidad genotípica del virus en nuestro país que no sería cubierta por las cepas vacúnales disponibles. Fuertes campañas y normas han sido establecidas para asegurar y mantener la cadena de frío en la manipulación de la vacuna. Se ha capacitado al cuerpo médico veterinario en el adecuado seguimiento del protocolo de vacunación, para evitar que la inmunidad pasiva de origen materno impida la inmunización activa de los cachorros y que en caninos seniles se mantenga el protocolo de inmunización teniendo en cuenta su edad de riesgo. Sin embargo, falta aún implementar métodos

de diagnóstico molecular del distemper que nos permitan conocer diferencias genéticas entre la cepa vacunal importada y las cepas de campo que pudieran aportar explicaciones al fracaso parcial de la vacunación en el ámbito local.

En Suramérica han sido descritos cuatro linajes genéticos del distemper canino, ellos son: Europa1/South America1 (Uruguay, Brasil y Argentina), South América 2 (Argentina), South América 3 (Ecuador) y South América 4 (Colombia) (Calderón et al., 2007; Panzera et al. 2012; Espinal et al., 2014; Panzera et al., 2014; Sarute et al., 2014). La presencia en Suramérica de tres linajes únicos y un cuarto linaje intercontinental (EU1/SA1) sugiere la alta diversidad genética del virus del distemper canino en este continente. Adicionalmente los genotipos descritos en Colombia, únicamente pertenecen a 15 cepas del Valle de Aburrá y estudios filogenéticos en otras ciudades de Colombia son necesarios para confirmar la similitud o diferencia entre los genotipos presentes en el norte de Suramérica (Espinal et al., 2014).

La ausencia de conocimiento local y regional de los genotipos virales circulantes de distemper canino en campo y su comparación con los genotipos vacúnales, abren una brecha incierta que le resta certeza al rango de protección de los inmunógeno. Implementar el diagnóstico molecular de distemper canino en Colombia e identificar si los genotipos de campo son similares a aquellos con los que actualmente se protege, permitirá fortalecer los programas de diagnóstico y vacunación en nuestro país. En el caso de encontrar variantes genotípicas, este conocimiento aportará al desarrollo de nuevos inmunógeno que permitan la ampliación de la capacidad de protección de las vacunas que actualmente se encuentran disponibles en Colombia y en Suramérica (Calderón *et al.*, 2007; Simon-Martínez *et al.*, 2008; Panzera *et al.*, 2012; Espinal et al., 2014; Sarute et al., 2014).

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad genotípica del virus de distemper canino vacunal y de campo en Bogotá D.C.

4.2. Objetivos específicos

2.2.1. Amplificar el gen *fsp* (fusión protein signal-peptide) del virus del distemper canino de casos de campo y cepas vacunales

2.2.2. Comparar y establecer posibles variantes genotípicas de cepas de campo con las cepas vacunales, por medio de técnicas de bioinformática.

5. Hipótesis

Existen variantes genotípicas con más del 3% de divergencia en la secuencia del gen *fsp* del virus del distemper canino de campo y vacúnales en Bogotá D.C.

6. Materiales y métodos

6.1 Muestras

A partir de 48 muestras del banco de muestras de Corpavet y Universidad de La Salle de caninos con resultado positivo por RT-PCR para la amplificación del gen *N* (nucleocápside) de CDV, se eligieron 13 que correspondían a 7 eventos epidemiológicos organizados de acuerdo con los criterios presentados en la tabla 1.

Todos los caninos provenían de Bogotá D.C y las muestras se obtuvieron en el periodo comprendido entre enero 2014 a junio 2015; adicionalmente, se analizaron dos cepas vacunales distribuidas comercialmente en la ciudad de Bogotá para un total de 15 análisis.

Tabla 1. Eventos epidemiológicos.

Evento epidemiológico	ID	Fecha recepción muestra	Edad	Muestra	Signos clínicos	Procedencia
1	CM-14-027	Enero 2014	1 mes	Sangre	Respiratorio, gastrointestinal, nervioso.	Bogotá - Zona norte
2	CM-14-160	Diciembre 2014	2 meses	Orina	Respiratorio, gastrointestinal, nervioso.	Bogotá - Zona centro
3	CM-15-001	Enero 2015	NR	Orina	Respiratorio	Bogotá - Zona occidente
4	CM-15-018	Enero 2015	3 Meses	Orina	NR	Chiquinquirá
5	CM-15-052	Enero 2015	14 meses	Orina	NR	Bogotá - Zona suroriente
	CM-15-061		8 meses	Orina	Respiratorio	
	CM-15-066		6 meses	Orina	Sistémico	
	CM-15-069		5 meses	Sangre	Sin signos clínicos	
	CM-15-078		4 meses y 20 días	Sangre	Sin signos clínicos	
	CM-15-089		4 meses y 20 días	Sangre	Sin signos clínicos	
6	CM-15-135	Febrero 2015	4 años	Hisopo nasal	Respiratorio	Bogotá - Zona occidente
7	CM-15-171	Junio 2015	3 meses y 7 días	Sangre	Gastrointestinal y dermatológico	Bogotá - Zona sur
Vacunas	CM-14-148		Vacuna 1	Vacuna		
	CM-15-354		Vacuna 2	Vacuna		

6.2 RT-PCR

El ARN almacenado en el banco de muestras, fue amplificado para la detección del gen *fsp* con los primers CDV-F4854 y CDV-R5535 descritos en la tabla 2. Brevemente, se utilizó el kit Thermo Scientific Verso 1-Step RT-PCR Reddy Mix, con los siguientes componentes: Verso enzyme mix 1 uL, 2X 1-Step PCR reddy mix 25 uL, RT Enhancer 2.5 uL, Forward primer (10 uM) 1 uL, Reverse primer (10 uM) 1 uL, Template RNA uL , agua libre de nucleasas (R0581) 50 uL.

El protocolo de amplificación fue gentilmente informado por la Dra. Yanina Panzera de la Universidad de la República de Uruguay, así: síntesis de cDNA fue realizado a 42°C durante 15 minutos; la amplificación del gen *fsp* comenzó con la desnaturalización inicial 95° C durante 3 minutos, desnaturalización a 95° C durante 30 segundos, hibridación 58° C durante 45 segundos y extensión a 72° C durante 1 minuto, a 30 ciclos, la extensión final 72°C durante 5 minutos.

Tabla 2. Primer amplificación gen *fsp*

Nombre primer	Secuencia	Posición genómica	Referencia
CDV-F4854	5' TCC AGG ACA TAG CAA GCC AAC A 3'	4854 - 4875	Sarute et al., 2013
CDV-R5535	5'GGT TGA TTG GTT CGA GGA CTG AA3'	5513 - 5535	Sarute et al., 2013

6.3 Secuenciación, alineamiento y análisis filogenético

Las secuencias de nucleótidos fueron comparadas con la base de datos del BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Las secuencias fueron editadas utilizando el programa MEGA 6 software, el modelo de sustitución fue Hasegawa-Kishino-Yano.

7. Marco teórico

7.1. Historia

La enfermedad fue bien descrita en 1746 por Ulloa en su obra *Relación histórica del viaje a la América meridional*. Durante el transcurso de la década de 1760, la enfermedad se registró en España, seguido por Inglaterra, Italia (1764) y Rusia (1770). En 1763, 900 perros murieron en un solo día en Madrid. En 1844, Karle logró la primera transmisión experimental de la enfermedad mediante el hisopado de labios de perros jóvenes con la descarga de los animales enfermos. El agente causal de la enfermedad sólo se descubrió en 1905, cuando el virus fue aislado por Henri Carré. Mientras tanto, Edward Jenner, quien pensó que la enfermedad era una afección como la viruela, afirmó que podría prevenirse mediante la inoculación del virus como vacuna. (Ek-Kommonen et al., 1997)

7.2. Características virales y replicación celular

El virus del distemper canino (CDV) fue inicialmente aislado por Henri Carré en 1905 y por décadas ha sido responsable de un gran número de muertes animales a nivel mundial (Panzera et al., 2015). CDV es miembro de la familia *paramixovirus* género *morbilivirus*, dicho género incluye el virus del distemper canino, sarampión, peste de los pequeños rumiantes (peste des petits ruminants) y el virus del rinderpest o peste bovina (King M et al., 2012; Munir, 2013).

CDV es un virus ARN de una sola hebra, polaridad negativa, envuelto, diámetro variable (150-250nm) (Greene, 2012) con longitud genómica de 15690 bp; el ARN del genoma esta encapsulado por la proteína de la nucleocapside (N) que funciona como un molde para la transcripción y replicación por la fosfoproteína (L) y polimerasa (P), las proteínas N, P y L junto al ARN viral constituyen el complejo ribonucleoproteico (RNP) el cual secuencia directamente la síntesis de mRNAs de 6 unidades de transcripción o la replicación de antígenomas encapsulados. La proteína de matrix (M) ubicada en la capa interna de la envoltura viral facilita el contacto de RNP con las dos glicoproteínas que integran la capa externa del virus, es decir con la hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F) (figura 1); la glicoproteína H media la unión del virus a la membrana celular del huésped mientras

que la proteína F ejecuta la fusión de las dos membranas, lo que permite la entrada de la RNP viral en el citoplasma (figura 2) (von Messling et al., 2001; Von Messling., et al; 2006; Martella., et al 2008).

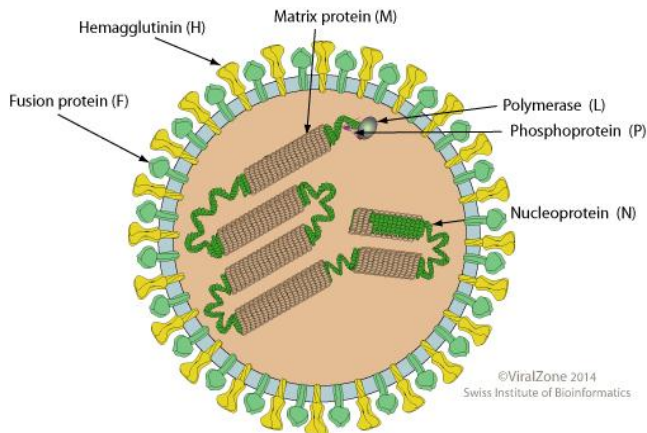


Figura 1. Diagrama esquemático de una partícula de CDV en corte transversal.
N nucleocápside, L polimerasa, P fosfoproteína, M proteína de membrana o matrix, F proteína de fusión y H hemaglutinina.
Tomado de http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/86.ht

Después de la unión de la proteína H al receptor celular, el virus logra entrar mediante la fusión de la envoltura del virus con la membrana de la superficie de la célula huésped por medio de la proteína F, con esto la nucleocápside viral logra liberarse en el citoplasma e inicia la transcripción. La polimerasa viral entra en el promotor situado en el extremo 3' del genoma para iniciar la transcripción, la acumulación intracelular de proteínas de la nucleocápside viral estimulan el inicio de la replicación del genoma que está estrechamente vinculado a la encapsulación de la progenie del virus; la proteína M ensambla el virión mediante la formación de un puente entre las colas citoplasmáticas de las proteínas de la envoltura y la nucleocápside; el montaje final y gemación del virus se producen en la membrana plasmática de las células infectadas (figura 2 y 3) (King, 2011)

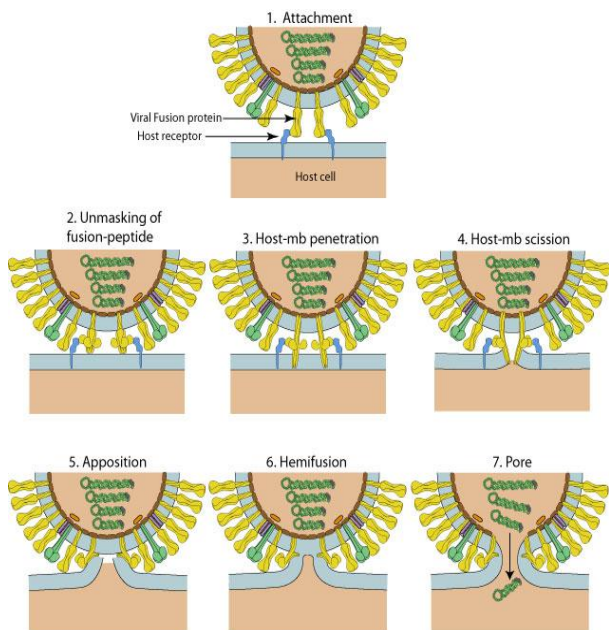


Figura 2. Diagrama esquemático de una partícula CDV en corte transversal, inoculando el material genético viral al citoplasma de la célula huésped.

Tomado de (education.expasy.org/images/Fusion.jpg)

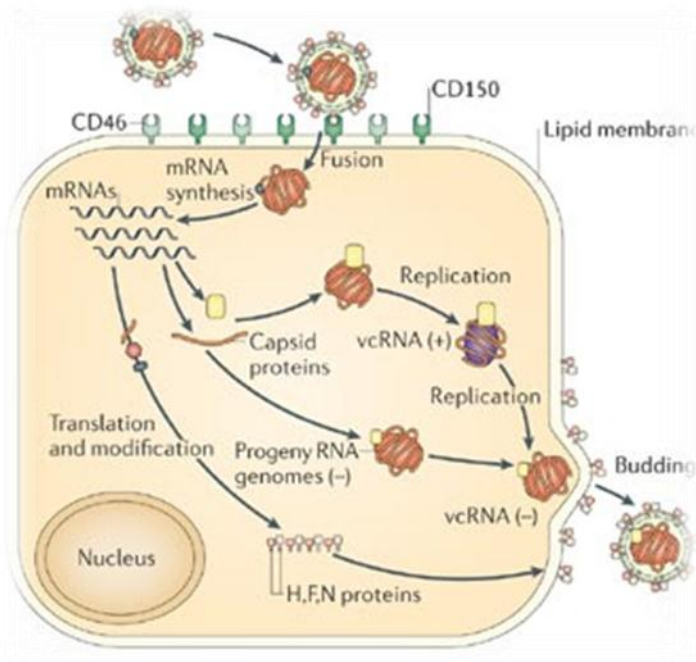


Figura 3. Diagrama esquemático de replicación intracelular del virus CDV

Tomado de

<http://biowiki.org/twiki/pub/Fall09/FinalProjectParamyxoviridae/nrmicro1550-i1.jpg>

Las altas tasas de mutación del genoma de CDV (ssRNA) se han asociado principalmente a la susceptibilidad a cambios en el ARN polimerasa viral (Lauring et al., 2010); adicionalmente, se ha demostrado que la alta conservación en las proteínas P, N, L y M puede ser debido a su importancia en la transcripción y replicación viral (McCarthy et al., 2007). La proteína H es una de las más variables proteínas en los *morbilivirus* y por lo tanto ha sido ampliamente usada para analizar los cambios genéticos entre cepas de CDV (von Messling et al., 2001; Pardo et al., 2005; Lan et al., 2006; Zhao et al., 2010; Woma et al., 2010; Muller., 2011), aunque estudios recientes demuestran la eficacia del péptido fsp para identificación de linajes filogenéticos (Sarute et al., 2013).

Los principales receptores empleados por CDV para el ingreso a las células son la glicoproteína de membrana SLAM/CD150 (expresados en la superficie de células inmunes incluyendo timocitos inmaduros, linfocitos T activados, linfocitos B, monocitos, macrófagos y células dendríticas) y nectin-4 (poliovirus - receptor-like-4, PVRL4) este receptor epitelial perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y se ha asociado recientemente con las infecciones por *measles virus* (sarampión) en seres humanos, por lo tanto, la presencia de este receptor podría tener un efecto en el ingreso del virus a la células huésped (Noyce et al., 2013).

Investigaciones *in vitro* en hurones explican como el linfotropismo se debe a la unión de la proteína viral H del virus a SLAM CD150, el reconocimiento de SLAM es esencial para la infección de linfocitos, la difusión viral y la inducción de la inmunosupresión (Suter et al., 2005; von Messling et al., 2006).

7.3 Patogénesis

La infección con CDV ocurre al entrar el tracto respiratorio alto en contacto con fluidos contaminados, sin embargo, recientemente se han encontrado que pulgas (*Ceratophyllus sciurorum*) pueden tener el virus y por lo tanto se sugiere que pueden ser vectores de la enfermedad (Trebbien et al., 2014).

Una vez ha ingresado el agente al organismo, este se multiplica en células inmunes y posteriormente se disemina a través de vía linfática y sanguínea a otros tejidos. Cuatro a ocho días pos infección la multiplicación del virus ocurre en tejidos linfoides como el bazo, tejido linfático asociado a la lámina propia del estómago y del intestino delgado, nódulos linfáticos del mesenterio y células de Kuffer en el hígado; una vez establecida la infección, se acentúa una profunda inhibición y deterioro de las funciones humorales y celulares, dejando a los animales susceptibles a infecciones secundarias (Beineke et al., 2009; Greene, 2012). Otros signos que pueden acompañar el curso de la enfermedad son letargia, deshidratación, anorexia, pérdida de peso o signos relacionados al órgano afectado (Beineke et al., 2009). La segunda viremia ocurre varios días después y es asociada frecuentemente con fiebre alta e infección a diversos tejidos del organismo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el genotipo y el estado inmune del paciente influyen en la patogénesis y en la presentación de signos clínicos (Beineke et al., 2009).

La diseminación de CDV en el tejido del SNC puede ocurrir por vía hematogena; el virus entra al parénquima cerebral en los espacios peri vasculares, el virus libre o en los linfocitos puede entrar en el fluido cerebroespinal del plexo coroideo donde se extiende a las estructuras peri ventriculares y subpiales (Greene, 2012). Se ha descrito la propagación del virus a través del nervio olfatorio en hurones infectados experimentalmente, describiéndose así dos rutas distintas de invasión al SNC: anterógrada a través de los nervios olfatorios y hematogena a través de los linfocitos circulantes infectados. En el SNC se puede observar un proceso inflamatorio caracterizado por la invasión de linfocitos que resulta en desmielinización en el 10-30% de los animales (Rudd et al., 2006).

La eliminación del virus a partir de todas las excreciones corporales comienza en el momento de la colonización epitelial, incluso en perros con infección subclínica (Greene, 2012). Esta fase puede estar acompañada por varios signos incluyendo erupción cutánea, descarga serosa nasal u ocular, conjuntivitis, anorexia, seguido por signos gastrointestinales que usualmente se agravan por infección bacteriana secundaria y alteraciones nerviosas que incluyen mioclonos, nistagmos, ataxia, tetraplejia o paraplejia (Beineke et al., 2009).

Después de la eliminación del virus, la infección puede persistir en órganos linfáticos, SNC, úvea, almohadillas plantares o presentar poca progresión de la enfermedad y una respuesta inmune moderada con signos clínicos sutiles. Como consecuencia de la persistencia viral en el SNC se pueden observar signos neurológicos residuales como mioclonos y convulsiones, sin embargo, los perros con este tipo de signos suelen morir (Beineke et al., 2009; Greene, 2012).

Las lesiones en pulpejos y almohadillas a nivel histológico consisten en hiperqueratosis y paraqueratosis con vesículas, pústulas y formación de cuerpos de inclusión; el virus entra al epitelio de las almohadillas durante el periodo virémico causando proliferación basal de queratinocitos resultando en la hiperqueratosis observada (Greene, 2012).

7.4 Huéspedes

CDV se reconoce como una importante amenaza a la conservación de muchas especies de carnívoros (McCarthy et al., 2007), la infección con este virus ha llevado a muertes masivas de especies de cánidos salvajes, felinos, fócidos, mustelida, viverridos, ailúridos, prociónidos, roedores y primates no humanos (Roelke et al., 1996; Carpenter et al., 1998; Guiserix et al., 2007; de Vries et al., 2014; Origgi et al., 2013; Viana et al., 2015).

Las tasas de mortalidad por CDV pueden variar dependiendo de la susceptibilidad de las especies, en rango 0% en los gatos domésticos (Ikeda et al., 2001) 30% en leones y monos, 50% perros domésticos y 100% en hurones; Mapaches (*prociónidos Nyctereutes*), zorros (*Vulpes vulpes*) y visones también son susceptibles a las infecciones por CDV con alta mortalidad (Zhao et al., 2015).

Un brote presentado en el parque nacional del Serengueti, donde los picos de infección en perros eran precedidos por los de los leones, sugirió que el aumento de la población de perros en áreas urbanas limítrofes con el parque natural, fue el principal impulsor de la infección en los animales salvajes. Sin embargo, a pesar de los modelos de transmisión dominante entre especies perro a león, los picos de infección en los leones se hicieron más frecuentes y asincrónicos que los de los

perros, lo que sugiere que otras especies de vida silvestre pueden desempeñar un papel en el mantenimiento de la enfermedad (Viana et al., 2015).

Un brote de CDV en primates no humanos se informó por primera vez en 1989, cuando 22 macacos japoneses (*Macaca fuscata*) alojados en un centro de investigación presentaron lesiones y serología congruente con CDV (Yoshikawa et al., 1989). Para el 2011 y el 2013, se reportaron brotes en colonias de cría de macacos resus (*Macaca mulatta*) en China y macacos cangrejeros (*Macaca fascicularis*) en Japón (Qiu w et al., 2011; Sakai K et al., 2013). En conjunto, estos brotes incluyen más de 10.000 animales y resultaron en tasas de letalidad de hasta el 30%; la principal causa de la muerte fue neumonía y algunos animales mostraban signos neurológicos. La detección frecuente de patógenos secundarios sugiere que los casos de tasas de mortalidad alta fueron probablemente relacionados con las infecciones oportunistas resultantes de la supresión inmune inducida por CDV, no está claro si los virus que causaron estos brotes se habían adaptado a los primates como la infección experimental de macacos (De Vries et al., 2014).

7.5. Epidemiología

Para el análisis epidemiológico de CDV han sido fundamentales los estudios moleculares, se reporta que la divergencia de aminoácidos del gen *H* alcanza 10% entre las cepas de campo, mientras que con el gen *F* se evidencia alrededor del 4% de variabilidad entre cepas (von Messling et al., 2001). Sin embargo, recientemente se ha establecido que una región del gen *F* que codifica el péptido señal de la proteína F es extremadamente variable, esta región llamada fsp consiste solamente en 405 bp, haciendo más fácil la amplificación de muestras de campo de diferente origen utilizando métodos convencionales para el aislamiento de ARN (Sarute et al., 2013).

En la última década, se ha logrado identificar continuamente diferentes linajes de CDV clasificados por su ubicación geográfica, hasta el 2006 siete linajes eran conocidos a nivel mundial, América 1, América 2, Ártico, Asia 1, Asia 2, Europa y Europa silvestre (Harder et al., 1997; Bolt et al., 1997; Martella et al., 2006), para 2007 la secuenciación del gen *H* permitió la identificación de un nuevo linaje filogenético en Argentina (Calderón et al., 2007), posteriormente, secuenciando el

mismo gen en cepas de Sudáfrica se encontró una nueva variante del virus, lo que permitió establecer nueve subtipos a partir de la identificación de una nueva variante que no coincide con otras previamente reportadas, Argentina, América 1, Ártico, América 2, Asia 1, Asia 2, Europa, Europa silvestre, África (Woma et al., 2010)

En 2012, se reporta la presencia de dos linajes que circulan con diferente prevalencia en América del Sur: Europa 1 / Sur América 1 y Sur América 2. (Panzera et al., 2012). Al año siguiente un estudio realizado en el Valle de Aburrá - Colombia, en el cual se secuenció el gen *H* de cepas colombianas, describió divergencia aminoacídica mayor del 4% con otros aislamientos reportados alrededor del mundo y baja identidad aminoacídica (90%) con las vacunas pertenecientes al linaje americano (Espinal et al., 2013); por lo tanto, los autores sugirieron que una variante genética, diferente a las vacunas y otros genotipos conocidos hasta el momento, circula en las poblaciones caninas domésticas del valle de Aburrá y lo denominaron Sur América 3, que luego fue renombrado por Panzera et al. (2015) como Sur América 4 (SA4), dada la identificación previa de otro genotipo en Suramérica provenientes de Uruguay, Brasil y Ecuador que fue nombrada Sur América 3 (SA3) (Espinal et al., 2014; Sarute et al., 2014). En la actualidad, se reporta en el ámbito mundial 11 linajes de CDV caracterizados con el gen H.

7.6. Diagnóstico

CDV debe ser considerado en el diagnóstico de condiciones febriles de cachorros con síntomas multisistémicos; diversas pruebas de laboratorio están disponibles para confirmar la infección por CDV.

En los cachorros entre 3 y 6 meses con sintomatología y sin historial de vacunación sugieren distemper como primer diferencial. La mayoría de los caninos con enfermedad severa presentan signos clínicos como para realizar un diagnóstico presuntivo, pero las infecciones del sistema respiratorio superior en perros adultos o viejos usualmente es diagnosticado de manera errónea como bronquitis (Greene, 2012).

Los títulos de anticuerpos para CDV pueden ser examinados por ELISA o IF, estos pueden presentar valores altos varios meses después de la vacunación o pos infección (Martella et al., 2008); IgG no es un buen indicador de resultados positivos o negativos, ya que no distingue entre la exposición previa a la infección o vacunación; un aumento de títulos de anticuerpos IgM en suero puede ser indicativo, pero no es diagnóstico de distemper (Birchard et al., 2006).

La inmunofluorescencia de secreción nasal, conjuntival o vaginal tiene una sensibilidad limitada y puede detectar antígenos de CDV solo hasta las 3 semanas pos infección cuando el virus sigue presente en las células epiteliales (Birchard et al., 2006).

Herramientas moleculares como *reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) y *real-time* RT-PCR son sensibles y específicas. Técnicas como la hematología, permiten identificar linfopenia (comenzando con el pico febril inicial) y leucocitosis neutrofílica (asociada con complicaciones bacterianas secundarias como la neumonía) (Birchard et al., 2006).

Mediante histopatología, la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares resulta ser un hallazgo diagnóstico en infecciones por CDV, aunque este sea un virus RNA, la infección por CDV desencadena estrés celular, por lo tanto ocurre redistribución de la proteína viral N del citoplasma al núcleo de la célula infectada, lo que se evidencia en cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares (Oglesbee et al., 1993).

7.7. Interés en salud pública

La importancia de distemper como una enfermedad que genera riesgo a la salud pública se ha estudiado por el sarampión o la enfermedad de Paget. Se ha relacionado en la literatura con el sarampión, puesto que la enfermedad es causada por un virus (*measles virus*) del mismo género que CDV. En 1980, antes de que se generalizara el uso de la vacuna, el sarampión causaba cerca de 2,6 millones de muertes al año; se calcula que en 2013 murieron 145.700 personas por esta causa, la mayoría de ellas menores de 5 años. La vacunación contra el sarampión ha

proporcionado grandes beneficios de salud pública, reduciendo la mortalidad mundial por esta causa en un 75% entre 2000 y 2013 (WHO, 2015). Sin embargo, se cree que la inmunidad específica transversal de la población humana restringe las posibilidades de CDV u otros *morbilivirus* animales replicarse o adaptarse a los seres humanos (De Vries et al., 2014).

La enfermedad de Paget es un trastorno esquelético, caracterizado por anomalía en los osteoclastos que aumenta la reabsorción de hueso, seguido por aumento secundario de actividad osteoblástica, lo que genera una nueva estructura ósea débil y propensa a la deformación (Mee et al., 1998). La etiología de la enfermedad es desconocida, aunque múltiples observaciones sugieren que puede ser de causa viral. Desde que el virus del distemper ha sido propuesto como agente causal, la hipótesis de que los dueños de perros tienen mayor riesgo de la enfermedad de Paget ha sido ampliamente estudiada (Khan et al., 1997). Evidencia previa implica a los *paramixovirus* como el agente etiológico de la enfermedad de Paget, aunque los hallazgos han sido controvertidos, puesto que varían dependiendo de la prueba (microscopía electrónica, inmunohistoquímica o RT-PCR) (Mee et al., 1998); sin embargo, esto aún sigue siendo objeto de estudio (Singer et al., 2011)

8. Resultados

8.1 Secuenciación y análisis del gen *fsp*

Los amplificados obtenidos a partir de las muestras presentaron divergencia >4% en relación con las cepas de otros países, las cepas suramericanas o las cepas vacunales (figura 4).

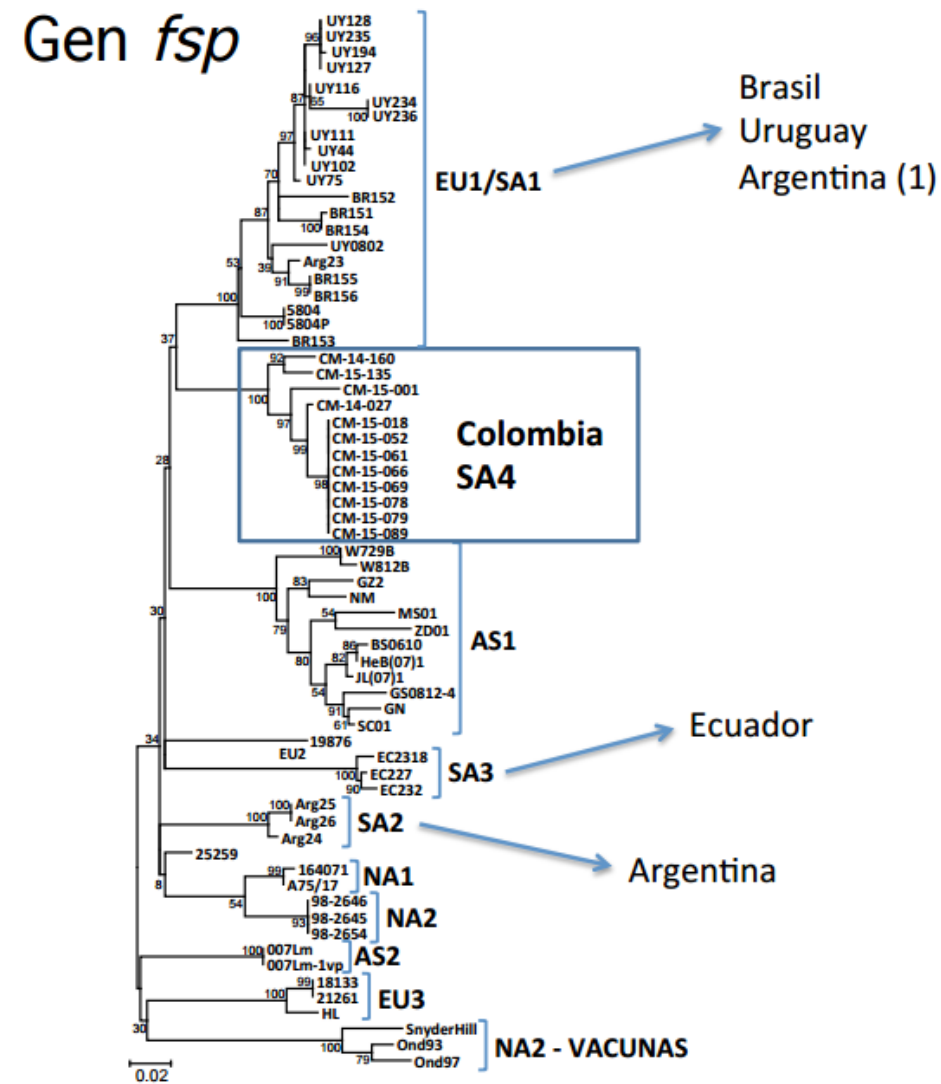


Figura 4. Mapa filogenético del virus de distemper canino con el análisis del gen *fsp*

8.2. Sintomatología clínica

El 53,8% (n=7) de las muestras analizadas correspondían a pacientes entre 0-4 meses, los sistemas afectados en 2 de los pacientes de este grupo eran respiratorio, nervioso y digestivo, un paciente presentó sintomatología dermatológica y digestiva, uno asintomático y finalmente uno no reportaba síntomas. El 23,1% (n=3) eran pacientes entre 5 meses y 1 año, presentando sintomatología respiratoria, sistémica y asintomático respectivamente. Finalmente quedan 3 grupos, de 1 a 2 años que correspondía al 7,7% (n=1) y no reportaba síntomas en su historia clínica, el grupo >2 años igualmente representaba el 7,7% (n=1) era asintomático y aquel que no reportaba edad tenía sintomatología respiratoria (7,7%, n=1). (Figura 5 y 6)

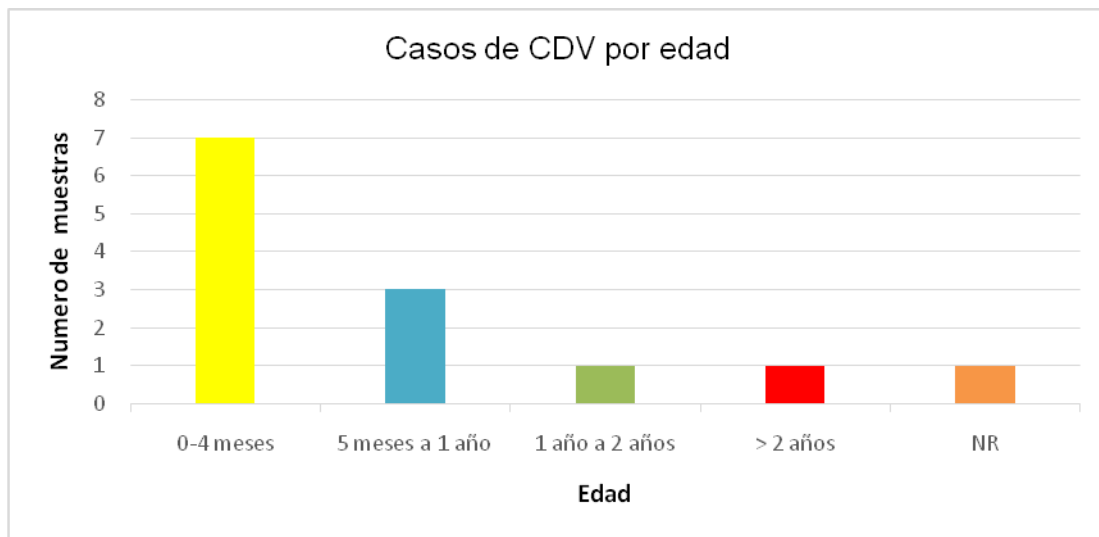


Figura 5. Casos de CDV por edad

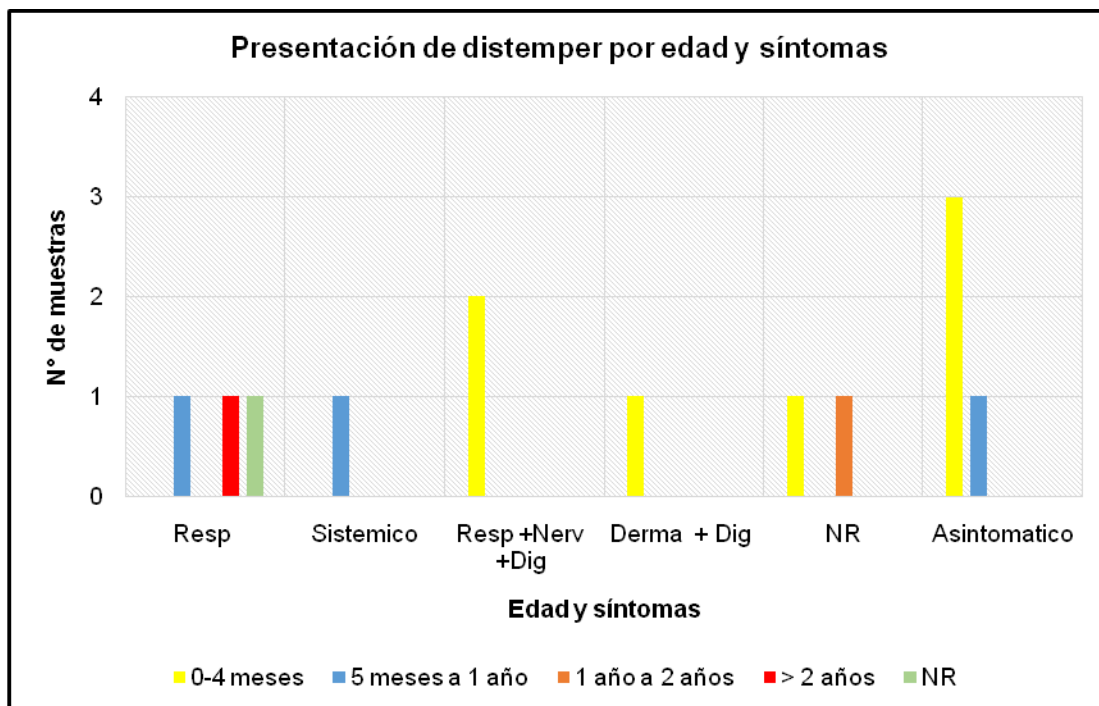


Figura 6 Presentación de CDV por edad y síntomas

8.3. Muestra según la sintomatología.

Las muestras de orina 46,2% (n=6) coincidían con diferentes síntomas como lo son respiratorio (dos pacientes), sistémico (un paciente), nervioso-digestivo (1 paciente) y un paciente no describía sintomatología alguna en la historia remitida al laboratorio. Las muestras de sangre 46,2% (n=6) en su mayoría eran asintomáticos, un paciente con sintomatología dermatológica- digestiva y un paciente respiratorio-nervioso-digestivo. El 7,7% (n=1) fue una muestra de hisopo conjuntival u oro-nasal y este presentaba síntomas respiratorios.

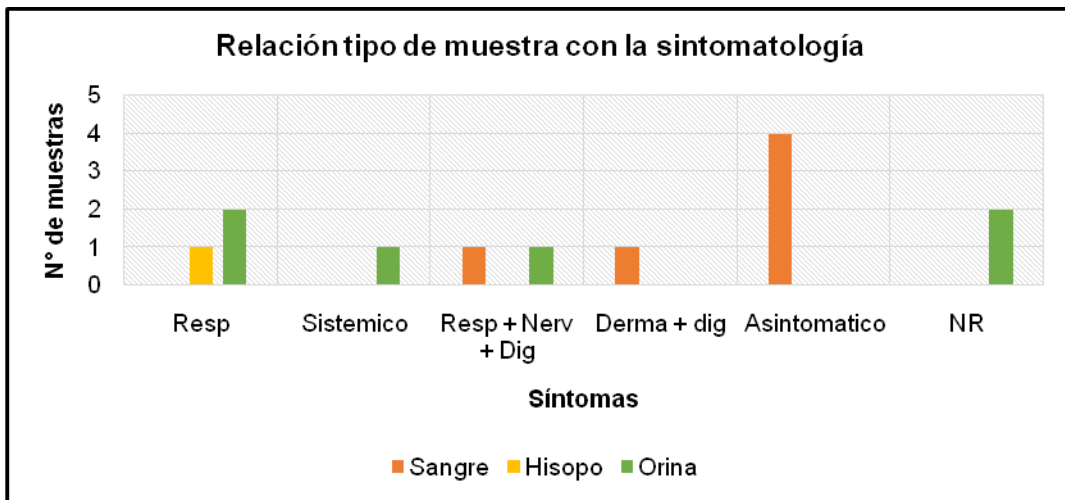


Figura 7. Relación tipo de muestra con sintomatología

8.4 Raza y género

Para este estudio no se usaron criterios incluyentes o excluyentes de género o la raza, sin embargo, el 54% eran machos y 46% eran hembras.

Las razas fueron Golden Retriever, Labrador, Bernes De La Montaña, Pastor Belga, Shih- Tzu y Husky Siberiano.

9. Discusión

9.1 Variedad filogenética de CDV

Este estudio permitió caracterizar una nueva variante del virus del distemper canino a partir de siete eventos epidemiológicos diferentes en Bogotá D.C. Colombia, amplificando el gen *fsp*; estudios previos reportan que la divergencia de aminoácidos de la proteína F es de alrededor del 4% (von Messling et al., 2001); adicionalmente, se ha demostrado como la región *fsp* puede ser una herramienta útil para identificar diferentes linajes filogenéticos (Sarute et al., 2013).

Actualmente existen en el mundo 11 variantes del virus del distemper caracterizados con el gen *H* (Calderón et al., 2007; Woma et al., 2010; Panzera et al., 2012; Sarute et al., 2014; Espinal et al., 2014; Panzera et al., 2015; Ke et al 2015). Con los hallazgos de este proyecto de grado, Sur América describiría 4 linajes caracterizados con el gen *fsp*, de los cuales tres son propios de Sur América (SA2, SA3, SA4) y uno intercontinental (Europa1/Sur América 1). Se ha sugerido que esta alta divergencia subcontinental se pueda deber a la biodiversidad existente en Sur América, teniendo en cuenta que CDV no afecta solo cánidos domésticos, sino también animales silvestres (figura 8).

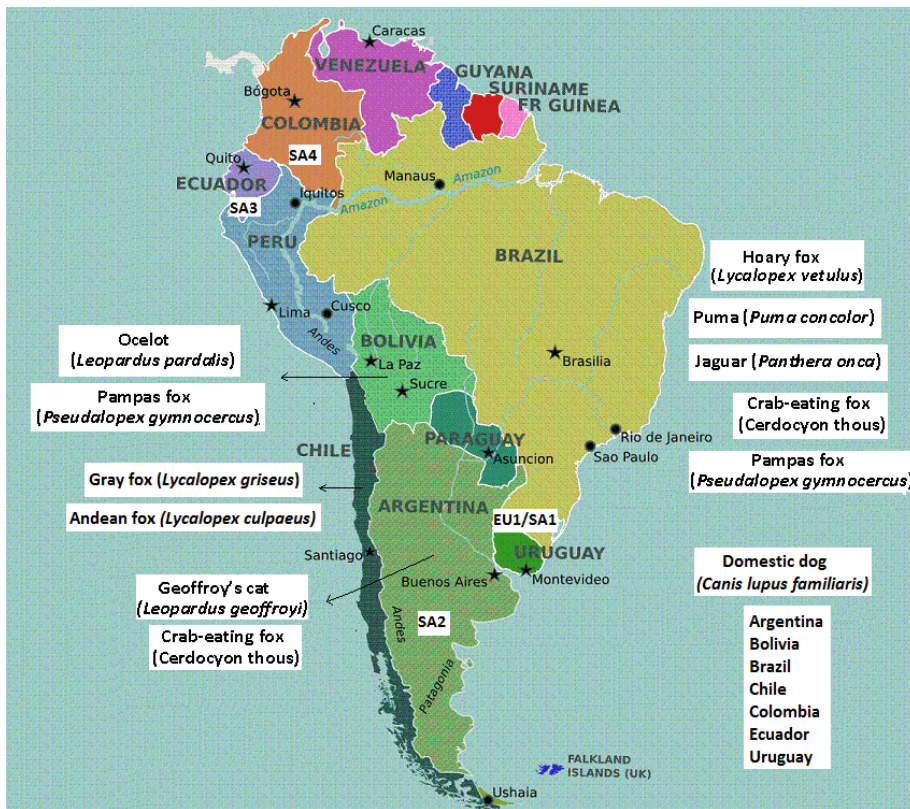


Figura 8 Mapa político de Sur América con especies infectadas con CDV caracterizados con el gen H y los linajes descritos para cada país (Panzera et al., 2014)

9.2. RT-PCR para CDV

La técnica RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) para la detección de CDV representa un método altamente sensible y específico para el diagnóstico antemortem de distemper, utilizando muestras de hisopados conjuntivales, orina, suero, sangre completa, y/o LCR. (Frisk et al., 1999) Aunque, es importante tener en cuenta los sistemas afectados por el virus o el estado de viremia en el que se encuentre el paciente para tomar la decisión del tipo de muestra en la que será exitosa la detección viral, como se presenta en la figura 7. La orina fue la muestra que más eficientemente sirvió para detectar el virus en las diferentes presentaciones de la enfermedad. Esto posiblemente se deba a que el epitelio vesical es infectado eficientemente por el virus del distemper canino, tanto

así, que es posible observar cuerpos de inclusión intranucleares o intracitoplasmáticos en citologías de orina o en preparaciones de vejiga con coloración H&E para patología (Sykes, 2013).

9.3 Sintomatología de CDV asociado a la edad

Al analizar el historial clínico de los 13 pacientes, la mayoría de ellos (53%) pertenecía al grupo de 0 a 4 meses, seguido por los pacientes entre 5 meses a 1 año (23,1%); se ha descrito que la inmadurez fisiológica de los perros podría explicar su mayor susceptibilidad a la infección con CDV (Krakowka et al., 1976). Los caninos jóvenes son los más susceptibles a CDV cuando pierden anticuerpos colostrales, usualmente entre las 6 y 12 semanas de edad, siendo la incidencia de CDV más frecuente entre 3 y 6 meses de edad; sin embargo, todas las edades pueden presentar la enfermedad (Hoskins et al., 2016).

Uno de los pacientes con RT-PCR positivo para distemper tenía 4 años, presentaba sintomatología respiratoria y no reportaba información sobre la vacunación. Probablemente, la presentación de distemper en este paciente, se debió a que no tenía el plan de vacunación lo que lo hizo más susceptible a la infección. Se ha descrito que aunque los perros hayan sido vacunados en su juventud, la inmunidad protectora inducida por vacunas vivas modificadas persiste por no más de 3 años (Galan et al., 2014).

La alteración de varios sistemas se debe a la característica de CDV de ser un virus pantrópico y a su propagación por el organismo a través de vía linfática y vía hematogena (von Messling et al., 2006 ; Martella V et al., 2008; Beineke et al., 2009; Greene, 2012)

El virus del distemper canino puede presentar diferentes síntomas de acuerdo con el órgano afectado, por lo que debe estar presente como diferencial incluso si no presenta la sintomatología clásica de CDV, lo que permite la implementación de estrategias oportunas que prevengan la dispersión del virus, principalmente en lugares que alberguen varios caninos como los son los criaderos o los sitios de rescate (Greene., 2012; Elia et al., 2015).

9.4 Muestra.

Al tener un mayor número de muestras de sangre y orina con respecto al hisopado oro-nasal o conjuntival, este estudio no permite comparar cual muestra identifica mejor el virus; no obstante, otros estudios han resaltado que el tipo de muestra que se debe remitir al laboratorio debe ser de acuerdo a la sintomatología que presenta el paciente, además de que las muestras de orina y sangre son las más adecuadas para identificar el agente. Los hisopados rectales, aunque han demostrado que se logra aislar el virus, se presume que la excreción del virus dura menor tiempo que en la orina (Fischer et al., 2013)

9.5. Vacunación

El 84,6% de los pacientes analizados reportaba algún tipo de vacunación, pero no explicaba que tipo de vacunas habían sido aplicadas, ni su relación con la edad, las dosis, producto, etc., por lo tanto, este estudio no permite identificar la relación de la vacunación con la presentación de distemper. Artículos reportan la presentación de brotes de distemper en caninos vacunados, aparentemente relacionado con inadecuada vacunación y el comercio ilegal de cachorros (Martella et al., 2008; Martella et al., 2011).

9.6. Raza y género

Este estudio no permite establecer resultados estadísticamente significativos entre el género o la raza de los perros infectados y la susceptibilidad a CDV.

Sin embargo, la literatura presenta resultados variables puesto que aunque aparentemente no existe ninguna influencia del género o la raza en la susceptibilidad a CDV (Tipold et al., 1992), otros autores reportan que las hembras son más susceptibles a la infección por (Temilade et al., 2015)

10. Impacto e indicadores

- Se caracterizó una nueva variante del virus de distemper canino con el análisis del gen *fsp*.
- El análisis mediante el gen *fsp* permite hallar diferencias filogenéticas en CDV.
- Sur América es uno de los continentes con mayor número de linajes.
- La información completa de las historias de los pacientes de los que se remiten muestras a diagnóstico molecular, permite realizar estudios que contribuyan eficientemente a la generación de conocimiento

11. Referencias

- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F. and Baumgärtner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127(1-2), pp.1-18.
- Birchard, S. and Sherding, R. (2006). *Saunders manual of small animal practice*. St. Louis, Mo.: Saunders Elsevier.
- Bolt, G., Arctander, P., Jensen, T., Appel, M., Gottschalck, E., Buckland, R. and Blixenkrone-Møller, M. (1997). Genetic diversity of the attachment (H) protein gene of current field isolates of canine distemper virus. *Journal of General Virology*, 78(2), pp.367-372.
- Calderon, M., Remorini, P., Periolo, O., Iglesias, M., Mattion, N. and La Torre, J. (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), pp.341-349.
- Carpenter, M., J.G. Appel, M., Roelke-Parker, M., Munson, L., Hofer, H., East, M. and O'Brien, S. (1998). Genetic characterization of canine distemper virus in Serengeti carnivores. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 65(2-4), pp.259-266.
- Childs, J., Mackenzie, J. and Richt, J. (2007). *Wildlife and emerging zoonotic diseases*. Berlin: Springer.
- de Vries, R., Ludlow, M., Verburgh, R., van Amerongen, G., Yuksel, S., Nguyen, D., McQuaid, S., Osterhaus, A., Duprex, W. and de Swart, R. (2014). Measles Vaccination of Nonhuman Primates Provides Partial Protection against Infection with Canine Distemper Virus. *Journal of Virology*, 88(8), pp.4423-4433.
- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U. and Nuotio, L. (1997). Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Veterinary Record*, 141(15), pp.380-383.
- Elia, G., Camero, M., Losurdo, M., Lucente, M., Larocca, V., Martella, V., Decaro, N. and Buonavoglia, C. (2015). Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. *Journal of Virological Methods*, 213, pp.127-130.

- Espinal, M., Díaz, F. and Ruiz-Saenz, J. (2014). Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. *Veterinary Microbiology*, 172(1-2), pp.168-176.
- Fischer, C., Ikuta, N., Canal, C., Makiejczuk, A., Allgayer, M., Cardoso, C., Lehmann, F., Fonseca, A. and Lunge, V. (2013). Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. *Journal of Virological Methods*, 194(1-2), pp.39-45.
- Frisk, A., Konig, M., Moritz, A., & Baumgartner, W. (1999). Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), pp. 3634-3643.
- Galán, A., Gamito, A., Carletti, B., Guisado, A., Martín de las Mulas, J., Pérez, J. and Martín, E. (2014). Uncommon acute neurologic presentation of canine distemper in 4 adult dogs. *Can Vet J*, 55:373-378. pp. 3373-378.
- Greene, C. (2012). *Infectious diseases of the dog and cat*. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders.
- Guiserix, M., Bahi-Jaber, N., Fouchet, D., Sauvage, F. and Pontier, D. (2007). The canine distemper epidemic in Serengeti: are lions victims of a new highly virulent canine distemper virus strain, or is pathogen circulation stochasticity to blame?. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(17), pp.1127-1134.
- Harder, T. and Osterhaus, A. (1997). Canine distemper virus — A morbillivirus in search of new hosts?. *Trends in Microbiology*, 5(3), pp.120-124.
- Distemper, Other Infectious Dog Diseases. Hoskins, J. and Rhoades, J.[online] Available at: <http://naldc.nal.usda.gov/naldc/download.xhtml?id=IND85005531&content=PDF> . [Accessed 1 feb. 2016].

- Ikeda, Y., Nakamura, K., Miyazawa, T., Chen, M., Kuo, T., Lin, J., Mikami, T., Kai, C. and Takahashi, E. (2001). Seroprevalence of Canine Distemper Virus in Cats. *Clinical and Vaccine Immunology*, 8(3), pp.641-644.
- Ke, G., Ho, C., Chiang, M., Sanno-Duanda, B., Chung, C., Lin, M., Shi, Y., Yang, M., Tyan, Y., Liao, P. and Chu, P. (2015). Phylodynamic analysis of the canine distemper virus hemagglutinin gene. *BMC Vet Res*, 11(1).
- Khan, S., Brennan, P., Newman, J., Gray, R., McCloskey, E. and Kanis, J. (1996). Paget's disease of bone and unvaccinated dogs. *Bone*, 19(1), pp.47-50.
- King, A. (2011). *Virus taxonomy*. Oxford: Elsevier.
- Krakowka, S. and Koestner, A. (1976). Age-Related Susceptibility to Infection with Canine Distemper Virus in Gnotobiotic Dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 134(6), pp.629-632.
- LAN, N., YAMAGUCHI, R., INOMATA, A., FURUYA, Y., UCHIDA, K., SUGANO, S. and TATEYAMA, S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Veterinary Microbiology*, 115(1-3), pp.32-42.
- Lauring, A. and Andino, R. (2010). Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLoS Pathog*, 6(7), p.e1001005.
- Martella, V., Blixenkron-Møller, M., Elia, G., Lucente, M., Cirone, F., Decaro, N., Nielsen, L., Bányai, K., Carmichael, L. and Buonavoglia, C. (2011). Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine*, 29(6), pp.1222-1227.
- Martella, V., Cirone, F., Elia, G., Lorusso, E., Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M., Bellacicco, A., Blixenkron-Møller, M., Carmichael, L. and Buonavoglia, C. (2006). Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology*, 116(4), pp.301-309.
- Martella, V., Elia, G. and Buonavoglia, C. (2008). Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 38(4), pp.787-797.

- McCarthy, A., Shaw, M. and Goodman, S. (2007). Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1629), pp.3165-3174.
- MEE, A., DIXON, J., HOYLAND, J., DAVIES, M., SELBY, P. and MAWER, E. (1998). Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ-reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Bone*, 23(2), pp.171-175.
- Müller, A., Silva, E., Santos, N. and Thompson, G. (2011). Domestic Dog Origin of Canine Distemper Virus in Free-ranging Wolves in Portugal as Revealed by Hemagglutinin Gene Characterization. *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), pp.725-729.
- Munir, M. (2013). *Pathobiology and molecular diagnosis*. Wallingford: CABI.
- Noyce, R., Delpeut, S. and Richardson, C. (2013). Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, 436(1), pp.210-220.
- Oglesbee, M. and Krakowka, S. (1993). Cellular stress response induces selective intranuclear trafficking and accumulation of morbillivirus major core protein. *Lab. Invest*, [online] 68, pp.109-117. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423670#> [Accessed 12 Jan. 2016].
- Organización Mundial de la Salud, (2015). *Sarampión*. [online] Available at: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs286/es/>. [Accessed 12 Jan. 2016].
- Origi, F., Sattler, U., Pilo, P. and Waldvogel, A. (2013). Fatal Combined Infection With Canine Distemper Virus and Orthopoxvirus in a Group of Asian Marmots (*Marmota caudata*). *Veterinary Pathology*, 50(5), pp.914-920.
- Panzer, Y., Calderón, M., Sarute, N., Guasco, S., Cardeillac, A., Bonilla, B., Hernández, M., Francia, L., Bedó, G., La Torre, J. and Pérez, R. (2012). Evidence of two co-circulating genetic lineages of canine distemper virus in South America. *Virus Research*, 163(1), pp.401-404.

- Panzer, Y., Sarute, N., Carrau, L., Aldaz, J. and Perez, R. (2013). Genetic diversity of Canine Distemper Virus in South America. *British Journal of Virology*, 1(2), pp.48-53.
- Panzer, Y., Sarute, N., Iraola, G., Hernández, M. and Pérez, R. (2015). Molecular phylogeography of canine distemper virus: Geographic origin and global spreading. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, pp.147-154.
- Pardo, I., Johnson, G. and Kleiboeker, S. (2005). Phylogenetic Characterization of Canine Distemper Viruses Detected in Naturally Infected Dogs in North America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), pp.5009-5017.
- Qiu, W., Zheng, Y., Zhang, S., Fan, Q., Liu, H., Zhang, F., Wang, W., Liao, G. and Hu, R. (2011). Canine Distemper Outbreak in Rhesus Monkeys, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 17(8), pp.1541-1543.
- Roelke-Parker, M., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G., Mgas, M., Machange, G., Summers, B. and Appel, M. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379(6564), pp.441-445.
- Rudd, P., Cattaneo, R. and von Messling, V. (2006). Canine Distemper Virus Uses both the Anterograde and the Hematogenous Pathway for Neuroinvasion. *Journal of Virology*, 80(22), pp.11416-11416.
- Sakai, K., Nagata, N., Ami, Y., Seki, F., Suzuki, Y., Iwata-Yoshikawa, N., Suzuki, T., Fukushi, S., Mizutani, T., Yoshikawa, T., Otsuki, N., Kurane, I., Komase, K., Yamaguchi, R., Hasegawa, H., Saijo, M., Takeda, M. and Morikawa, S. (2012). Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in *Cynomolgus* Monkeys in Japan in 2008. *Journal of Virology*, 87(2), pp.1105-1114.
- Sarute, N., Calderón, M., Pérez, R., La Torre, J., Hernández, M., Francia, L. and Panzer, Y. (2013). The Fusion Protein Signal-Peptide-Coding Region of Canine Distemper Virus: A Useful Tool for Phylogenetic Reconstruction and Lineage Identification. *PLoS ONE*, 8(5), pp.1-6.

- Sarute, N., Pérez, R., Aldaz, J., Alfieri, A., Alfieri, A., Name, D., Llanes, J., Hernández, M., Francia, L. and Panzera, Y. (2014). Molecular typing of canine distemper virus strains reveals the presence of a new genetic variant in South America. *Virus Genes*, 48(3), pp.474-478.
- Schultz, R., Thiel, B., Mukhtar, E., Sharp, P. and Larson, L. (2010). Age and Long-term Protective Immunity in Dogs and Cats. *Journal of Comparative Pathology*, 142, pp.S102-S108.
- Singer, F. (2011). The Etiology of Paget's Disease of Bone: Viral and Genetic Interactions. *Cell Metabolism*, 13(1), pp.5-6.
- Sykes J. (2013). Canine and Feline Infectious Diseases 1st Edition, Elsevier. Part II, 15.
- Suter, S. (2005). In vitro Canine Distemper Virus Infection of Canine Lymphoid Cells: A Prelude to Oncolytic Therapy for Lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 11(4), pp.1579-1587.
- Temilade, B., Solomon, O., Ezekiel, O., Omezuruike, O., Temilade, B., Solomon, O., Ezekiel, O. and Omezuruike, O. (2015). Seropositivity of Canine Distemper Virus (CDV) in Dogs Presenting at Abeokuta, Nigeria. *Public Health Research*, [online] 5(4), pp.109-119. Available at: <http://article.sapub.org/10.5923.j.phr.20150504.05.html> [Accessed 1 Feb. 2016].
- Tipold, A., Vandeveld, M. and Jaggy, A. (1992). Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *J Small Animal Practice*, [online] 33(10), pp.466-470. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1992.tb01024.x/citedby> [Accessed 1 Feb. 2016].
- Trebbien, R., Chriel, M., Struve, T., Hjulsager, C., Larsen, G. and Larsen, L. (2014). Wildlife Reservoirs of Canine Distemper Virus Resulted in a Major Outbreak in Danish Farmed Mink (*Neovison vison*). *PLoS ONE*, 9(1), p.e85598.
- Vermeulen, J., De Preter, K., Lefever, S., Nuytens, J., De Vloed, F., Derveaux, S., Hellemans, J., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2011). Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9), pp.e63-e63.

- Viana, M., Cleaveland, S., Matthiopoulos, J., Halliday, J., Packer, C., Craft, M., Hampson, K., Czupryna, A., Dobson, A., Dubovi, E., Ernest, E., Fyumagwa, R., Hoare, R., Hopcraft, J., Horton, D., Kaare, M., Kanellos, T., Lankester, F., Mentzel, C., Mlengeya, T., Mzimhiri, I., Takahashi, E., Willett, B., Haydon, D. and Lembo, T. (2015). Dynamics of a morbillivirus at the domestic–wildlife interface: Canine distemper virus in domestic dogs and lions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), pp.1464-1469.
- von Messling, V., Svitek, N. and Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) Recognition and the V Protein Sustain Swift Lymphocyte-Based Invasion of Mucosal Tissue and Lymphatic Organs by a Morbillivirus. *Journal of Virology*, 80(12), pp.6084-6092.
- von Messling, V., Zimmer, G., Herrler, G., Haas, L. and Cattaneo, R. (2001). The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *Journal of Virology*, 75(14), pp.6418-6427.
- Woma, T., van Vuuren, M., Bosman, A., Quan, M. and Oosthuizen, M. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: Lineage Africa. *Veterinary Microbiology*, 143(2-4), pp.126-132.
- Woma, T., Van Vuuren, M., Bosman, A., Quan, M., Oosthuizen, M., Bwala, D., Ibu, J., Ularumu, H. and Shamaki, D. (2011). Genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in vaccinated dogs in South Africa. *Nig. Vet. J.*, 31(1).
- Yoshikawa, Y., Ochikubo, F., Matsubara, Y., Tsuruoka, H., Ishii, M., Shiota, K., Nomura, Y., Sugiyama, M. and Yamanouchi, K. (1989). Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Veterinary Microbiology*, 20(3), pp.193-205.
- Zhao, J., Shi, N., Sun, Y., Martella, V., Nikolin, V., Zhu, C., Zhang, H., Hu, B., Bai, X. and Yan, X. (2015). Pathogenesis of canine distemper virus in experimentally infected raccoon dogs, foxes, and minks. *Antiviral Research*, 122, pp.1-11.
- Zhao, J., Yan, X., Chai, X., Martella, V., Luo, G., Zhang, H., Gao, H., Liu, Y., Bai, X., Zhang, L., Chen, T., Xu, L., Zhao, C., Wang, F., Shao, X., Wu, W. and Cheng, S. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine

distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Veterinary Microbiology*, 140(1-2), pp.34-42.