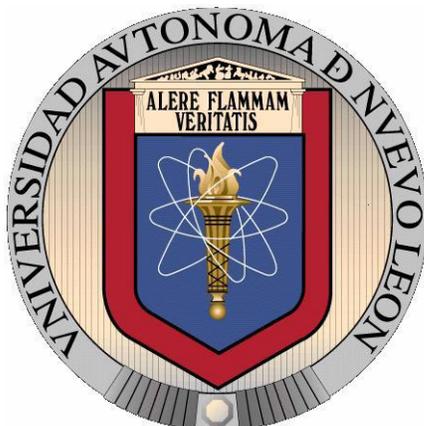


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA ZOOTECNIA**



T E S I S

**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS CON EL
COMPLEJO RESPIRATORIO CANINO EN PERROS DEL ÁREA
METROPOLITANA DE MONTERREY**

QUE PRESENTA

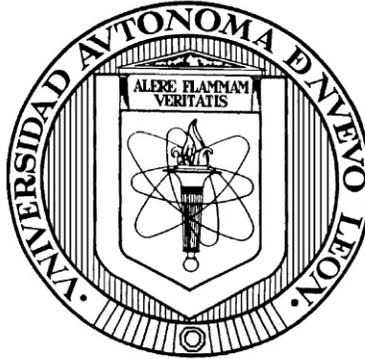
MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ VALLEJO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

NOVIEMBRE 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA - VETERINARIA



**DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS CON EL COMPLEJO
RESPIRATORIO CANINO EN PERROS DEL ÁREA METROPOLITANA DE
MONTERREY**

Por

MVZ. MARÍA VERÓNICA GONZÁLEZ VALLEJO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL.**

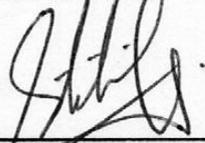
Noviembre 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

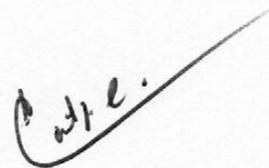
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA VETERINARIA

DETECCIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS CON EL COMPLEJO RESPIRATORIO CANINO EN PERROS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY

Aprobación de la Tesis:



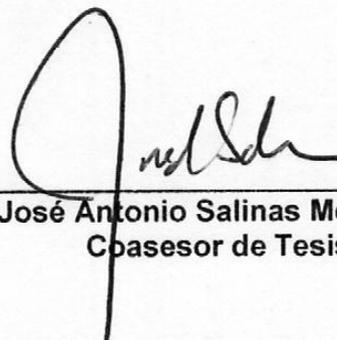
Dra. Sibilla Cedillo Rosales
Asesor Principal de la Tesis



Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Asesor Externo de Tesis



Dr. Ramiro Avalos Ramírez.
Coasesor de Tesis



Dr. José Antonio Salinas Meléndez
Coasesor de Tesis



Dra. Diana Elisa Zamora Ávila
Coasesor de Tesis



Mc. Armando Trejo Chávez
Coasesor de Tesis

Noviembre 2014

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada, a Dios, por permitir que iniciara y concluyera tan grande propósito.

A mi madrina Socorro, por apoyar cada idea que atraviesa mi cabeza, por disfrutar conmigo cada éxito y apoyar en cada lección amarga de la vida. Te quiero con toda el alma Nina!!!

A mis tías.....Minerva, Chelita, Lily, y Gloria, por sentir orgullo de cada logro académico que alcanzo.

A mis compañeros de generación de Maestría (2012-2014), los cuales fueron siempre un apoyo para avanzar, convirtiéndose en mucho más que compañeros.....amigos!!!

A Benito, por estar al pendiente de mi trabajo colaborando en todo lo que fue necesario; a Vladimir, por ayudarme en las necropsias en el momento y situación que se presentaron; a Coque, por tantas veces que vino a mi casa a explicarme dudas de trabajos o tareas.

A mi asesora de tesis, Dra Sibilina Cedillo, porque con mucha paciencia y una sonrisa, tomo mi mano y me guío para alcanzar este proyecto; demostrando que su trabajo es más que una obligación para ella, es su vocación, la cual ejerce con dedicación y amor.

Al Dr Trejo, por tantas horas de trabajo dedicadas a mi enseñanza y elaboración de tesis.

Al Dr Ramiro, por estar al pendiente de mi investigación y de que no me faltara el material.

Al Dr Salinas, por su disposición y apoyo.

A Phany y a Cinthia (Laboratorio de Genética), por estar siempre dispuestas a ayudarme, haciéndolo de buena manera.

A la Dra Karina y a Paola (Patología), por su apoyo y gran disposición.

A Leslie (Virología), por ser un reto en mi vida, hoy superado.

A César Romo (Biología), por su gran apoyo y su gran interés en la investigación.

A mis maestros del posgrado, por ayudar a incrementar mi sed de conocimiento.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y ahora la Facultad de Agronomía; por haberme permitido ingresar al posgrado conjunto.

A CONACYT, por apoyar los sueños y metas de superación que tenemos los aspirantes.

A Claudia (Posgrado), por estar siempre dispuesta y resolver cuanta duda tenemos los estudiantes.

A todos los médicos que contribuyeron a realizar esta investigación, su participación fue fundamental en el desarrollo de la misma.

DEDICATORIA

A mi esposo Luis, por todo el amor y la paciencia demostrada durante todo mi estudio del posgrado; por ayudarme a lograr esta meta en vida. Tu compañía y apoyo Precioso, hicieron que este camino no fuera tan pesado.

A mis hijas Andrea y María, por tantas horas que no estuve al 100 con ustedes; por aceptar mis metas como suyas, por disfrutar mis éxitos y sufrir mis fracasos. Preciosas, esto es por ustedes y para ustedes. Las amo!!!!

A mi madre, por tener Fe en mí, mi vida, esto es para ti.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DEDICATORIA	vi
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
NOMENCLATURA	xii
RESUMEN.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos.....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.1.3 Metas.....	3
1.1.4 Hipótesis.....	4
2. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1 Complejo Respiratorio Canino.....	5
2.2 Virus del Distemper Canino.....	7
2.2.1 Epidemiología del Virus de Distemper Canino.....	9
2.2.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CDV.....	12
2.3 Adenovirus Canino tipo-2.....	14
2.3.1 Epidemiología de las infecciones por CAV-2.....	15
2.3.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CAV-2.....	16
2.4 Virus de la Influenza Canina.....	17
2.4.1 Epidemiología del Virus de la Influenza Canina.....	19
2.4.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos del Virus de la Influenza Canina.....	21
2.5 Virus de la Parainfluenza Canina.....	22
2.5.1 Epidemiología de las infecciones por el Virus de la Parainfluenza Canina... ..	23
2.5.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CPIV.....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25

3.1	Material.....	25
3.1.1	Equipos	25
3.1.2	Material biológico.....	26
3.1.3	Reactivos, estuches comerciales y enzimas.....	26
3.1.4	Reactivos y consumibles para la extracción de ARN/ADN a partir de muestras clínicas.....	27
3.1.5	Reactivos y consumibles para RT-PCR, PCR y electroforesis.	27
3.2	Metodología de la investigación.....	28
3.2.1	Lugar de trabajo.....	28
3.2.2	Obtención y tipos de muestras.....	28
3.2.3	Extracción de Ácidos Nucleicos (ARN/ADN).	29
3.2.4	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	31
3.2.5	Análisis de los resultados de las muestras clínicas de caninos del área metropolitana de Monterrey.....	39
3.2.6	Histopatología de caninos con Complejo Respiratorio Canino	40
4.	RESULTADOS.....	48
4.1	Resultado del PCR para el Adenovirus Canino tipo 2.....	48
4.2	Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Distemper Canino	49
4.3	Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Parainfluenza Canina ..	49
4.4	Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Influenza Canina	50
4.5	Resultado del muestreo realizado en Monterrey y su área metropolitana para los virus de CAV-2, CDV, CPIV y CIV en cánidos con problemas respiratorios.	52
4.6	Resultados del análisis estadístico de los datos	62
4.7	Resultado histopatológicos de caninos que perecieron por CRC.	63
5.	DISCUSIÓN.	80
6.	CONCLUSIONES.....	90
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	92
	ANEXOS.....	100
	RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS AL COMPLEJO REPIRATORIO CANINO.....	100
	ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA PARA CANIDEOS CON ENFERMEDADES RESPIRATORIAS	104

PROTOCOLO DE VACUNACIÓN UTILIZADO POR CLÍNICOS DEL ÁREA
METROPOLITANA DE MONTERREY 105

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de virus asociados al CRC en caninos del área metropolitana de Monterrey, N.L.	33
Tabla 2. Proporción de mono o co-infecciones virales en muestras de caninos afectados con el Complejo Respiratorio Canino en el área metropolitana de Monterrey, N.L.	52
Tabla 3. Resultados de los PCR, RT-PCR/PCR anidado de las muestras recolectadas de enero 2013 a marzo 2014 para los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV a partir de hisopados nasales y conjuntivales.	54
Tabla 4. Resultados de las muestras recolectadas en el municipio de San Nicolás de los Garza para los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.	55
Tabla 5. Resultados de las muestras recolectadas en el municipio de Escobedo, N.L. para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.	56
Tabla 6. Resultados de las muestras procesadas del municipio de Apodaca, N.L., para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.	57
<i>Tabla 7. Resultados de las muestras analizadas del municipio de Monterrey, N.L., para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.</i>	<i>58</i>
Tabla 8. Resultado de las muestras procesadas del municipio de Guadalupe N.L., para el diagnóstico de los virus de CAV-2, CDV, CPIV y CIV.	59
Tabla 9. Resultados correspondientes a las muestras procesadas para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV acorde al rango de edad.	60
Tabla 10. Resultados de las pruebas moleculares realizadas a los caninos que perecieron por CRC.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Resultados correspondientes a las muestras procesadas para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV acorde al rango de edad.	48
Figura 2. Electroforesis de los productos amplificados en el RT-PCR y PCR anidado para el CDV.	50
Figura 3. Electroforesis de los productos de RT-PCR y PCR anidado para el CPIV.	51
Figura 4. Electroforesis del PCR anidado para el CIV.	51
Figura 5. Resultado de las muestras de CDV analizadas mediante SNAP y RT-PCR/PCR anidado.	62
Figura 6. Resultados Histopatológicos del caso 1 de CRC.	67
Figura 7. Resultados Histopatológicos del caso 2 de CRC.	69
Figura 8. Resultados histopatológicos del caso 3 de CRC.	72
Figura 9. Resultados a la histopatología del caso 4 de CRC.	75
Figura 10. Resultados histopatológicos del caso 5 de CRC.	78

NOMENCLATURA

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
°C	Grados Celsius
CAV-2	Adenovirus Canino tipo 2
CDV	Virus del Distemper Canino
CIV	Virus de la Influenza Canina
cm	Centímetros
CPIV	Virus de la Parainfluenza Canina
CRC	Complejo Respiratorio Canino
g	Gravedades
H	Horas
Kb	Kilobases
L	Litros
L. canicola	<i>Leptospira canicola</i>
L.icterohemorrhagiae	<i>Leptospira icterohemorrhagiae</i>
MALT	Mucosa asociada al tejido linfático
ml	Mililitros
mM	Milimolar
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
pb	Pares de Bases
PI	Postinfección
pmol	Picomoles
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RdpR	ARN polimerasa dependiente de ARN viral
RT	Transcriptasa Reversa
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
SNAP	Prueba inmunoenzimática de diagnóstico rápida con base en detección de antígeno
spp	Especies
TA	Temperatura Ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCID50/ml	Dosis infectiva al 50% para el cultivo celular por mililitro
μ	Microlitro
μM	Micromolar
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
w/v	Peso sobre volumen
%	porcentaje

RESUMEN

El Complejo Respiratorio Canino (CRC), es un síndrome de distribución mundial de origen multifactorial que afecta principalmente a perros que se encuentran cohabitando en grupo. La presencia y participación de distintos virus y otros agentes infecciosos, solos o en combinación, es fundamental para establecer la terapia y pronóstico del CRC; además permite conocer la distribución de estos agentes en las poblaciones de caninos. En el presente estudio, se evaluaron 102 muestras de hisopados conjuntivales y nasales de caninos con sintomatología sugerente de CRC con el fin detectar la presencia de los Virus de Distemper Canino (CDV), Adenovirus Canino tipo 2 (CAV-2), Parainfluenza Canina (CPIV) e Influenza Canina (CIV) en su forma individual o combinada utilizando PCR, RT-PCR y PCR anidado. El muestreo se realizó de enero de 2013 hasta marzo del 2014 con la ayuda de veterinarios de clínicas distribuidas en Monterrey y su área metropolitana. El cual se complementó con los antecedentes clínicos y de inmunizaciones previas contra los virus de estudio a excepción de CIV. Adicional a esto se analizaron 5 ejemplares que perecieron por problemas respiratorios compatibles con CRC, en estos casos se realizaron tanto estudios histopatológicos como moleculares. Como resultado de las muestras analizadas en hisopado nasal y conjuntival, se encontró que el virus detectado con mayor frecuencia mediante RT-PCR Y PCR anidado fue CDV (71.25%); seguido de CIV (14.70%) y por último CPIV (6.86%). En el 17.6% de los casos se prestaron co-infecciones; siendo la más frecuente 72.2% entre CDV y CIV, en el 38.8% entre CDV y CPIV, y solamente en uno de los casos 5.5% se observó la presencia de los tres virus (CDV, CIV y CPIV). En la histopatología y análisis moleculares de los 5 casos por CRC se detectó mediante RT-PCR y PCR anidado en 2 de los 5 casos co-infección por tres virus (CDV, CIV y CAV-2) y co-infección por CDV y CIV en los restantes 3 casos, en estos casos para CPIV no se obtuvieron resultados positivos.

Mediante esta investigación por un lado se adaptaron y establecieron los procesos basados en biología molecular para diagnosticar la presencia de virus asociados al CRC. La disposición de estas herramientas tecnológicas de alta sensibilidad y especificidad puede proporcionar certeza y confiabilidad en el diagnóstico para detectar y diferenciar la presencia de virus de tracto respiratorio de caninos. Por otra parte, hasta donde se sabe, la presencia y circulación ya sea solos o en combinación de los distintos agentes virales asociados al CRC se reporta por primera vez en el área metropolitana de Monterrey, N.L. Dado lo anterior, es necesario definir estrategias que permitan establecer medidas adecuadas de prevención, tratamiento y control de estas infecciones en la población canina de esta área.

1. INTRODUCCIÓN.

El Complejo Respiratorio Canino (CRC), es un síndrome de distribución mundial, afecta principalmente perros que se encuentran en confinamiento, presentando sintomatología como tos seca (Traqueobronquitis), secreción nasal y/o conjuntival. Esta presentación de la enfermedad es generalmente aguda, suele haber un restablecimiento de la salud en un periodo de 8 a 10 días, de manera espontánea y regularmente sin tratamiento; sin embargo, existen casos en que el cuadro clínico se vuelve crónico. Este síndrome es de origen multifactorial, es ocasionada por las condiciones ambientales que ocasionan estrés, la edad y estado inmunológico del paciente así como la presencia de ciertos virus y bacterias en tracto respiratorio alto y bajo. Existe una relación entre la edad del perro, su historial de vacunación y el medio ambiente en el cual se encuentre, esto principalmente con referencia a la disminución de anticuerpos maternos alrededor de los 3 meses de vida y la correcta aplicación de vacunas.

Dentro de los agentes virales que podemos encontrar formando parte del CRC, podemos mencionar el Virus de la Parainfluenza Canina, el Adenovirus tipo 2, el Virus de la Influenza Canina, el Herpesvirus Canino, y recientemente se ha asociado a este síndrome al Coronavirus canino tipo 2. Por otro lado el Virus del Distemper Canino (CDV), presenta una sintomatología inicial muy parecida al CRC por lo cual es de suma importancia para el clínico veterinario, disponer de una herramienta de diagnóstico rápida, sensible y específica para detectarlo a tiempo, y así evitar su diseminación, ya que este virus además de infectar vías

respiratorias, afecta vías digestivas y Sistema Nervios Central, siendo una de las principales causas de muerte en caninos.

Actualmente, el clínico veterinario tiene a su disposición pruebas inmunoenzimáticas (SNAP) de diagnóstico rápido solamente para el Virus de Distemper Canino, cuyo fundamento es la detección del antígeno del virus; sin embargo, estas pruebas han demostrado tener baja sensibilidad por lo que se presentan falsos negativos. Por otro lado no se tienen métodos diagnósticos comerciales para el resto de los agentes etiológicos virales y hasta ahora no existen laboratorios que nos permitan hacer un diagnóstico de estos agentes en la región.

Recientes estudios, demuestran el uso adecuado de técnicas moleculares muy sensibles y específicas para el diagnóstico oportuno de estos virus; tales como, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés (PolymeraseChainReaction)), y sus variantes.

En nuestro estudio se ha utilizado para el diagnóstico de los virus de Distemper Canino, de Parainfluenza Canina, de Influenza Canina un RT-PCR seguido de un PCR anidado así como un PCR para el Adenovirus canino tipo dos. El objetivo principal de esta investigación fue establecer un método diagnóstico que nos permita detectar que agentes virales se involucran en los problemas respiratorios que se presentan en perros de área metropolitana de la ciudad de Monterrey, Nuevo León determinando la frecuencia de estos virus.

1.1 Objetivos.

1.1.1 Objetivo General.

Determinar la presencia de los virus Distemper canino, Adenovirus tipo 2, Influenza tipo A, y Parainfluenza en cánidos que presentan sintomatología sugerente de Complejo Respiratorio Canino, utilizando técnicas moleculares (RT-PCR y PCR) en Monterrey y su área metropolitana.

1.1.2 Objetivos específicos.

1. Estandarizar la técnica de RT-PCR y PCR anidado para la detección molecular de fragmentos genómicos de CDV y CPIV.
2. Estandarizar la técnica de RT-PCR para la detección molecular de fragmentos genómicos de CIV.
3. Estandarizar la técnica de PCR para el diagnóstico de CAV-2.
4. Establecer la presencia de los CDV, CIV, CAV-2 y CPIV en canidos con sintomatología sugerente de Complejo Respiratorio Canino que se presentan en Monterrey y su área Metropolitana.

1.1.3 Metas.

Establecer un método diagnóstico rápido, sensible y específico para el diagnóstico de agentes virales involucradas en el CRC que apoyen al clínico de pequeñas especies en el Noreste del país para un mejor diagnóstico, prevención y control del mismo.

1.1.4 Hipótesis.

A través de RT-PCR/PCR, utilizando muestras clínicas de caninos que presentan sintomatología sugerente del CRC se pueden detectar el CDV, CIV, CPIV y CAV-2 en su forma individual o combinada en canidos del Área metropolitana de Monterrey.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1 Complejo Respiratorio Canino.

El Complejo Respiratorio Canino (CRC) es un síndrome que generalmente sucede en perros que se encuentran en confinamiento (tiendas de mascotas, centros de entrenamiento o refugio de animales) (Decaro et al., 2004; Erles, Dubovi, Brooks, & Brownlie, 2004; Mochizuki, Yachi, Ohshima, Ohuchi, & Ishida, 2008). Los perros afectados generalmente presentan tos seca y descarga nasal, la cual desaparece de manera espontánea y no requiere tratamiento; sin embargo, algunos caninos desarrollan bronconeumonías que pueden ser fatales (Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008). Varios estudios de brotes de la enfermedad, demuestran que su origen es multifactorial y compleja, involucrándose virus como el de la Parainfluenza Canina y el Adenovirus tipo 2; así como bacterias, tales como *Bordetellabronchiseptica* y mycoplasmas (Buonavoglia & Martella, 2007; Damian, Morales, Salas, & Trigo, 2005; Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008). Por otro lado también existen reportes de la presencia de hongos, tales como, *Aspergillus fumigatus*, hongo oportuno y de importancia principalmente en aves; sin embargo, en perros que sufren inmunosupresión o que han llevado tratamientos prolongados con antibióticos, es posible encontrarlo. Por otro lado micosis sistémicas pueden ser producidas por *Blastomycesdermatidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* y *Cryptococcus neoformans* (Zachary James F. & McGavin Donald, 2012).

El virus que ha sido reportado con mayor frecuencia en CRC, es el Virus de la Parainfluenza canina (Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008), así mismo el Adenovirus tipo 2, se han recuperado de perros que sufren del CRC, particularmente en caninos jóvenes que se encuentran en confinamiento (Damian et al., 2005; Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008; Rodriguez-Tovar et al., 2007). Por otro lado el Herpesvirus canino, ha sido también aislado de perros que padecen esta enfermedad, pero su participación sigue siendo incierta (Erles et al., 2004). La detección de un Coronavirus similar al Coronavirus bovino, y su asociación con el CRC en perros del Reino Unido se ha documentado recientemente (Erles, Toomey, Brooks, & Brownlie, 2003; Priestnall, Brownlie, Dubovi, & Erles, 2006; Priestnall, Pratelli, Brownlie, & Erles, 2007). Aunado a esto, se han presentado brotes del Virus de Distemper canino usualmente caracterizados con síntomas respiratorios más severos, que van acompañados con signos gastrointestinales y del sistema nervioso, presentándose con mayor frecuencia, en áreas geográficas donde la vacunación no se practica con frecuencia (Beineke, Puff, Seehusen, & Baumgartner, 2009; Rodriguez-Tovar et al., 2007). Estas infecciones primarias promueven la proliferación de agentes bacterianos como la *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma cynos* y *Streptococcus equi*, lo que puede dar como resultado cuadros de bronconeumonías (Buonavoglia & Martella, 2007; Chvala et al., 2007; Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008). Las enfermedades virales causadas por los agentes etiológicos antes descritos tienen como medida principal de prevención la vacunación, aunque no existen vacunas para todos estos agentes. Además se ha

demostrado que una disminución en la inmunidad puede llevar a brotes en poblaciones caninas (Lan et al., 2006).

En estudios retrospectivos realizados recientemente en México, se ha descrito la presencia de Parainfluenza canina, Distemper canino y Adenovirus tipo 2, de manera individual y combinada, en caninos con bronconeumonías severas, las cuales provocaron la defunción de los animales (Damian et al., 2005). Rodriguez-Tovar en el 2007, realizó un estudio en el cual reportan la presencia simultánea de CDV y CAV-2 en un cachorro, hembra de 8 semanas de edad, la cual procedía de una perrera ubicada en Monterrey y que tenía antecedentes de 2 dosis de vacunas contra CDV, CAV-2, CPIV, Parvovirus canino, *L. canicola* y *L. icterohemorrhagiae* previas al diagnóstico de los agentes etiológicos, además de observarse cambios histológicos sugerentes de una infección bacteriana secundaria. En dicho estudio, fue difícil determinar el orden en que estas infecciones aparecieron en los pulmones, pero se presume que el CDV o el CAV-2, estaba presente en el perro desde la perrera y previo a que se aplicaran las vacunas (Rodriguez-Tovar et al., 2007).

2.2 Virus del Distemper Canino.

El Virus del Distemper Canino (siglas CDV del inglés “Canine Distemper Virus”), pertenece al género Morbillivirus, de la familia Paramixoviridae, agrupada en el orden de los Mononegavirales (Carvalho et al., 2012; Céspedes, Cruz, & Navarro, 2010; Frisk, König, Moritz, & Baumgartner, 1999; Martella, Elia, & Buonavoglia, 2008; Simon-Martinez, Ulloa-Arvizu, Soriano, & Fajardo, 2008; Stanton, Poet,

Frasca, Bienzle, & Brown, 2002). Los viriones son envueltos, con forma pleomorfica, de 150 a 300 nm de diámetro, posee un genoma no segmentado de ácido ribonucleico (ARN) de cadena simple con polaridad negativa de aproximadamente 15,616 nucleótidos (Beineke et al., 2009; Simon-Martinez et al., 2008). Incluyen 6 genes organizados en unidades transcripcionales separadas y no traslapadas. En dirección 5' – 3' codifica 7 proteínas: la proteína de la nucleocápside (gen N de 1.5 kb), la fosfoproteína (gen P de 1.5 kb), la proteína de la matriz (gen M de 1 kb), la proteína de fusión (gen F de 1.9 kb), la hemaglutinina (gen H; de 1.8kb) y la polimerasa (gen L de 6.5 kb)(Céspedes et al., 2010; Martella et al., 2008; Simon-Martinez et al., 2008). Las proteínas estructurales corresponden a las proteínas de matriz, de la nucleocápside, de la polimerasas, de la fosfoproteína, así como las glicoproteínas de envoltura, hemaglutinina y de fusión. Estas últimas, son responsables del reconocimiento e ingreso del virus a la célula blanco, por lo que son el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes sintetizados por el sistema inmune del hospedero (Céspedes et al., 2010; Vandeveld & Zurbriggen, 2005). El CDV ha sido reportado en canidos domésticos, hurones, canidos silvestres, zorros, chacales, coyotes, hienas, leones, tigres, leopardos, guepardos, focas, leones marinos y delfines. El perro doméstico es la especie donde más individuos han presentado la enfermedad y con sintomatología más grave y aunque se ha encontrado también en félidos silvestres, CDV no se ha detectado en los gatos domésticos (Carvalho et al., 2012).

La introducción del uso de vacunas con virus vivo modificado desde 1950 contribuyó enormemente al control de la enfermedad a nivel mundial (Ek-Kommonen, Sihvonen, Pekkanen, Rikula, & Nuotio, 1997; Martella et al., 2008; Yong-Hwan, Kyu-Woan, Hwa-Young, Han Sang, & Hong-Ryul, 2001)

2.2.1 Epidemiología del Virus de Distemper Canino.

La infección por este virus puede contraerse a través de aerosoles o por contacto directo con un animal infectado, siendo el sitio de replicación inicial del mismo el tracto respiratorio alto, donde tiene el primer contacto con el sistema inmune del hospedero (Carvalho et al., 2012; Céspedes et al., 2010).

Se han observado fluctuaciones en la prevalencia de la enfermedad; sin embargo, la frecuencia de la misma incrementa en temporada invernal (Martella et al., 2008; Park et al., 2012; Yong-Hwan et al., 2001). La edad que muestra mayor susceptibilidad a la infección es en animales de 3 a 6 meses (Yong-Hwan et al., 2001), en donde la inmunidad materna declina, en comparación con animales adultos, los cuales poseen una mayor resistencia e inmunidad adquirida por la aplicación de vacunas (Martella et al., 2008).

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 (Bonami, Rudd, & von Messling, 2007).

Durante las primeras 24 horas post-infección, la replicación viral ocurre en macrófagos y células B y T circulantes, después se distribuyen por vía linfática a los nódulos linfáticos bronquiales y tonsilas (Carvalho et al., 2012; Vandeveldel & Zurbriggen, 2005). La replicación viral primaria, conduce a una duradera y severa inmunosupresión (Carvalho et al., 2012). Después de esta replicación local, el patógeno se distribuye vía linfática y por sangre al tejido hematopoyético distante durante la primera fase de viremia (Beineke et al., 2009). El virus una vez replicado en el tracto respiratorio alto puede dirigirse a los pulmones y causar una neumonía viral, o por sus efectos inmunosupresores en los pulmones dar origen a infecciones bacterianas. Las infecciones secundarias con *Bordetella bronchiseptica* y micoplasmas son frecuentes y provocan bronconeumonía supurativa que ponen en peligro la vida del canido (Chvala et al., 2007; Zachary James F. & McGavin Donald, 2012). Además, puede presentarse como una co-infección con otros virus tales como el CAV-2 (siglas CAV-2 del inglés “Adenovirus Canino tipo 2”) (Damian et al., 2005; Rodriguez-Tovar et al., 2007).

Los primeros signos clínicos que podemos observar en los canidos domésticos, son anorexia, depresión, letargo, y pérdida de peso. Fiebre transitoria además de ligera linfopenia, pueden observarse 3 a 6 días post-infección y coincide con la primer viremia que resulta en infección generalizada del tejido linfoide, bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea, mucosa asociada al tejido linfático (MALT, por sus siglas en inglés) y macrófagos en la lámina propia del tracto gastrointestinal, así como en las células Kuppfer del hígado (Beineke et al., 2009).

Después de la viremia, alrededor de 8 a 10 días postinfección, CDV se disemina vía sanguínea y por fluido cerebroespinal al tejido epitelial y Sistema Nervioso Central (SNC). Los Linfocitos infectado en el tejido epitelial, liberan gran cantidad de virus favoreciendo la infección del tracto digestivo, respiratorio y urinario (células epiteliales)(Carvalho et al., 2012; Von Messling, Milosevic, & Cattaneo, 2004). Algunas cepas durante la invasión masiva de la mucosa respiratoria y de sus células epiteliales infectan neuronas receptoras cercanas y de forma anterógrada, a través de sinapsis neuronales, alcanzan los nervios y bulbo olfatorio, lugares donde comienza el proceso patológico, diseminándose luego al SNC (Rudd, Cattaneo, & von Messling, 2006). Alrededor del día 28 postinfección, la enfermedad se acompaña con la presencia de viriones en el líquido cefalorraquídeo, explicando la gran cantidad de focos de desmielinización ubicados bajo la piamadre en capas subyacentes del cuarto ventrículo, las cortezas cerebral y cerebelar (Céspedes et al., 2010). Una segunda viremia ocurre varias días después, en donde con frecuencia observamos fiebre severa, y resulta en infección del parénquima y células de todo el cuerpo (Carvalho et al., 2012).En esta etapa, el resultado de la enfermedad y la severidad de los signos clínicos, son muy variados, ya que depende de la virulencia de la cepa que este infectando, la edad del paciente y el estado en que se encuentre su sistema inmunológico(Beineke et al., 2009; Carvalho et al., 2012; Martella et al., 2008).

Estudios realizados en hurones por Bonami, en el 2007, nos demuestra que la cepa 5804P causa una enfermedad con una duración de 2 semanas, pero no se observan signos neurológicos, mientras que la cepa A75, muestra un desarrollo

más prolongado en donde se observan signos neurológicos (Bonami et al., 2007). Sin embargo; si el perro muestra un sistema inmunológico fuerte, el virus se elimina de los tejidos y el animal se recupera completamente (Beineke et al., 2009). En los perros, donde el sistema inmunológico no responde efectivamente, el virus continúa replicándose y se disemina rápidamente en todo el cuerpo y al SNC (Martella et al., 2008).

2.2.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CDV.

De acuerdo a las manifestaciones clínicas, podemos observar la presentación catarral y la presentación neurológica, o una combinación de ambas; también denominada forma sistémica aguda, la cual se distingue con facilidad de la forma crónica que involucra signos neurológicos (Beineke et al., 2009). En la fase aguda, el virus se puede encontrar en cualquier secreción del cuerpo, además es acompañada de varios signos clínicos tales como tos, disnea, secreción nasal purulenta, conjuntivitis; seguidos por signos gastrointestinales como diarrea y vómito; además de síntomas cutáneos como pústulas que en ocasiones se complican con infecciones bacterianas secundarias y disturbios neurológicos (Beineke et al., 2009; Chvala et al., 2007). En algunos casos una mejora en la respuesta inmune y un aumento en la producción de anticuerpos neutralizantes específicos del virus, puede promover la recuperación del paciente; sin embargo, a pesar de la eliminación del virus de los órganos principales y de la sangre periférica, CDV puede persistir en ciertos tejidos, incluyendo la úvea, el SNC, los

cojinetes plantares y los órganos linfoides (Beineke et al., 2009; Martella et al., 2008). En perros, donde la respuesta inmune falla, se observa una replicación masiva del virus y una distribución a través de todo el cuerpo, la replicación del virus en el SNC, trae como consecuencia una aguda desmielinización y la mayoría de los canes, muere dentro de las 2 a 4 semanas postinfección (Martella et al., 2008). La hipoplasia del esmalte dental y la hiperqueratosis de los cojinetes plantares y la nariz, son signos que regularmente observamos en caninos que sobrevivieron a una infección subclínica o subaguda (Martella et al., 2008). Los signos nerviosos son diversos y progresivos e incluyen mioclonos, nistagmos, ataxia y déficit en la reacción postural (Amude, Alfieri, & Alfieri, 2007; Beineke et al., 2009; Vandeveld & Zurbriggen, 2005). Temblores musculares involuntarios o contracciones de los músculos y convulsiones precedidos de movimientos masticatorios, son signos que se consideran típicos de la infección por CDV (Martella et al., 2008). Signos neurológicos se observan 40 a 50 días PI a consecuencia de una desmielinización crónica inducida por CDV. El virus persiste en el SNC y la enfermedad evoluciona de forma discontinua pero progresiva; a pesar de esto, algunos perros se recuperan pero los movimientos involuntarios persisten en ellos (Martella et al., 2008; Vandeveld & Zurbriggen, 2005).

Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos están presentes en las células epiteliales de la piel, los bronquios, el tracto gastrointestinal, el tracto urinario, el conducto biliar, las glándulas salivales, las glándulas adrenales, nódulos linfáticos, bazo y SNC (Martella et al., 2008). Una bronquiolitis necrozante, necrosis de tipo II en neumocitos, neumonía intersticial y bronconeumonía

supurativa son lesiones características que se observan en pulmones de perros con CDV (Damian et al., 2005).

2.3 Adenovirus Canino tipo-2.

El Adenovirus Canino (CAV, por sus siglas en inglés) pertenece al género Mastadenovirus de la familia Adenoviridae (Chvala et al., 2007; Decaro, Martella, & Buonavoglia, 2008). Son viriones sin envoltura, con perfil hexagonal, con simetría icosaédrica, de 70 a 90 nm de diámetro, con una fibra (glicoproteína) que sobresale de cada vértice de la cápside (Maclachlan & Dubovi, 2010). El genoma consiste en una sola molécula lineal de DNA de doble hebra, 26-45 kb de tamaño, con repeticiones terminales invertidas (Maclachlan & Dubovi, 2010).

El Adenovirus puede ser agrupado en dos serotipos distintos, pero relacionados. CAV-1 es el agente etiológico de la hepatitis canina, y CAV-2, el cual es el responsable de la laringotraqueítis en perros (Bulut et al., 2013; Decaro et al., 2008). Ambos tipos pueden ser recuperados de perros que sufren del CRC, pero se encuentra con mayor frecuencia el CAV-2 (Benetka et al., 2006; Erles et al., 2004). CAV-2 se caracteriza por desórdenes del tracto respiratorio con signos clínicos como: faringitis, tonsilitis, traqueítis y bronquitis (Bulut et al., 2013). El análisis de la secuencia completa del genoma de ambos, CAV-1 y CAV-2, demostró que poseen una homología de 75%, sin embargo tienen diferente tropismo de tejido (CAV-2 con mayor tropismo para tracto respiratorio y en menor grado el tracto digestivo) (Buonavoglia & Martella, 2007; Decaro et al., 2008; Hu et al., 2001).

2.3.1 Epidemiología de las infecciones por CAV-2.

Los miembros de la familia Adenoviridae afectan a una gran variedad de vertebrados, incluyendo mamíferos, peces, aves y reptiles (Bru, Salinas, & Kremer, 2010). Los canidos como los perros, zorros rojos, lobos y coyotes, son altamente susceptibles a infecciones por Adenovirus canino (Decaro et al., 2008).

La ruta de infección por CAV-2 es oronasal (Buonavoglia & Martella, 2007; Decaro et al., 2008), el virus se replica en la superficie de las células de la mucosa nasal, faringe, criptas tonsilares, células mucosas en la tráquea y bronquios en las glándulas peribronquiales, en la célula del epitelio bronquiolar no ciliado y en las células epiteliales alveolares de tipo 2 (Buonavoglia & Martella, 2007). Conjuntamente, el virus, puede ser aislado de nódulos linfáticos y retrofaríngeos, así como de estómago e intestinos (Buonavoglia & Martella, 2007). El pico de la infección se incrementa por 3 a 6 días, PI (Buonavoglia & Martella, 2007). Posteriormente, la carga de virus disminuye rápidamente en relación a la cantidad de anticuerpos, así que CAV-2 no puede ser aislado alrededor de 9 días posteriores a la infección (Buonavoglia & Martella, 2007).

EL CAV se ha detectado en canidos de distintos países del mundo, se ha encontrado en estudios epidemiológicos su presencia de 2.9% en Japón, (Mochizuki et al., 2008); también fue reportado en un estudio postmortem por Damián et al., realizado en México, encontrando en un 57% de los casos la presencia de CAV, mientras que en 11% de los casos se observó co-infección entre CAV y CDV, y en 3% de los casos co-infección entre CPIV y CAV. Por otro

lado, Rodríguez-Tovar, en el 2007, reportó en Monterrey, Nuevo León, México un caso de coinfección entre CDV y CAV-2. De la misma manera, Chvala et al., reporta un caso en Austria, donde se encontró de manera simultánea, CDV, CAV-2 y *Mycoplasma cynos* (Chvala et al., 2007; Damian et al., 2005; Mochizuki et al., 2008; Rodriguez-Tovar et al., 2007).

2.3.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CAV-2

Los caninos que se infectan con CAV-2, generalmente presentan un cuadro clínico agudo, sobre todo cuando se presenta de manera individual; éstos, generalmente se recuperan espontáneamente sin mostrar signos de la enfermedad, y rara vez termina con la muerte (Buonavoglia & Martella, 2007; Rodriguez-Tovar et al., 2007); por otro lado, el cuadro clínico puede evolucionar a una neumonía bronco intersticial con necrosis y exfoliación del epitelio bronquiolar y alveolar, seguido por una hiperplasia de los neumocitos de tipo 2, esto sucede generalmente, cuando existe otro virus o bacteria de manera simultánea en el CRC (Buonavoglia & Martella, 2007; Damian et al., 2005; Rodriguez-Tovar et al., 2007).

Hallazgos microscópicos, tales como, la presencia de grandes inclusiones basófilas en los núcleos bronquiolares, bronquiales y las células alveolares, son cambios producidos por CAV-2, que pueden observarse de manera característica (Rodriguez-Tovar et al., 2007). De igual manera, es posible detectar antígenos de CAV-2 y material genético en el núcleo del epitelio bronquial, en especial en

aquellas células que contienen grandes inclusiones basófilas(Rodríguez-Tovar et al., 2007).

Damian, et al., en el 2005, mediante un estudio retrospectivo, nos demuestra la presencia de CAV-2, CDV, CPIV de manera individual, y en donde la asociación más frecuente fue entre CPIV y CDV, en perros de la Cd. de México (Damian et al., 2005); por otro lado, Rodríguez-Tovar reporta un caso, específicamente de la Cd. de Monterrey en donde se encuentra CDV y CAV-2 de manera simultánea (Rodríguez-Tovar et al., 2007).

2.4 Virus de la Influenza Canina

El virus de la influenza, pertenece a la familia Orthomyxoviridae. Esta familia se subdivide en los virus de influenza A, B, C, Togotavirus e Isavirus (Salazar, Lopez-Ortega, Leon-Avila, Ramirez-Gonzalez, & Castro-Mussot, 2010). Estos virus se clasifican según las características antigénicas de dos de sus proteínas internas; la proteína Matriz (M) y la Nucleoproteína (NP). Por otra parte dada la gran variabilidad que posee el virus influenza tipo A, este se subdividió en subtipos según las características antigénicas de las proteínas de superficie Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA).

El genoma del virus de la Influenza A está contenido en 8 cadenas simples de ARN, que codifican para 10 proteínas: los segmentos 1, 2 y 3 codifican para las proteínas PB2, PB1 y PA, los cuales forman un complejo de ribonucleoproteína con la proteína NP (codificada en el segmento 5), estas constituyen la ARN

polimerasa dependiente de ARN viral (RdpR). El segmento 4 codifica para la proteína hemaglutinina (HA). La proteína neuraminidasa (NA) se encuentra codificada en el segmento 6 del ARN. El segmento 7 codifica para dos proteínas de matriz (M1 y M2). Por último el segmento 8 codifica dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) (Maclachlan & Dubovi, 2010; Salazar et al., 2010). Según la variabilidad de la hemaglutinina y la neuraminidasa se han descrito hasta la fecha 18 (HA) y 11 (NA) subtipos (Tong et al., 2012).

Generalmente, los viriones del virus de la influenza son pleomórficos, de 80 a 120 nm de diámetro, cuya superficie posee alrededor de 500 espículas radiales (de 10 a 14 nm) que se proyectan por la envoltura lipídica (Buonavoglia & Martella, 2007; Salazar et al., 2010).

La influenza es una enfermedad altamente contagiosa la cual se encuentra distribuida globalmente. Esta enfermedad se considera como la enfermedad respiratoria de mayor importancia económica tanto para la salud animal como humana (Buonavoglia & Martella, 2007). Los virus causantes de esta enfermedad infectan y se mantienen en forma asintomática en aves acuáticas silvestres, que ocasionalmente se transmiten a diferentes mamíferos causando infecciones localizadas que pueden generar brotes de esta enfermedad, y en algunos casos conducir a epizootias que pueden llegar a considerarse como panzootias en los nuevos hospederos tal es el caso de la influenza H1N1 que emergió durante el 2009, la cual era una recombinante de cepas que habían infectado varios hospederos (Hayward et al., 2010). Sin embargo el establecimiento de cepas a nuevos hospederos por los diferentes subtipos de los virus de la gripe son poco

comunes y solo se habían identificado en las aves de corral, cerdos, caballos y los seres humanos (Crawford et al., 2005). Posteriormente se identificó la adaptación de un virus de influenza equina al perro (*Canis familiaris*), generando así la cepa de influenza virus específica de canes, la cual se ha asociado a la fecha a la enfermedad respiratoria aguda (Kirkland, Finlaison, Crispe, & Hurt, 2010).

2.4.1 Epidemiología del Virus de la Influenza Canina

El primer caso de influenza canina se documentó en EUA en el estado de Florida durante el 2004 (Buonavoglia & Martella, 2007; Dubovi, 2010; Hayward et al., 2010; Kirkland et al., 2010). A partir de ese aislamiento comenzaron a reportarse en otros estados brotes de esta enfermedad respiratoria, extendiéndose a 11 estados en el 2005 alrededor de EUA, confirmándose solamente en perros mascota (Buonavoglia & Martella, 2007; Hayward et al., 2010). Por otra parte se creía que solo el subtipo H3N8 se encontraba circulante en la población canina; sin embargo en el 2010 se logró identificar el subtipo H3N2 en China, en la actualidad se ha diagnosticado el virus influenza canino en otro continente (D. S. Song et al., 2011). En otros estudios se evaluó la infección de cepas altamente patógenas que podían infectar otras especies como lo es el H5N1 aviar, y el H1N1 pandémico, determinando la susceptibilidad de los perros por estos subtipos (Giese et al., 2008). Por otra parte reportes anteriores mostraron la susceptibilidad a la infección por el virus influenza equino H3N8 en perros galgos, especulando así la transmisión entre especies directamente de los caballos (*Equus caballus*) y facilitado por el contacto directo a los diferentes ambientes

(Crawford et al., 2005). A pesar de que existe una vacuna en EUA, estudio de seroprevalencia indican que este subtipo viral no solo sigue circulando en esta población, si no que se ha transmitido a diferentes perros mascota en los Estados Unidos de América (Boonsuk et al., 2008). Por otra parte nuevos estudios moleculares y serológicos mostraron la transmisión esporádica y la infección por cepas asintomáticas de perros con el subtipo de influenza humana H3N2. Posteriormente estudios en Corea revelaron la transmisión a los perros de este mismo subtipo pero de origen aviar, que logro dispersarse alrededor del sur de Corea durante mayo a diciembre del 2007, comprobando experimentalmente que se podía realizar la transmisión directa entre perros por este subtipo (D. S. Song et al., 2011). Finalmente estudios de laboratorio mostraron una alta susceptibilidad de estos hospederos por el subtipo H5N1, mostrando rápidamente los diferentes síntomas (Giese et al., 2008). Aunque no existe evidencia que sostenga la transmisión de los subtipos H3N2 humano y H5N1 aviar hacia los perros, a la fecha se ha determinado que al menos los subtipos de influenza H3N8 equino y H3N2 aviar son capaces de adaptarse en la población canina y son los que actualmente se encuentran en circulación en América, Asia y Europa (Giese et al., 2008; Harder & Vahlenkamp, 2010; Kirkland et al., 2010; D. S. Song et al., 2011; Wang et al., 2013).

2.4.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos del Virus de la Influenza Canina

Dos diferentes formas clínicas han sido descritas, la forma leve, es la que se presenta en perros en la mayor parte de los casos; en esta forma clínica, los caninos padecen de una fiebre inicial leve, secreción nasal (en un principio clara y puede volverse mucopurulenta), anorexia, letargia; puede presentarse posteriormente una tos (con duración de 10 a 30 días), sin embargo la mayoría de los caninos se recuperan alrededor del día 14 (Buonavoglia & Martella, 2007; Dubovi, 2010; Dubovi & Njaa, 2008). Debido a que el cuadro clínico que presentan los perros infectados solamente con el Virus de Influenza Canina, es muy parecido al que presentan los caninos con CRC, es necesario su confirmación en el laboratorio (Mochizuki et al., 2008).

En sólo 5% de los casos se ha observado la muerte de manera hiperaguda, por lo tanto, se asocia con la forma severa de la enfermedad donde la muerte se produce por hemorragia en el tracto respiratorio, y el cuadro clínico inicia con una fiebre alta (40 a 41°C) acompañada de un aumento en la frecuencia respiratoria (Buonavoglia & Martella, 2007). En la examinación postmortem de esos pacientes, se pudo observar hemorragia extensa en pulmones, mediastino, cavidad pleural; y en la examinación histológica del tracto respiratorio, se revelan datos como, traqueítis, bronquiolitis, bronquitis y bronquioneumonía supurativa (Buonavoglia & Martella, 2007; Crawford et al., 2005).

2.5 Virus de la Parainfluenza Canina.

El Virus de Parainfluenza Canina, pertenece al género Rubulavirus de la familia Paramyxoviridae, agrupada en el orden de los Mononegavirales (Buonavoglia & Martella, 2007; Chen et al., 2012). Estos virus pertenecen a un grupo de patógenos asociados al tracto respiratorio afectando diferentes especies incluido el humano alrededor del mundo (Buonavoglia & Martella, 2007). El virus 5 del simio fue el primer virus en ser aislado de las células del mono pero ahora es sabido que el perro es el huésped natural primario de este virus (Maclachlan & Dubovi, 2010).

El virus, fue aislado por primera vez a finales de 1960, de perros de laboratorio con enfermedad respiratoria del tracto superior (Buonavoglia & Martella, 2007); estudios posteriores revelaron la presencia del virus CPV en gran número de canes, detectando co-infecciones constantes con *Bordetella bronchiseptica* (Buonavoglia & Martella, 2007; Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008). El término “Parainfluenza” fue asignado posteriormente al descubrimiento del virus influenza, designándose así por la similitud de los síntomas que presentaban los individuos infectados. Por otra parte este virus posee la actividad de hemaglutinación así como el de la lisis del ácido siálico por la actividad de la neuraminidasa (Buonavoglia & Martella, 2007).

El Virus de Parainfluenza posee un genoma de RNA de una sola cadena con polaridad negativa (Chen et al., 2012), el cual mide alrededor de 15000 nucleótidos (Buonavoglia & Martella, 2007). Las proteínas del virión incluyen tres proteínas de la nucleocápside; una proteína de unión al ARN (N), una

fosfoproteína (P), una proteína de una polimerasa grande (L) y tres proteínas de la membrana; una proteína de matriz no glicosilada (M), y dos proteínas de la envoltura glicosiladas proteína, una fusión (F) y una proteína de fijación, siendo este último un hemaglutinina - neuraminidasa (HN) o una glicoproteína G que no tiene ni las actividades hemaglutinantes ni de la neuraminidasa (Maclachlan & Dubovi, 2010).

2.5.1 Epidemiología de las infecciones por el Virus de la Parainfluenza Canina

El virus generalmente se transmite por aerosoles; es altamente contagioso y se disemina con mayor facilidad cuando los perros se encuentran en confinamiento; de tal manera que centros de entrenamiento, tiendas de mascotas e incluso hospitales veterinarios, son susceptibles, debido al contacto estrecho entre los perros (Buonavoglia & Martella, 2007; Weese & Stull, 2013).

El período de incubación del virus es de 3 a 10 días (Maclachlan & Dubovi, 2010), y lo perros infectados, continúan secretando el virus 8 a 10 días posteriores a la infección, siendo el momento idóneo para el contagio (Buonavoglia & Martella, 2007), generalmente esto inicia antes de que aparezcan los signos de la enfermedad (Weese & Stull, 2013)

La infección se limita al tracto respiratorio alto, ya que el virus no se replica en macrófagos (Greene & Addie, 2008), afectando a perros a partir de las dos semanas de edad (Buonavoglia & Martella, 2007). El virus se replica en células de la mucosa nasal, faringe, tráquea y bronquios (Buonavoglia & Martella, 2007).

2.5.2 Manifestaciones clínicas y hallazgos patológicos de las infecciones por CPIV.

Los síntomas aparecen generalmente entre los 2 y los 8 días PI, y generalmente duran menos de 6 días, a menos de que haya infecciones secundarias por bacterias (Buonavoglia & Martella, 2007; Weese & Stull, 2013). Los síntomas más comunes son descarga nasal, faringitis, tonsilitis y tos seca, la fiebre es un signo poco frecuente en esta infección (Buonavoglia & Martella, 2007; Weese & Stull, 2013). Normalmente la sintomatología es subclínica (Buonavoglia & Martella, 2007).

En perros infectados de manera experimental, se han podido observar hemorragias petequiales en los lóbulos del pulmón entre el día 3 y el día 8 postinfección (Buonavoglia & Martella, 2007). Antígenos del CPIV han sido reportados presentes en el epitelio bronquial, lo cual concuerda con la patogénesis de la enfermedad (Damian et al., 2005).

La vacuna con virus atenuado contra CPIV se encuentra actualmente en uso, y la vacunación parenteral en combinación con otros antígenos ayudan a controlar la enfermedad y disminuir la severidad de los síntomas; sin embargo, el control de la población, adecuada ventilación y mantener una higiene estricta, son factores de suma importancia para evitar la diseminación del virus (Buonavoglia & Martella, 2007).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Material

3.1.1 Equipos

- Campana de flujo laminar clase II ThermoScientific 1300 SERIES A2.
- Cabina para PCR, UVP UV2 SterilizingPCRcabinet.
- Centrifuga refrigerada, y rotor para tubos de 15ml y de 2 ml Labnet HERMLE Z300K.
- Báscula digital, Denver Instrument APX-200.
- Homogenizador, DaiggerVortexGenie 2 Cat No. 3030a.
- Termociclador, AxygenMaxygene.
- Refrigerador 2 - 4°C.
- Ultra congelador de -20°C.
- Tanque de criopreservación (nitrógeno líquido).
- Bloque térmico
- Cámara de electroforesis Labnet International, Inc. Enduro ElectrophoresisSystem.
- Micropipetas (1000/100 µl); (200/20 µl); (100/10 µl); (10/0.5 µl)
- Histoquinete LEICA TP 1020
- Baño de flotación BOEKEL
- Estufa Bacteriológica J.M Ortiz
- Microtomo MICRUM HM 315
- Histoquinete LEICA TP 1020
- Baño de flotación BOEKEL

- Estufa Bacteriológica J.M Ortiz
- Microtomo MICRUM HM 315
- Canastillas de tinción
- Casettes
- Tabla para cortar
- Colador
- Mango de bisturí con hoja #4

3.1.2 Material biológico.

- Vacuna Vanguard® Plus 5 L4 (Virus vivo modificado y virus muerto. Cada dosis contiene un mínimo de $10^{3.5}$ TCID₅₀ de virus del Distemper Canino, $10^{3.4}$ TCID₅₀ del Adenovirus Canino tipo 2, $10^{5.5}$ TCID₅₀ de virus de la Parainfluenza Canina, CPV $10^{7.2}$ TCID₅₀ de Parvovirus canino, 600 Unidades Nefelométricas (UN) de L. Canicola, 600 UN de L. icterohaemorrhagiae, 600 UN de L. grippotyphosa y 600 UN de L. Pomona)
- Fluvac Innovator EHV 4/1 (Virus Inactivado de Influenza Equina, Tipo A2 (cepa Kentucky 97); Rinoneumonitis Equina Tipo 1; Rinoneumonitis Equina Tipo 4). Producto de Laboratorios Pfizer.

3.1.3 Reactivos, estuches comerciales y enzimas.

- AxyPrepBody Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit.
- SuperScript® III One-Step RT-PCR SystemwithPlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen®).
- Kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen®).

- Marcador de peso molecular para ADN: (1 kb o 100 pb DNA ladder; Fa.Gibco)

3.1.4 Reactivos y consumibles para la extracción de ARN/ADN a partir de muestras clínicas.

- AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA Miniprep Kit (AxygenBioscience).
 - Buffer V-L (lisis viral).
 - Buffer V-N (precipitación de proteínas)
 - Buffer W1A concentrado (para lavado)
 - Buffer W2 concentrado (
 - Buffer TE libre de nucleasas.
 - Columnas de miniprep.
 - Tubo para microcentrifuga de 1.5 ml.
 - Tubos para microcentrifuga de 2 ml.
- Nitrógeno líquido
- Tubos de polipropileno de microcentrífuga.
- Puntillas desechables para micropipeta con filtro de 10 y 200 µl.
- Puntillas desechables sin filtro 100 y 1000 µl.

3.1.5 Reactivos y consumibles para RT-PCR, PCR y electroforesis.

- Agua ddDEPC: H₂O estéril, libre de nucleasas incluido en el kit de RT-PCR onestep Kit AccessQuick™ de PROMEGA®.
- Agua ddPCR: H₂O doblemente desionizada (bidestilada) y esterilizada en autoclave para RT-PCR (Roche).
- SuperScript® III One-Step RT-PCR System with PlatinumTaq DNA Polymerase (Invitrogen®).
- Kit Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen®).
- Solución de agarosa: 1.5% (w/v) en buffer SB.

- Buffer para electroforesis ADN/ARN: SB 1X (.0.30915% Ácido bórico, 0.03% NaOH)
- Marcador de peso molecular para ADN: (1 kb o 100 pb DNA ladder; Fa.Gibco)
- Buffer SB 1X (buffer de electroforesis).
- 6x Loading buffer with Gel Red 300 µl, (GenScript)

3.2 Metodología de la investigación

3.2.1 Lugar de trabajo.

Las muestras fueron analizadas en el Departamento de Virología y en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. En el caso de las muestras de Influenza Canina, se procesaron en el Departamento de Virología de la Facultad de Biología de la UANL.

3.2.2 Obtención y tipos de muestras.

El material de muestra utilizado para la detección de fragmentos de genoma en este estudio fue: hisopado conjuntival y nasal de perros con sintomatología sugerente del complejo respiratorio canino, que no hubieran sido vacunados en las últimas tres semanas contra los Virus de Distemper Canino, Adenovirus Canino Tipo 2 o Parainfluenza Canina. Así mismo se tomaron hisopos de cavidad nasal y de conjuntiva así como fragmentos de tejidos (tráquea y pulmón) de distintas áreas en animales que perecieron por infección respiratoria aguda. Dichas

muestras fueron solicitadas en clínicas de Monterrey y su área metropolitana, durante el periodo de Enero del 2013 a Marzo del 2014; cabe mencionar que el número total de muestras obtenidas estuvo sujeto a la presentación de casos clínicos en la zona, y al interés del médico por conocer los agentes virales involucrados en la presentación del problemas respiratorio de sus pacientes.

Al médico se le proporcionó hisopos estériles, tubos cónicos de 15 ml con solución salina fisiológica y jeringas estériles de 3 ml para colectar las muestras, además de una encuesta (adjuntada en anexos) que proporciona datos para la investigación e indicaciones por escrito de los pasos para recolectar y almacenar la muestra de manera correcta hasta su traslado al laboratorio. Las muestras fueron trasladadas en frío y evitando períodos prolongados de transporte.

3.2.3 Extracción de Ácidos Nucleicos (ARN/ADN).

El aislamiento del genoma viral (ARN y ADN) se llevó acabo utilizando el kit para extracción simultánea AxyPrep™ Body Fluid Viral DNA/RNA MiniprepKit (AxygenBioscience), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN/ADN viral obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

3.2.3.1 Extracción de ADN/ARN a partir de hisopado nasal y conjuntival.

Las muestras fueron tomadas por los clínicos y conservadas en solución salina fisiológica de tal manera que el hisopo con que se toma tal muestra estuviera cubierto por dicha solución, estos hisopos se conservaron a 4°C y fueron enviados a laboratorio en menos de 24 h. Una vez en el laboratorio se agitaron

vigorosamente estos hisopos por medio de un vortex para que las células que se encontraban en el hisopo quedaran inmersas en la solución salina fisiológica. Una vez agitado el tubo por 5-10 minutos se eliminó el hisopo y la muestra se procesó inmediatamente, o bien se conservó a -20°C hasta su uso.

Para extraer los ácidos nucleicos a partir de estas solución salina, se colocaron 200 μl de muestra, 100 μl de la muestra de hisopado nasal y 100 μl de la muestra de hisopado conjuntival en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml. Se añadieron 200 μl del buffer V-L, se homogenizaron con ayuda del Vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. A la mezcla antes señaladase agregaron 75 μl del buffer V-N, se mezclaron con ayuda del Vortex y se centrifugaron a 12,000rpm por 5 minutos. El sobrenadante claro de este tubo se transfirió a un tubo de 2 ml y se añadieron 250 μl de alcohol (isopropanol + 1% de Ac. Acético) y se mezclaron con ayuda del Vortex. Se transfirió el contenido del tubo en una columna y se centrifugo a 6000 rpm por un minuto. Se desechó el filtrado y la columna se colocó sobre un tubo estéril de 2 ml, se agregaron 500 μl del buffer W1A en la columna incubándola a temperatura ambiente durante un minuto, para después centrifugar a 12,000 rpm por un minuto. Se eliminó el filtrado y se colocó la columna en el tubo, se agregan 800 μl del buffer W2, centrifugando posteriormente a 12,000rpm por un minuto. Se descartó el filtrado y se repite el centrifugado a 12,000 rpm para remover los residuos del buffer de lavado. La columna se trasfirió a un tubo estéril1.5 ml y se agregaron 50 μl de buffer TE (libre de nucleasas) para eluir el ARN/ADN viral, se realizó una incubación durante 1

minuto a temperatura ambiente. Por último, centrifugamos durante 1 minuto a 12,000 rpm, se desechó la columna y el filtrado se conserva a -20°C hasta su uso.

3.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.2.4.1 Selección de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se muestran en la tabla 1. Estos oligonucleótidos fueron seleccionados de distintos reportes científicos y a continuación se describen.

Se realizó un PCR para la detección del Adenovirus Canino tipo 2, utilizando los oligonucleótidos CAV-F1 y CAV-R1 publicados por Erles (Tab. 1); estos oligonucleótidos flanquean un segmento de 245 pb del gen que codifica para la proteína F (Erles et al., 2004)

Para la detección del genoma del Virus de Distemper Canino se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar un fragmento del gen que corresponde a la proteína N del CDV, amplificando estos un fragmento de 427 pb como producto del RT-PCR y para el PCR anidado un segmento de 149 pb (König, 2004.). La secuencia de los oligonucleótidos para el RT-PCR y el PCR anidado se muestran en la tabla 1.

Se estableció además un RT-PCR y PCR anidado para la detección del Virus de Parainfluenza Canina. El amplificado corresponde a un fragmento del gen que codifica para la proteína SV5, utilizándose los oligonucleótidos reportados por Erles que amplifican un fragmento genómico de 667 pb para el producto del RT-

PCR y de 182 pb para el PCR anidado (Erles et al., 2004). La secuencia de los oligonucleótidos se puede consultar en la tabla 1.

En el caso del Virus de la Influenza, se utilizaron los oligonucleótidos diseñados en el laboratorio de Virología de la Facultad de Biología (UANL), FLU M1 F y FLU M1 R; los cuales corresponden a la región M1 del gen 7. EL gen 7 es uno de los genes más conservados del virus, el cual mide cerca de 1029 pares de bases, sin embargo solo la región de 775 pares de bases correspondiente a M1 es la que se emplea para la tipificación ya que en la otra región la cual corresponde a M2 es muy variable. Para el PCR anidado, se utilizaron los oligonucleótidos sugeridos por la OMS M30F2/08 y M264R3/08 (WHO, 2009), los cuales amplifican un fragmento genómico de 244pb. Ambos aparecen en la tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de virus asociados al CRC en canidos del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Virus	Gen	Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Sentido	Tamaño del amplicón	Referencia
CAV-2	Gen de la proteína F	CAV F1	5' TGCAACAAGGTTTTGTCTTTT 3'	sentido	254 pb	(Erles, 2004)
		CAV R1	5' TTTTCAAGGGAGGTGCGT 3'	antisentido		
CDV	Gen de la proteína N	N6	5' CGACTCGGAGATGAGAAGGTG 3'	sentido	427 pb	(König, 2004.)
		N7	5' CAATGGGTAGGACCCCTGCAC 3'	antisentido	142 pb	
		N8	5' GATCCCCAGGGAACAAGCC 3'	sentido		
		N9	5' TCCGAAAACCTCATGCAACC 3'	antisentido		
CPIV	SV-5	PNP1	5' AGTTTGGGCAATTTTTCGTCC 3'	sentido	667 pb	(Erles, 2004)
		PNP2	5' TGCAGGAGATATCTCGGGTTG 3'	antisentido	182 pb	
		PNP3	5' CGTGGAGAGATCAATGCCTATGC 3'	sentido		
		PNP4	5' GCAGTCATGCACTTGCAAGTCACTA3'	antisentido		
CIV	Gen M1 del segmento 7	FLUM M1F	5'-CACGGATCCAAGATGAGTCTTCTAACCGAG-3'	sentido	775 pb	No reportados
		FLUM M1R	5'-CACGTCGACAGGATCACTTGAATCGCTGCA-3'	antisentido	244 pb	(WHO, 2009)
		M30F2/08	5'-ATGAGYCTTYAACCGAGGTGCGAAACG-3'	sentido		
		M264R3/08	5'-TGGACAAANCGTCTACGCTGCAG-3'	antisentido		

3.2.4.2 *Controles positivos y negativos.*

Como control positivo se extrajo ARN a partir de la cepa vacunal del Virus de Distemper Canino, y del Virus de Parainfluenza Canina; además se extrajo ADN a partir de la cepa Adenovirus Canino; esto fue obtenido de la vacuna comercial Vanguard® Plus 5 L4 (Pfizer). Para estos virus no se especifica en la vacuna el tipo de cepa que se incluye en la misma. Solo se especifica la cantidad de virus de cada tipo incluida, de la siguiente manera. Cada dosis contiene un mínimo de 103.5 TCID50 de Virus del Distemper Canino, 103.4 TCID50 del Adenovirus Canino tipo 2, 105.5TCID50 de Virus de la Parainfluenza Canina, CPV 107.2 TCID50 de Parvovirus canino.

En el caso del virus de la Influenza, se utilizó la extracción de la cepa vacunal equina Kentucky 97, a partir de la vacuna comercial Fluvac Innovator EHV 4/1 (Zoetis), esto debido a la relación filogenética que existe entre las cepas, canina y equina. Como control negativo se utilizó agua estéril.

3.2.4.3 *Reacción en Cadena de la Polimerasa para virus DNA y PCR anidado*

Para el PCR de Adenovirus tipo 2 y el PCR Anidado se utilizó el estuche comercial de Invitrogen™ Platinum® PCR SuperMix; el cual contiene 22 U/ml de un complejo recombinante de Taq ADN polimerasa, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55mM KCL, 1.65 mM MgCl₂, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dCTP y estabilizadores.

3.2.4.3.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa para CAV-2.

Para diagnosticar el Adenovirus Canino tipo 2 se realizó un PCR, utilizando los oligonucleótidos CAV-F1 y CAV-R1. El volumen por reacción consistió en 26.25 µl; donde se colocan 25 picomoles por reacción de cada primer (0.25 µl de una concentración de 100µM de cada oligonucleótido), 23.25 µl de PCR SuperMix (22 U/ml de un complejo recombinante de Taq DNA polimerasa con Platinum® Taq Anticuerpos, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55mM KCL, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dCTP y estabilizadores), y por último 2.5 de la extracción de DNA; mediante 30 ciclos de PCR (95°C-1 min, 52°C-1 min y 72°C-1 min) se logró el amplificando de un producto de 254 pb (Erles et al., 2004)

3.2.4.4 Transcripción Reversa- Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

El RT-PCR se realizó en un solo paso mediante el uso del estuche comercial “SuperScript® III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq DNA Polymerase” el cual pertenece a la compañía Invitrogen™. El estuche contiene una mezcla de buffer 2X Reacción Mix (el buffer contiene 0.4 mM por cada dNTP, 3.2 mM MgSO₄), la enzima transcriptasa reversa (RT) y la Taq-polimerasa “SuperScript™ II RT/Platinum® TaqMix.

3.2.4.5 RT-PCR y PCR anidado para el diagnóstico del Virus de Distemper Canino.

En el caso de CDV para el RT-PCR, los oligonucleótidos utilizados fueron CDVN6 y CDVN7. El fragmento genómico amplificado corresponde a una región de la

proteína N del CDV amplificando de 427 pares de bases (König, 2004.); el cual se observa en la Figura 2.

Para realizar el procedimiento se colocaron en un microtubo para PCR de 0.2ml ambos oligonucleótidos a una razón de 25 picomoles cada uno (1.5 μ l de 16.66 μ M de los oligonucleótido CDV-N6 y CDV-N7) y 1.5 μ l de agua para PCR, a esta premezcla se agregaron 2.5 μ l del ARN, llevándose a cabo un proceso de desnaturalización inicial de 94°C durante 3 minutos, seguido de un enfriamiento a 4°C. Posteriormente se agregó al tubo de PCR con la muestra previamente desnaturalizada, la cantidad 12.5 μ l del buffer 2X Reacción Mix (0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM MgSO₄), 0.5 μ l RT/PlatinumTaqMix, 5 μ l de Aqdd, obteniendo un volumen total de 25 μ l por reacción.

La retrotranscripción se llevó a cabo en un ciclo de 50°C por 30 min y 94°C por 1 min, para inactivar la RT, seguido de 30 ciclos de PCR (94°C-30 seg, 55°C-30 seg, y 72°C-30 seg).

Para CDV se realizó un PCR Anidado, en el cual se utilizaron los oligonucleótidos N8 y N9. El fragmento genómico amplificado corresponde a una región de la proteína N del CDV de 149 (König, 2004.). El volumen por reacción consistió en 26.75 μ l, de los cuales 22.5 μ l fueron de PCR Super Mix (22 U/ml de un complejo recombinante de Taq ADN polimerasa, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55mM KCL, 1.65 mM MgCl₂, 220 μ M de cada dNTP, y estabilizadores), 25 picomoles de los oligonucleótidos N8 y N9 (1.5 ml de 16.66 μ M de oligonucleótidos N8 y N9), así como 1.25 μ l del producto del RT-PCR. Este mix se sometió al programa de un

ciclo de desnaturalización a 94°C por 2 minutos, y 30 ciclos para la PCR (94°C - 30 seg., 55°C - 30 seg, y 72°C - 30 seg); seguido de una extensión final a 72° por 5 minutos y a 4°C por 30 segundos para evitar evaporación de la muestra.

3.2.4.6 RT-PCR y PCR anidado para el Virus de la Parainfluenza Canina.

Para CPIV, los oligonucleótidos utilizados fueron PNP1 y PNP2 el amplificado corresponde a un fragmento del gen de la proteína SV5 de CPV que amplifican un fragmento genómico de 667 pb; dichos oligonucleótidos fueron reportados por Erles en el 2004 (Erles et al., 2004). Para la reacción del RT-PCR para el virus de CPV se agregaron a un tubo de PCR de 0.2ml los oligonucleotidos PNP1, PNP2 a una razón de 25 picomoles (0.25 µl de cada primer de una concentración de 100µ de cada iniciador), 4 µl de Aqdd, 2.25 µl de la extracción del ARN. Se llevó a cabo una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos seguido de un enfriamiento a 4°C. Posteriormente se colocaron en el tubo 12.5 µl del buffer 2X Reacción Mix (0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM MgSO₄), 0.5 µl del RT/PlatinumTaqMix y 5 µl de Aqdd, dando un volumen total de 24.75 µl por reacción. Para CPIV se realizó una desnaturalización inicial (94°C-3 min) de la muestra previa a la adición de la transcriptasa reversa, una vez añadida la enzima con su respectivo buffer se llevó a cabo un ciclo de 50°C por 30 min. (retrotranscripción) y 94°C por 30 seg. para inactivar la RT, seguido de 30 ciclos de PCR (95°C-1 min, 55°C-40 seg, y 72°C-1 min), con una extensión final de 72°C por 10 min, amplificando un fragmento de 667 pares de bases (Erles et al., 2004)

En el caso de CPIV, se realizó un PCR Anidado, utilizando los oligonucleótidos PNP3 y PNP4, el amplificado corresponde a un fragmento del gen de la proteína SV5 de CPVI que amplifican un fragmento genómico de 189 pb (Erles et al., 2004); en donde el volumen total por reacción fue de 24.25µl. Se incluyeron los oligonucleótidos PNP3 y PNP4 a una razón de 25 picomoles por reacción (0.25µl de una concentración de 100 µM de cada iniciador), además de 22.5 µl de SuperMix (22 U/ml de un complejo recombinante de Taq ADN polimerasa con Platinum® Taq Anticuerpos, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55mM KCL, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dCTP y estabilizadores), así como 1.25 del producto de la RT, llevando a cabo un proceso de desnaturalización 94°C por 2 minutos, posteriormente 30 ciclos de PCR (95 °C durante 1 minuto, 55 °C por 40 seg, y 72°C por 1 minuto) y una extensión final de 72°C por 10 minutos y por último, la temperatura disminuye a 4°C.

3.2.4.7 RT-PCR y PCR Anidado para el Virus de la Influenza Canina.

Los oligonucleótidos FLUM1F y FLUM1R, diseñados en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Biología (UANL) fueron los seleccionados para el diagnóstico de CIV, y el volumen inicial utilizado para cada reacción, consistió en 0.5µl de una concentración de 10 µM de cada oligonucleótido (FLUM1F, FLUM1R) y 5µl de ARN, con un volumen inicial total de 6µl, realizando una desnaturalización inicial de 5 minutos a 65°C y un enfriamiento a 4°C. Después se agregó a la reacción 12.5 del buffer 2X Reacción Mix (0.4 mM de cada dNTP y 2.4 de mM MgSO₄), 6 µl de Agua Mq, 0.5 µl del RT/PlatinumTaqMix, quedando un

volumen total de 25 µl por cada reacción. Para CIV se realizó un ciclo de 50°C/30min y 94° C/2 min (retrotranscripción) y 94°C/5 min para inactivar la enzima, seguido de 40 ciclos de PCR (94°C/30seg, 50°C/30seg y 68°C/60seg), y una extensión final de 68°C por 5 minutos. Para esperar un producto de 775 pb.

Para incrementar la sensibilidad del diagnóstico se realizó un PCR anidado con los oligonucleótidos reportados por la OMS M30F2/08 y M264R3/08 a una razón de 0.5 µl de una concentración de 10µM de cada iniciador)(WHO, 2009); se agregaron además 22.5 µl de SuperMix (22 U/ml de un complejo recombinante de Taq ADN polimerasa con Platinum® Taq Anticuerpos, 22 mM Tris-HCL (pH 8.4), 55mM KCL, 1.65 mM MgCl₂, 220 µM dGTP, 220 µM dATP, 220 µM dCTP y estabilizadores) y 1.5 µl del ADN amplificado en el RT-PCR, utilizando un volumen final por reacción de 25µl. Los tubos de PCR se sometieron a el siguiente protocolo de PCR en un termociclador de la marca axigen, desnaturalización 95°C/5min, y 40 ciclos de 94°C/30seg, 50°C/30seg, 72°C/60seg y una extensión final de 72°C/15min. Amplificando un producto de 244 pb(WHO, 2009)

3.2.5 Análisis de los resultados de las muestras clínicas de caninos del área metropolitana de Monterrey.

Los resultados de las muestras al PCR, RT-PCR/PCR anidado fueron analizadas en distintas categorías de acuerdo a los datos obtenidos en la encuesta que acompañaba cada muestra. Las categorías que se analizaron fueron:

- Protocolo de vacunación (protocolo completo, parcial o nulo)
- Distribución de las muestras según el municipio

- Edad de los caninos
- La sintomatología que presentaban los caninos

Para el estudio estadístico y epidemiológico de las distintas categorías en que se analizaron las muestras se utilizó el programa epidemiológico Win Epi: Working in Epidemiology (de Blas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza © 2006), calculando para estas la relación entre proporciones, Ch^2 y el valor de P.

3.2.6 Histopatología de cánidos con Complejo Respiratorio Canino

3.2.6.1 Selección de cánidos para el proceso de histopatología.

Para estudiar los tipos de muestra más adecuados para realizar el diagnóstico de enfermedades virales en cánidos con sintomatología respiratoria sugerente de CRC se realizaron pruebas de distintas áreas del tracto respiratorio alto (hisopado nasal y conjuntival) y bajo (tráquea, bronquios y parénquima pulmonar). En este estudio se tomaron muestras de 5 cánidos que fallecieron o que fueron eutanasiados por problemas respiratorios. A partir de estas muestras se realizaron necropsias con su respectivo estudio histopatológico y pruebas moleculares (RT-PCR y PCR anidado) para los virus que se estudiaron en esta investigación.

El caso número 1 fue asignado a una cachorra de 3 meses de edad, raza Pastor Belga Malinois, de nombre Kimy, cuya muestra fue recibida el 14 de diciembre del 2013; la cual fue adquirida en un puesto de venta para mascotas informal, al cliente le fue informado que la cachorra contaba con una aplicación de vacuna polivalente y dos dosis de desparasitación, sin embargo, no se le entregó cartilla como comprobante de la misma. Los dueños comentaron que desde que

adquirieron a la mascota, ésta defecaba con moco y la consistencia de las heces variaba, de sólida a pastosa. Comentaron que donde lo adquirieron, les otorgaron una muestra del alimento que el cachorro estaba consumiendo y ellos habían continuado dándole el mismo, sin embargo, las heces continuaron teniendo variación en la consistencia, empeorando aún más conforme pasaba el tiempo. Al momento de la consulta el paciente presentaba sintomatología de diarrea mucosa con estrías de sangre, se realizó un examen coproparasitoscópico, dando un resultado de positivo a *Giardia spp.* y *Eimeria spp.*, se prescribió Metronidazol y Sulfas con Trimetoprim durante 10 días, acudió a su revaloración una semana después de terminado el tratamiento, se repitió el examen de excremento y el resultado fue negativo, pero en esta ocasión el paciente presentó abundante lagaña color verdosa y moco, el propietario comentó que empezó con los síntomas hacía aproximadamente 5 días, en la auscultación se percibieron pulmones congestionados y se apreció dificultad respiratoria, se observaron también temores musculares involuntarios en el área de la cabeza y los miembros traseros, además de evidente pérdida de peso. Se sugirió realizar la prueba rápida de diagnóstico para descartar CDV, obteniéndose un resultado positivo. Se prescribió Cefalexina y Clorhidrato de Bromhexina. Después de 8 días de llevar a cabo el tratamiento el paciente regresó con una desnutrición avanzada, y una incapacidad respiratoria, además de una evidente sinología nerviosa, por lo cual, se decidió realizar la eutanasia.

El caso número dos fue asignado a una perrita criolla de 1 año y 8 meses de edad, de nombre Keyla, y cuya muestra fue recibida el 13 de febrero del 2014. Se remitió

a la clínica con decaimiento y poco apetito, una semana después observaron que tosía y tenía secreciones mucosas en ojos y nariz. De cachorra siguió el protocolo completo de vacunación, pero después de cumplir un año de vida, no volvió a revacunarse. Ocasionalmente la sacaban a pasear al parque con correa. Se administraron antibióticos durante 10 días, sin resultados favorables, con pérdida de peso progresiva e incapacidad para incorporarse y mantenerse en pie, además, de temores musculares. Se realizó la eutanasia del paciente por complicaciones del cuadro clínico.

El tercer caso fue asignado a un cachorro de nombre Tyson de tres meses de edad, cuya muestra se recibió el 21 de febrero del 2014. El canido presentaba depresión marcada, tos persistente, moco y lagañas; los dueños comentaron que tenía 3 semanas con los síntomas y que durante este tiempo, también había presentado diarreas, pérdida de peso, fiebre y tics nerviosos. No contaba con antecedentes de vacunas. Se aplicó antibiótico y antipirético vía intramuscular y se citó al paciente al siguiente día, sin embargo, falleció.

El cuarto caso se asignó a un perro macho de un año y medio de edad, de la raza Bull Terrier, de nombre Palomo y cuya muestra se recibió el 22 de febrero del 2014. Se presentó a consulta con tos, estornudos, secreción de moco, lagañas, tics nerviosos, anorexia y vómito. Los dueños comentaron que el paciente recibió las dosis de vacunación indicadas en el protocolo durante sus primeros meses de vida, pero que ya no continuaron con su revacunación anual, sin embargo, el paciente vivió en casa, no salía a la calle y tampoco convivía con otros perros. Hace más de un mes, comenzaron a ver los síntomas de tos y moco verdoso, y le

dieron antibióticos, primero Amoxicilina y después Cefalexina, el paciente mostraba mejoría pero volvía a recaer. En los últimos días había estado vomitando todo lo que comía y lo que bebía, su condición corporal era caquética y los síntomas nerviosos ya habían afectado los músculos de la mandíbula, evitando que comiera y que pasara agua correctamente. Se realizó la eutanasia por lo avanzado de los síntomas.

El quinto caso se asignó a una cachorra de la raza Golden Retriever de dos meses y medio de edad que respondía al nombre de Lady, y cuya muestra fue recibida el 19 de marzo del 2014, el canino contaba con una dosis de vacuna polivalente aplicada hacía 25 días, fue adquirida en un puesto informal de venta de cachorros, los clientes comentaron que hace aproximadamente 20 días la empezaron a ver triste, después empezó con diarrea, la llevaron a otra clínica y le realizaron el SNAP para detectar Moquillo canino, al cual salió negativo, le prescribieron antibiótico de tipo Sulfas y estuvo en tratamiento durante una semana, inicialmente mostro mejoría, pero después le vieron que empezó a secretar moco, lagaña y a toser. Durante el tiempo que pasaron con la mascota, ésta no salió a la calle, y tampoco convivió con otros perros. Como tratamiento se hospitalizó al paciente y se le estuvo administrando suero, además de antibióticos, se observaron tics nerviosos muy marcados y constantes. El paciente fue eutanasiado 3 días posteriores a su internamiento por estar en un delirio constante y no mostrar mejoría.

3.2.6.2 Necropsia.

Para iniciar la necropsia se colocó el animal en decúbito lateral realizándose una incisión primeramente en el tejido subcutáneo a lo largo de la línea media, comenzando en la sínfisis mandibular y terminando en la sínfisis púbica (Merck, 2010). Se separó la dejando al descubierto las regiones ventral y lateral del cuello, al igual que la parte exterior de la caja torácica y el abdomen. Se retiraron los miembros. Para asegurar que existía presión negativa en la cavidad torácica, se abrió primero la cavidad abdominal. Una vez abierta la cavidad abdominal, se punzo el diafragma con la punta de un cuchillo o bisturí y se corrobora la existencia de presión negativo (Merck, 2010; Zachary & McGavin, 2013). Una vez perforado el diafragma, se cortó desde la cavidad abdominal, todo el perímetro del músculo diafragmático hasta dejar descubierto la región caudal de los pulmones y de la cavidad torácica. Posteriormente, se abrió el tórax cortando además las costillas en su unión con las vértebras y el esternón (Merck, 2010; Zachary & McGavin, 2013). Se revisó antes de cortar o sacar los órganos de la cavidad torácica, la cavidad en conjunto, poniendo especial atención a las superficies plurales, mediastino y silueta cardíaca (Merck, 2010; Zachary & McGavin, 2013).

Para inspeccionar la cavidad oral se realizó un corte a lo largo de la parte interna de las ramas del maxilar inferior y se extrajo la lengua, jalándola hacia el tórax. Posteriormente, se desarticulan los huesos hioides y se examina la cavidad bucal, dientes, laringe, faringe y tonsilas. Se sujetó firmemente la lengua, el esófago y la tráquea, jalando hacia el tórax y se cortaron los músculos del cuello a lo largo del mismo; asimismo, se cortaron los músculos de la región pectoral y las costillas. Se

separó la tráquea del esófago con el cuchillo, realizando una doble ligadura al inicio del esófago con un hilo resistente. Se separa el paquete cardiorrespiratorio, cortando el diafragma al nivel de su inserción con las costillas, las adherencias del pericardio con el esternón, hasta desprenderlo totalmente de la cavidad torácica también se cortó la aorta y la cava(Merck, 2010).

Se separó cuidadosamente todo el aparato digestivo, hasta llegar a la entrada de la cavidad pélvica, dejando en su lugar riñones, uréteres, vejiga, glándulas adrenales y aparato reproductor masculino o femenino(Merck, 2010). El tubo digestivo se inspeccionó completamente realizando un corte longitudinal con tijeras rectas, para separar el omento del mesenterio; iniciando en el esófago y terminado en el recto(Merck, 2010) .

Posteriormente, se tomaron muestras de tejidos, principalmente de donde se observaran mayores cambios macroscópicos. Dichas muestras fueron preservadas en formol al 10%bufferado, permaneciendo aquí un mínimo de 24 horas y un máximo de 72 horas(Armadas & Prophet, 1995).

De igual manera, se tomaron muestras de pulmón, específicamente, para conservar a -40°C para realizar las pruebas moleculares.

3.2.6.3 *Histopatología.*

Se realizaron cortes de aproximadamente 1 a 3 cm de grosor, de los diferentes órganos obtenidos a la necropsia, los cuales fueron colocados en los cassettes de inclusión previamente identificados de cada animal, y se colocaron en un

procesador de tejidos de la marca LEICA modelo TP 1020, permitiendo la deshidratación al pasar el tejido por alcoholes en diferentes concentraciones al 70%, 80%, 96% y 100%. El aclaramiento por el Xilol absoluto y la infiltración de parafina se da al estar a una temperatura de 65⁰centígrados. Cada paso se realizó por un periodo de 2 horas completando el ciclo en aproximadamente 24 horas (Armadas & Prophet, 1995). Después de este proceso, se colocan los tejidos para hacer cubitos de parafina solidificada y a su vez realizar el corte del tejido en el micrótopo, con un grosor de 3 a 4 micras, retirando el exceso de parafina hasta llegar a la muestra para obtener la porción indicada(Armadas & Prophet, 1995).

Posteriormente se realizan cortes seriados y se colocan en el baño de flotación (Agua 40°C a 45°C con gelatina) previo alargamiento del tejido al colocarle alcohol al 70% y dejarlo deslizar en el baño de flotación. Después con ayuda de las agujas histológicas se seleccionó la porción de tejido más completa y sin muescas (Armadas & Prophet, 1995).

Previamente se identificaron los portaobjetos con el número de animal, con un lápiz punta diamante, recolectando la muestra, para posteriormente colocarla en la plancha de secado a 50°C de 3 a 4 horas, con el fin de que la muestra tuviera una buena adherencia (Armadas & Prophet, 1995).

Una vez seca la muestra se realizó la tinción de rutina de Hematoxilina y Eosina, que consistente en: Xilol (5 min), Xilol-Alcohol(2 min), Alcohol 100% (2 min), Alcohol 96% (2 min) Agua destilada (2 min) Hematoxilina de Harris (2-3 min) agua de la llave (1 min), agua destilada (2 inmersiones), Alcohol Acido (1 inmersión

rápida), agua destilada (2 min), agua amoniacal (2 inmersiones rápidas), Agua destilada (1-2 min), Eosina (2 min) Alcohol 96% (2 min), Alcohol 100% (2 min), Xilol-Alcohol (2 min), Xilol (2 min), Xilol (2 min), y montaje con resina(Armadas & Prophet, 1995).

4. RESULTADOS

4.1 Resultado del PCR para el Adenovirus Canino tipo 2

Como resultado del PCR de CAV-2, se obtuvo el amplificado de un segmento del gen que codifica para la proteína F, de 245 pb (Figura 1). En las muestras procesadas a partir de hisopados nasales y conjuntivales, no se obtuvieron resultados positivos; sin embargo en las realizadas a partir de la extracción de pulmón de los perros que fueron sacrificados, dos muestras resultaron positivas.

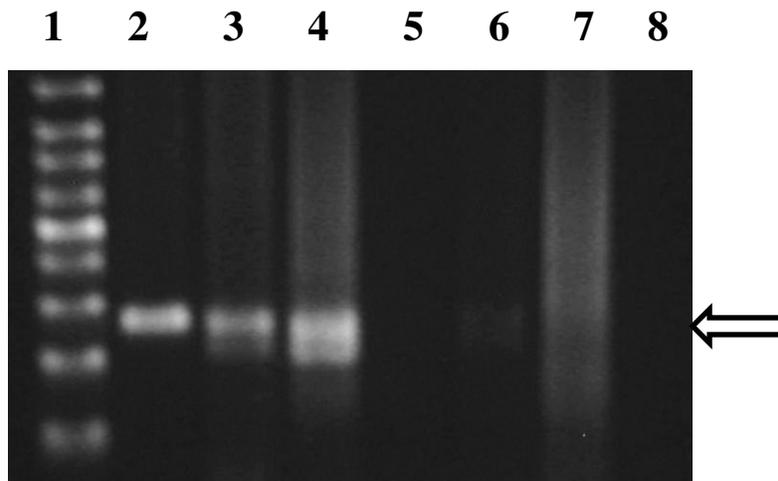


Figura 1. Resultados correspondientes a las muestras procesadas para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV acorde al rango de edad. Carril 1. Se amplificó un segmento de 245 pb del gen que codifica para la proteína F (Erls et al., 2004). **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100- 1000 pb; **Carril 2.** Control positivo (ADN extraído a partir de la cepa de CAV-2 incluida en la vacuna Vanguard Plus 5L4); **Carriles 3-7.** ARN extraído a partir de muestras de pulmón; **Carril 8.** Control Negativo. La flecha indica el tamaño de banda (245pb).

4.2 Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Distemper Canino

Como resultado del RT-PCR y el PCR anidado realizado para CDV, se obtuvo la amplificación del fragmento de del gen que codifica para la proteína N del CDV; obteniendo un amplicón de 427 pb para el RT-PCR y un amplicón de 149pb en el PCR anidado (Figura 2). Del total de las muestras procesadas a partir de hisopados nasales y conjuntivales se detectó que solo en el (57.63%) de las muestras positivas se pudo observar como positivo a partir del RT-PCR, en el (42.46%) de las muestras procesadas el resultado positivo se observó solamente en el PCR anidado. Para corroborar la especificidad de la banda del PCR anidado se secuencio la banda producto de la amplificación, siendo un 99% homologa con las secuencias reportadas en el Genbank del Virus del Distemper Canino (datos no mostrados en esta tesis).

4.3 Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Parainfluenza Canina

Como resultado del RT-PCR y el PCR anidado realizado para el virus de la Parainfluenza canina, se amplificó un fragmento del genoma que codifica para la proteína SV5 con un amplicón de 667pb para el RT-PCR. Por otro lado en el PCR anidado se obtuvo se amplifico un segmento de 182 pb (Figura 3). Al igual que para el Virus de Distemper Canino, en el RT-PCR se detectaron solo el 14.28% de

muestras positivas mientras que en el PCR anidado se detectaron el resto de las muestras positivas.

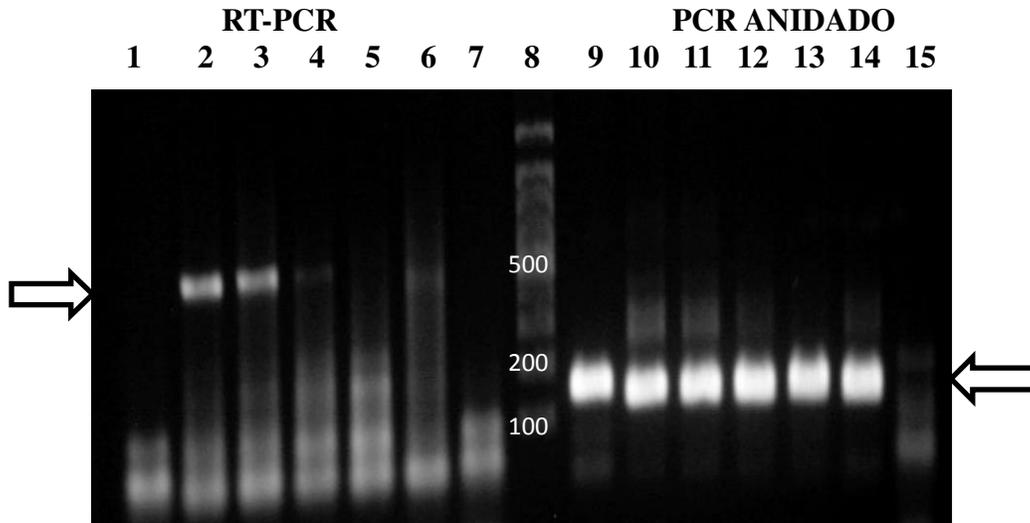


Figura 2. Electroforesis de los productos amplificados en el RT-PCR y PCR anidado para el CDV. Se amplificó un fragmento del gen de la proteína N del CDV mediante RT-PCR, con un amplicón de 427 pb para el RT-PCR (flecha de lado izquierdo), posteriormente un PCR anidado con un amplicando de 149 pb (señalado con flecha de lado derecho). **Carril 1 y 15.** Control negativo de contaminación; **Carril 7 y 9.** Control positivo (ARN extraído a partir de la cepa de CDV incluida en la vacuna Vanguard Plus 5L4); **Carril 8,** Marcador de peso molecular de 100-1000 pb; **Carriles 2-6, 10-14.** Muestra clínica (ARN extraído a partir de hisopado nasal-conjuntival).

4.4 Resultado del RT-PCR y PCR anidado para el Virus de Influenza

Canina

Como resultado del RT-PCR y PCR anidado realizado para el Virus de Influenza Canina, se amplificó un fragmento de la región M1 del gen 7; obteniendo un amplicón de 775 pb para el RT-PCR, y un amplicón de 244 pb para el PCR anidado (Figura 4).

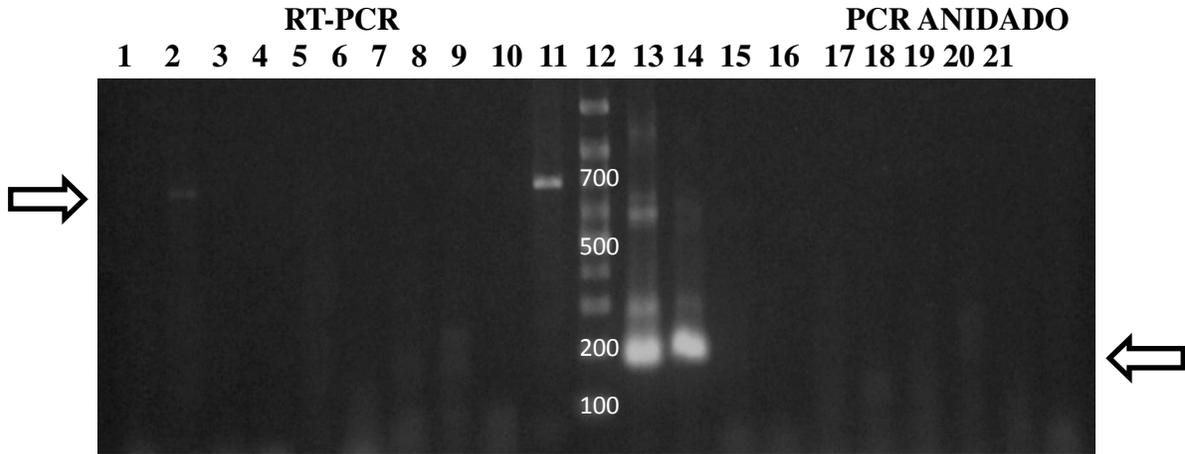


Figura 3. Electroforesis de los productos de RT-PCR y PCR anidado para el CPIV. Se amplificó un fragmento del gen de la proteína SV5 de CPVI mediante RT-PCR, con un amplicón de 667 pb, posteriormente un PCR anidado con un amplicando de 182 pb; **Carril 1 y 21.** Control negativo de contaminación; **Carriles 2-9 y 13-20.** Muestra clínicas (RNA/DNA extraído a partir de hisopado nasal-conjuntival); **Carril 10 y 12.** Control positivo (ARN extraído a partir de la cepa vacunal de CPIV incluida en la vacuna Vanguard Plus 5L4). **Carril 11.** Marcador de peso molecular de 100-1000 pares de bases. Las flechas indican los productos amplificados en las reacciones de RT-PCR y PCR anidado.

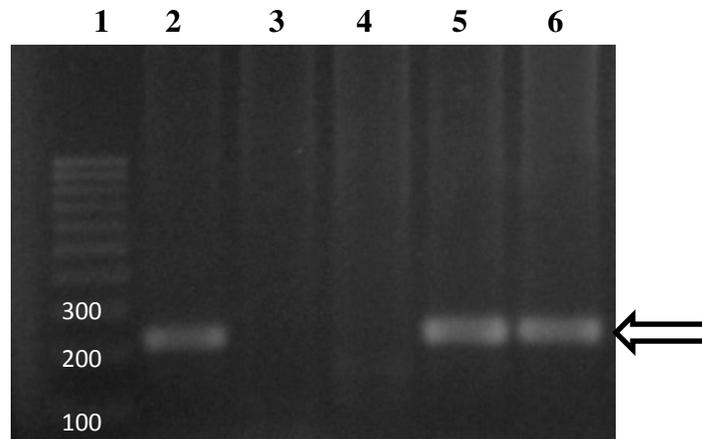


Figura 4. Electroforesis del PCR anidado para el CIV. Se amplificó un fragmento de la región M1 del gen 7 con un amplicón de 244pb. **Carril 1.** Marcador de peso molecular de 100- 1000 pb; **Carril 2.** Control positivo (ARN extraído de la cepa vacunal Kentucky 97, equina); **Carril 3.** Control Negativo. **Carriles 4-6.** RNA extraído a partir de muestras de pulmón. La flecha indica el tamaño de banda (244pb).

4.5 Resultado del muestreo realizado en Monterrey y su área metropolitana para los virus de CAV-2, CDV, CPIV y CIV en cánidos con problemas respiratorios.

El número total de muestras procesadas para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CIV y CPIV fueron 102 de hisopados nasales y conjuntivales, distribuidas en los distintos municipios. De las muestras totales procesadas, el 24.50% (25/102) obtuvieron resultados negativos a los virus examinados, y el 75.49% (77/102) obtuvieron resultados positivos al menos a uno de los virus examinados. En estas muestras se presentaron co-infecciones entre el virus de CDV/CIV con una mayor frecuencia (14.7%). Seguida de la co-infección entre CDV/CIPV con un 4.9%. Se pudo observar co-infecciones entre tres virus CDV/CIV/CAV-2 (2%) y un 1% presentó co-infección de CDV/CPIV/CIV (Tabla2)

Tabla 2. Proporción de mono o co-infecciones virales en muestras de caninos afectados con el Complejo Respiratorio Canino en el área metropolitana de Monterrey, N.L.

Virus / Co-infección	Proporción de positividad
Negativos	24.5% (25)
CDV	50 % (51)
CIV	2% (2)
CPIV	1% (1)
CDV/CIV	14.7% (15)
CDV/CPIV	4.9% (5)
CDV/CAV-2/CIV	2% (2)
CDV/CPIV/CIV	1% (1)
Total	102

De acuerdo al protocolo de vacunación indicado en su clínica, los caninos fueron divididos en tres categorías, con protocolo completo de vacunación, con protocolo parcial de vacunación y con protocolo nulo de vacunación (Ver anexo, protocolos de vacunación usada en el área metropolitana de Monterrey). El tipo y marca de vacuna varió de acuerdo a la clínica de procedencia de las muestras. Los caninos con protocolo completo de vacunación fueron 15.68% (16/102) de los cuales el 25% (4/16), resultaron positivos a CDV; el 25% (4/16) resultaron positivos a CIV (este virus no se incluye en la vacuna), mientras que para CPIV y CAV-2 no se encontraron caninos positivos. Los caninos con protocolo parcial de vacunación fueron 24.50% (25/102); de los cuales el 96% (24/25), resultan positivos a CDV; el 8% (2/25) dieron positivo a CPIV; el 24% (6/25) dieron positivo a CIV; mientras que para CAV-2 no se encontraron muestras positivas. Los caninos con protocolo de vacunación nulo fueron en total 59.80% (61/102); de los cuales el 73.77% (45/61) fueron positivo a CDV; el 8.19% (5/61), fueron positivo a CPIV; mientras que el 8.19% (5/61) fueron positivo a CIV; por otro lado, para CAV-2, no se encontró ningún resultado positivo. Los resultados totales de la investigación, divididos de acuerdo al protocolo de vacunación se pueden observar en la tabla 3.

Estos resultados se analizaron también por municipio de procedencia encontrando los siguientes resultados.

El municipio de San Nicolás de los Garza, fue el que envió mayor número de muestras con un total de 51.96% (53/102); después el municipio de Escobedo con un total del 20.58%(21/102); posteriormente, el municipio de Apodaca con un total de 11.76% (12/102); por último los municipios de Guadalupe y Monterrey, los

cuales, obtuvieron el mismo porcentaje de muestra remitidas para su estudio 7.84% (8/102).

Tabla 3. Resultados de los PCR, RT-PCR/PCR anidado de las muestras recolectadas de enero 2013 a marzo 2014 para los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV a partir de hisopados nasales y conjuntivales.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C 15.68% (16/102)	0	25% (4/16)	0	25% (4/16)
P 24.50% (25/102)	0	96% (24/25)	8% (2/25)	24% (6/25)
N 59.80% (61/102)	0	73.77% (45/61)	8.19% (5/61)	8.19% (5/61)
Total 100% (102)	0	71.25% (73/102)	6.86% (7/102)	14.70% (15/102)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación

En el caso de San Nicolás, el 35.84% (19/53) dieron negativo a los virus analizados, mientras que el 64.15% (34/53) fueron positivos a al menos uno de los virus analizados. El mayor porcentaje de las muestras, 64.15% (34/53) pertenecían a caninos sin antecedentes de vacunación, mostrando el mayor número de resultados positivos en este rango. De las muestras analizadas en este rango, 67.64% (23/34) muestras fueron positivas a CDV, 5.88% (2/34) a CPIV y 8.82% (3/34) a ICV, mientras que ninguna fue reportada para CAV-2. Las muestras de caninos con protocolo parcial fueron 16.98%(9/53) en total; de las cuales 88.88 (8/9) fueron positivas a CDV, para CAV-2 y CPIV, no se encontraron resultados positivos, y para ICV sólo el 11.11% (1/9) de las muestras fue positiva.

El rango de caninos con protocolo completo, mostro muy bajo porcentaje de resultados positivos, siendo 18.86%(10/53) las muestras procesadas, con un 10% (1/10) positivo a CDV. Los datos de las muestras, así como sus resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de las muestras recolectadas en el municipio de San Nicolás de los Garza para los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C (n= 10)	0	10% (1/10)	0	0
P (n= 9)	0	88.88% (8/9)	0	11.11% (1/9)
N (n= 34)	0	67.64% (23/34)	5.88% (2/34)	8.82% (3/34)
Total (n= 53)	0	60.37% (32/53)	3.77% (2/53)	7.54% (4/53)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación.

El municipio de Escobedo, fue el segundo en remitir muestras, con un total de 20.58% (21/102); de las cuales 9.52% (2/21) obtuvieron resultados negativos en los análisis realizados; y el 90.47% (19/21) obtuvieron resultados positivos al menos a uno de los virus analizados. El 52.38% (11/21) no tenían antecedentes vacúnales, encontrando 81.81% (9/11) resultados positivos para CDV; en el caso CPIV y CAV-2 ninguna muestra fue positiva, y en el caso de CIV sólo 9.09% (1/11) una fue positiva. De los caninos con protocolo parcial, se recibieron 38.09% (8/21) muestras, de las cuales todas fueron positivas para CDV, sólo el 12.5% (1/8) para CPIV y 37.5% (3/8) para ICV. Con protocolo completo de vacunación, se recibieron 9.52% (2/21) muestras de las cuales, no se encontraron resultados positivos para CDV, CPIV y CAV-2; sin embargo, las 2 muestras, fueron positivas

para CIV. Los datos resultados correspondientes al municipio de Escobedo se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Resultados de las muestras recolectadas en el municipio de Escobedo, N.L. para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C (n= 2)	0	0	0	100% (2/2)
P (n= 8)	0	100% (8/8)	12.5% (1/8)	37.5% (3/8)
N (n= 11)	0	81.81% (9/11)	0	9.09% (1/11)
Total (n= 21)	0	80.9% (17/21)	4.7% (1/21)	28.5% (6/21)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación.

El tercer lugar en enviar muestras, lo obtuvo el municipio de Apodaca, con un total de 11.76% (12/102) muestras remitidas; de las cuales el 8.33% (1/12) resultado negativa a todos los virus analizados; mientras que el 91.66% dio positivo a al menos uno de los virus analizados. De las muestras analizadas, el 66.66%(8/12) pertenece a caninos los cuales no tenían antecedentes vacúnales, encontrando el 75% (6/8) casos positivos a CDV, 12.5% (1/8) a CPIV, mientras que para CIV y CAV-2, no se encontraron muestras positivas. Con protocolo parcial de vacunación, se obtuvieron 33.33 (4/12) muestras, de las cuales, todas fueron positivas a CDV, y 50% (2/4) de ellas resultaron positivas a ICV; mientras que para CPIV y CAV-2 nos e encontraron muestras positivas. En este municipio, no se encontraron muestras de caninos con protocolo completo de vacunación. Los datos de las muestras recolectadas en el municipio de Apodaca se muestran a detalle en la tabla 6.

Tabla 6. Resultados de las muestras procesadas del municipio de Apodaca, N.L., para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C (n= 0)	0	0	0	0
P (n= 4)	0	100% (4/4)	0	50% (2/4)
N (n= 8)	0	75% (6/8)	12.5% (1/8)	0
Total (n= 12)	0	83.33% (10/12)	8.33% (1/12)	16.66% (2/12)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación.

Monterrey y Guadalupe, enviaron el mismo número de muestras, por lo tanto, ambos están el cuarto y último lugar de envío de muestras. En el caso de Monterrey, se recolectaron el 7.84% (8/102) del total de las muestras; de las cuales, 25% (2/8) fueron negativas a los virus analizados; mientras el 75% (6/8) fueron positivas a al menos uno de los virus.

El 37.5% (3/8) de las muestras, fueron de caninos con protocolo de vacunación nulo, de las cuales, 66.66% (2/3) fueron positivas para CDV únicamente, mientras que para CPIV, CAV-2 y CIV no se encontraron muestras positivas. Con protocolo parcial de vacunación, se analizó solo una muestra, la cual fue positiva a CDV, no encontrando resultado positivo para ninguno de los demás virus analizados. Por otro lado, dentro de los caninos con protocolo completo de vacunación se recibieron el 50% (4/8) muestras, de las cuales el 75% (3/4) resultaron positivas a CDV y 50% (2/4) a CIV. En este caso, el hecho de tener un protocolo completo, no exento a los caninos a la susceptibilidad de contraer el CDV. En la tabla 7, se observan los resultados de los caninos que corresponden al municipio de Monterrey.

Tabla 7. Resultados de las muestras analizadas del municipio de Monterrey, N.L., para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C (n=4)	0	75% (3/4)	0	50% (2/4)
P (n=1)	0	100% (1/1)	0	0
N (n=3)	0	66.66% (2/3)	0	0
Total (n= 8)	0	75% (6/8)	0	25% (2/8)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación.

En el caso de Guadalupe, se recibieron el mismo número de muestras, 7.84% (8/102) en total; de las cuales todas obtuvieron un resultado positivo de al menos uno de los virus analizados. El 62.5% (5/8), de los caninos no tenían antecedentes de vacunación, los cuales fueron positivos a CDV en su totalidad. El 40% (2/5) de los mismos, resulto positivo, a CPIV y sólo el 20% (1/5), fue positiva a CIV. Con protocolo parcial de vacunación se recibieron el 37.5% (3/8) de las muestras; de las cuales todas fueron positivas a CDV, y sólo el 33.33% (1/3) de las muestras fue positiva a CPIV. Caninos con protocolo completo de vacunación, no hubo ninguno. Los resultados de las muestras recolectadas en el municipio de Guadalupe, las observamos descritas en la tabla 8.

Tabla 8. Resultado de las muestras procesadas del municipio de Guadalupe N.L., para el diagnóstico de los virus de CAV-2, CDV, CPIV y CIV.

Muestras procesadas	Positivos a CAV-2	Positivos a CDV	Positivos a CPIV	Positivos a CIV
C 0	0	0	0	0
P 3	0	100% (3/3)	33.33% (1/3)	0
N 5	0	100% (5/5)	40% (2/5)	20% (1/5)
Total de muestras 8	0	100% (8/8)	37.5% (3/8)	12.5(1/8)

C. protocolo completo de vacunación. **P.** protocolo parcial de vacunación. **N.** protocolo nulo de vacunación.

Las muestras obtenidas, también fueron separadas en rangos de edad de los pacientes, con la finalidad de identificar la edad de mayor susceptibilidad de los mismos. En el rango de 0 a 2.5 meses, se observaron el 13.40% de las muestras (13/97); de las cuales 76.92% (10/13) fueron positivas a CDV, 15.38% (2/13) a CPIV y 23.07% (3/13) a CIV. Para el rango de 3 a 6.5 meses, se analizaron un total de 30.92% (30/97) de las muestras; de las cuales, 76.66% (23/30) fueron positivas a CDV, 10% (3/30) a CPIV y 13.63% (6/30) a CIV. En la categoría de 7 meses a 11 meses, se analizaron en total 10.30%(10/97) muestras; de las cuales 80% (8/10) resultaron positivas a CDV, 10% (1/10) a CPIV y 30% (3/10) a CIV. Para caninos de 1 a 3 años, se analizaron 27.83%(27/97) muestras; de las cuales, 66.66%(18/27) fueron positivas a CDV, 3.70% (1/27) a CPIV y 3.70% (1/27) a CIV. De 4 a 7 años, se procesaron 11.34% (11/97) muestras en total; de las cuales, 63.63%(7/11) fueron positivas a CDV y 9.09% (1/11) a CIV. Caninos mayores de 8 años, sólo se recibieron el 6.10% (6/97) muestras; de las cuales 66.66% (4/6) fueron positivas a CDV y 33.33% (2/6) a CIV. Para CAV-2, no se encontraron resultados positivos en ninguno de los rangos. La tabla 9 muestra los datos

referentes a los rangos de edad con respecto a los resultados obtenidos en las pruebas.

Tabla 9. Resultados correspondientes a las muestras procesadas para el diagnóstico de los virus CAV-2, CDV, CPIV y CIV acorde al rango de edad.

Edad	Total de muestras analizadas	Positivos CDV	Positivos CPIV	Positivos CAV-2	Positivos CIV
0-2.5 MESES	13.40% (13/97)	76.92% (10/13)	15.38% (2/13)	0	23.07% (3/13)
3-6.5 MESES	30.92% (30/97)	76.66% (23/30)	10% (3/30)	0	20% (6/30)
7 – 11 MESES	10.30% (10/97)	80% (8/10)	10% (1/10)	0	30% (3/10)
1-3 AÑOS	27.83% (27/97)	66.66% (18/27)	3.70% (1/27)	0	3.70% (1/27)
4-7 AÑOS	11.34% (11/97)	63.63% (7/11)	0	0	9.09% (1/11)
↑ 8 AÑOS	6.10% (6/97)	66.66% (4/6)	0	0	33.33% (2/6)
TOTAL	95.09% 97/102	72.16% (70/97)	7.21% (7/97)	0	16.49% (16/97)

Además de los resultados antes mencionados se realizó una asociación entre los resultados positivos y la sintomatología que el clínico percibió en los caninos y se obtuvieron los siguientes datos. De la sintomatología que se mencionó con mayor frecuencia, fue la lagaña en un 78.43% (80/102) y el moco en un 60.78% (62/102), esta sintomatología se asocia directamente con los virus analizados en la investigación sin tener diferentes proporciones; sin embargo, en el caso del signo clínico mencionado como tos, el 28.43 % (29/102) de la población muestreada lo presentaba y en un 79.31% (23/29) se asoció a resultados positivos de CVD, 20.68% (6/29) a resultados positivos de CIV y en 6.89% (2/29) a resultados positivos de CPIV . Por otro lado, el signo de dificultad respiratoria, se presentó en

la población en un 24.50% (25/100), y se asocia con resultados positivos de CDV en un 60% (15/25), en un 20% (5/25) con CIV y en un 12% (3/25) con CPIV. El signo clínico que se asocia directamente con CDV son los tics nerviosos; en este caso se presenta en la población en un 29.41% (30/102) y se asocia a CDV en un 70% (21/30). De la misma manera, el signo clínico de diarrea (Heces firmes, negativo) se presenta en la población en un 14.70% (15/102) y se asocia directamente con casos positivos a CDV en un 86.66% (13/15). El signo clínico de anorexia, se presentó en la población en un 27.45% (28/102), asociándose con resultados positivos de CDV en un 78.57% (22/28), con CIV en un 14.28% (4/28) y con CPIV en un 3.57% (1/28). El signo clínico de vómito, se presenta en un 11.76% (12/102) de la población y se asocia con resultados positivos a CDV en un 75% (9/12), y en un 33% (4/12) con resultados positivos de CPIV. El signo clínico de estornudo se encontró en la población en un 28.43% (29/102), y se asocia en un 72.41% (21/29) con resultados positivos de CDV, en un 17.24% (5/29) con resultados positivos de CIV y en un 6.89% (2/29) con resultados positivos de CPIV.

Para las muestras procesadas para el Virus de Distemper Canino se analizaron, antes de realizar el RT-PCR y PCR anidado, con una prueba inmunoenzimática (SNAP) comercial en 32 del total de los casos 31.37% (32/102) para detectar el antígeno del CDV. Esta prueba es una de las más usadas como prueba de laboratorio rápida para el diagnóstico de infecciones por CDV, existen distintas marcas comerciales las cuales fueron realizadas para estos casos por el clínico directamente. Una vez analizadas estas 32 muestras a través del RT-PCR el

37.5% (12/32) dieron resultados falsos negativos. En la Figura 5, podemos observar el total de la población a la cual se le realizó la prueba de diagnóstico rápido (SNAP), y la proporción de muestras con resultados falsos negativos.

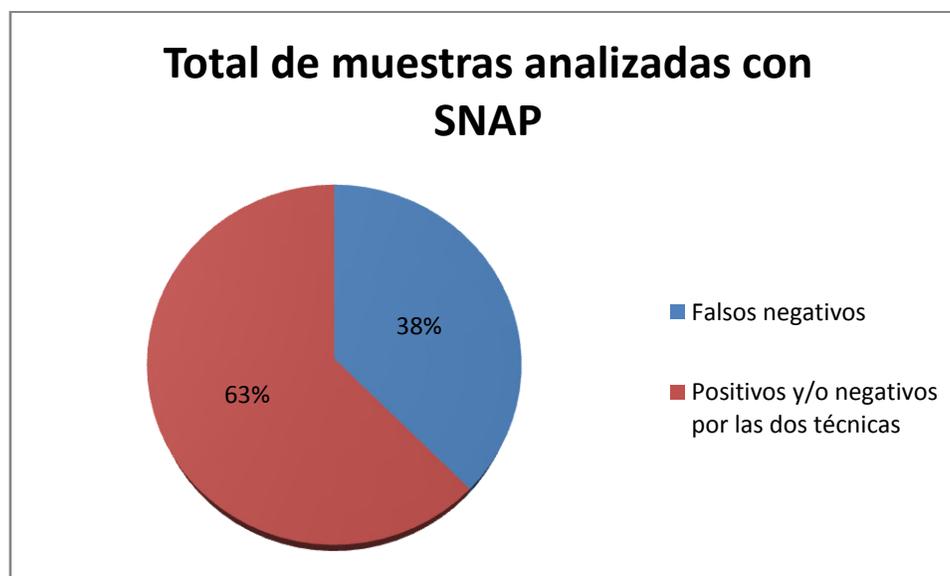


Figura 5. Resultado de las muestras de CDV analizadas mediante SNAP y RT-PCR/PCR anidado.

4.6 Resultados del análisis estadístico de los datos

De las variables analizadas estadísticamente se encontró una relación significativa solamente entre la presencia de CDV y los antecedentes vacunales de los caninos muestreados ($p: <0.0001$). No existiendo así una relación significativa entre la presencia del CIPV y los antecedentes vacunales ($p: <0.8950$). En esta categoría no se pudo hacer un análisis de asociación entre la presencia de CAV-2 y el CIV y los antecedentes vacunales, ya que el primero no obtuvo resultados positivos al

muestreo en hisopados nasales/conjuntivales y para el segundo no existe una vacuna que contenga alguna cepa de este virus.

Para la categoría de distribución por municipios y la detección por edades de los virus estudiados en este proyecto de investigación, no se obtuvieron resultados significativos.

4.7 Resultado histopatológicos de caninos que perecieron por CRC.

Se realizó un estudio sobre 5 casos de caninos de distintas edades que perecieron por causa de Complejo Respiratorio Canino. La historia clínica de los mismos se describe en materiales y métodos y se le ha asignado un número a cada caso (Caso 1-5). Los resultados de la histopatología para estos casos se describirán de igual forma a continuación, solo se hará mención y se describirán los sistemas y en dado caso los órganos en los que se encontraron cambios significativos.

Caso número 1.

Al realizar el estudio histopatológico de este canino, se pudieron observar los cambios macroscópicos más importantes a nivel de aparato respiratorio, específicamente en pulmones, donde se encontró al lóbulo caudal con áreas de consolidación de color blanco-grisáceo, además de una congestión moderada difusa. Se apreciaron dos prominencias pulmonares en posición dorsal de los lóbulos diafragmáticos del lado izquierdo. En el lóbulo craneal, se apreciaron amplias áreas de consolidación, de color gris claro, consistencia firme, superficie rugosa y algunas hemorragias petequiales. En tráquea, se observó a nivel de la

mucosa, la presencia de abundante espuma blanquecina, así como moco de color verdoso.

Aquí los principales cambios microscópicos observados fueron a nivel del parénquima una hiperplasia marcada de los neumocitos tipo I y II, en los cuales se aprecian cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares eosinofílicos (Fig. 6B), así como numerosos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos, mientras que numerosos vasos sanguíneos mostraron marcada degeneración fibrinoide y gran cantidad de eritrocitos en su interior. A nivel de los bronquios y bronquiolos, se detectó en su interior un fuerte infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear compuesto principalmente por neutrófilos (Fig. 6C), mientras que a nivel de la mucosa existió una hiperplasia epitelial marcada, con presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Fig. 6D) e intranucleares eosinofílicos, eritrocitos y numerosas células epiteliales descamadas (Fig. 6 A). A nivel de la tráquea se observó en la mucosa hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, en el cual se aprecian cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en el citoplasma de numerosas células epiteliales, así como también algunos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos, además de una congestión moderada difusa y pérdida epitelial en algunas áreas.

Para el aparato digestivo los cambios microscópicos más relevantes fueron a nivel de hígado donde se observaron a nivel del parénquima una severa disociación de los cordones hepáticos, así como una congestión severa difusa y numerosos hepatocitos con marcada vacuolización de sus citoplasmas. En el intestino

delgado y grueso se observó a nivel de la mucosa un infiltrado inflamatorio discreto compuesto por células del tipo mononuclear principalmente linfocitos y algunas células plasmáticas, descamación moderada de las células epiteliales, así como fusión marcada de las vellosidades intestinales.

En el aparato urinario los cambios más significativos se observaron a nivel de Vejiga urinaria donde se encontró presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en mucosa.

Para el sistema linfoide, el bazo se diagnosticó a nivel de la pulpa roja del parénquima con una congestión esplénica moderada difusa. En los nódulos linfáticos, se observó a nivel de la corteza, atrofia linfoide marcada de los centros germinativos.

Para el sistema nervioso a nivel de cerebro se observó a nivel de las meninges una congestión moderada difusa, en parénquima a nivel de la sustancia gris cortical, se aprecian amplias áreas de desmielinización y en sustancia blanca hay una congestión y edema perivascular discreto difuso, además de edema perineural moderada y gliosis marcada. A nivel de cerebelo el diagnóstico patológico fue desmielinización marcada en sustancia gris, congestión cerebelar moderada difusa.

De acuerdo a la historia clínica, a las lesiones encontradas en la necropsia, así como a las alteraciones observadas al microscopio, el animal cursó con un cuadro respiratorio marcado, asociado a una infección severa de tipo viral causado por la

presencia del virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 2 y lesiones compatibles con el virus de la influenza canina.

Caso número 2.

Para este caso al realizar la inspección macroscópica en aparato respiratorio, a nivel de parénquima pulmonar se apreció de color y consistencia normal. En la tráquea a nivel de la mucosa se observó la presencia de ligera cantidad de moco y espuma.

Cuando se realizaron los análisis y descripción microscópica en el aparato respiratorio a nivel pulmonar se observó una hiperplasia marcada de los neumocitos tipo I y II, en los cuales se apreciaron cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares eosinofílicos (Fig. 7D), así como numerosos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos, mientras que numerosos vasos sanguíneos mostraron marcada degeneración fibrinoide y gran cantidad de eritrocitos en su interior. Así mismo se observó un moderado infiltrado inflamatorio de tipo linfocitario, mientras que a nivel de los bronquios y bronquiolos, se apreció a nivel de la mucosa una hiperplasia epitelial marcada, con presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos (Fig. 7C), eritrocitos abundantes y numerosas células epiteliales descamadas. En la tráquea se encontró a nivel de la mucosa una hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, en el cual se encontraron algunos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos (Fig.7B) en numerosas células epiteliales, así como también algunos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos (Fig. 7A), por

otro lado, se presentó una congestión moderada difusa y pérdida epitelial en algunas áreas.

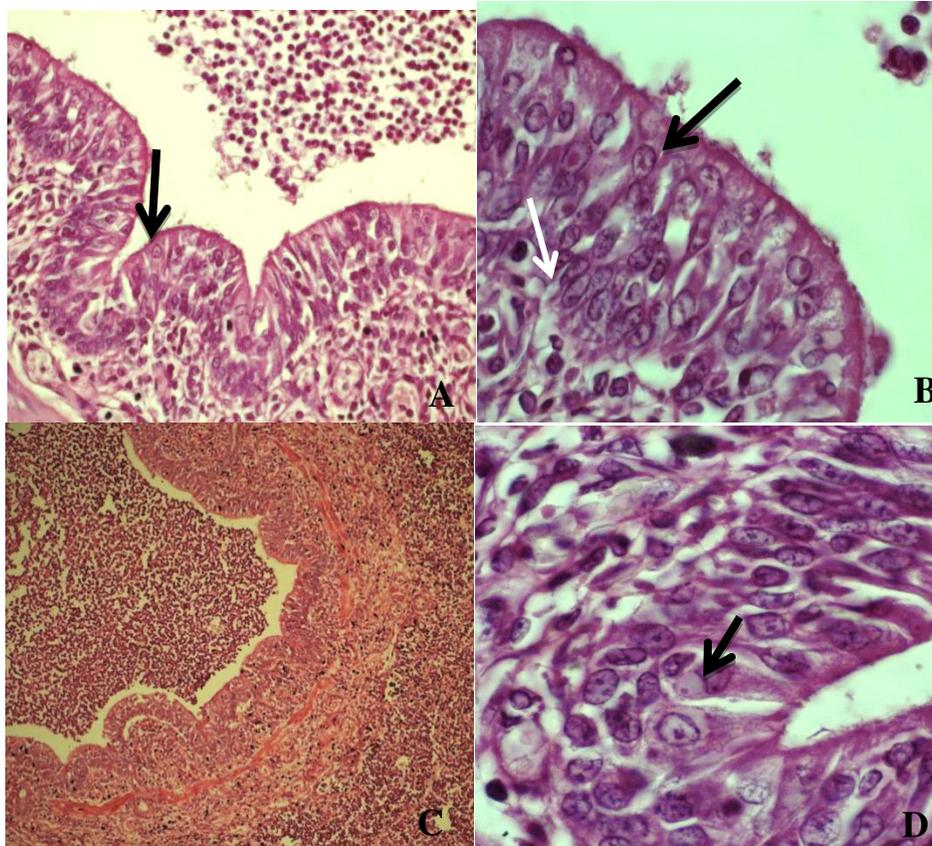


Figura 6. Resultados Histopatológicos del caso 1 de CRC. Pastor Belga Malinois de 3 meses de edad eutansiado por insuficiencia respiratoria, enflaquecimiento progresivo y sintomatología nerviosa. **La imagen A** muestra un engrosamiento del epitelio bronquial con descamación del epitelio e infiltración de células inflamatorias de tipo polimorfo-nucleares, principalmente neutrófilos (flecha) 40X. **En la imagen B** se pueden observar cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilicos sugerentes del Virus de Distemper Canino (flecha blanca) así como cuerpos de inclusión intranucleares sugerentes de una afección por adenovirus canino tipo-2 (flecha negra) 100X. **En la imagen C**, se observa A nivel de parénquima se observa un marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción marcada en el espacio aéreo de los mismos, así como la presencia de fuerte infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear compuesto principalmente por neutrófilos 10X. **En la imagen D**, se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV observados en pulmón (flecha) 100X

En el aparato digestivo, se observó en el hígado a nivel del parénquima una discreta disociación de los cordones hepáticos, así como, una congestión

moderada difusa, numerosos hepatocitos se observaron con ligera vacuolización, además de encontrarse pigmento biliar disperso. En el intestino delgado y grueso se encontró una enteritis linfoplasmocitaria moderada con descamación epitelial marcada, fusión marcada de las vellosidades intestinales con presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos. Se observó a nivel de la mucosa, un infiltrado inflamatorio discreto compuesto por células del tipo mononuclear principalmente linfocitos y algunas células plasmáticas, descamación discreta de las células epiteliales, así como fusión marcada de las vellosidades intestinales y la presencia de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en el citoplasma de numerosas células epiteliales.

El aparato urinario a nivel de vejiga urinaria presentó en el epitelio de transición de la mucosa numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos.

En el sistema linfóide a nivel de bazo se apreció a nivel del parénquima en pulpa roja una congestión moderada difusa, mientras que en pulpa blanca se observó atrofia linfóide en centros germinativos esplénicos. En los nódulo linfático se encontró a nivel de la corteza del parénquima, atrofia linfóide marcada de los centros germinativos.

En el sistema nervioso se encontró en el cerebro en corteza a nivel de la sustancia gris, amplias áreas de desmielinización, en sustancia blanca hubo una congestión y edema perivascular discreto difuso, así como, edema perineural moderado. En cerebelo se diagnosticó desmielinización marcada en sustancia gris, congestión cerebelar moderada difusa.

De acuerdo a la historia clínica, a las lesiones encontradas en la necropsia, así como a las alteraciones observadas al microscopio, el animal cursó con un cuadro respiratorio severo, asociado a una infección marcada de tipo viral causado por la presencia del virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 2 y lesiones compatibles con el virus de la influenza canina.

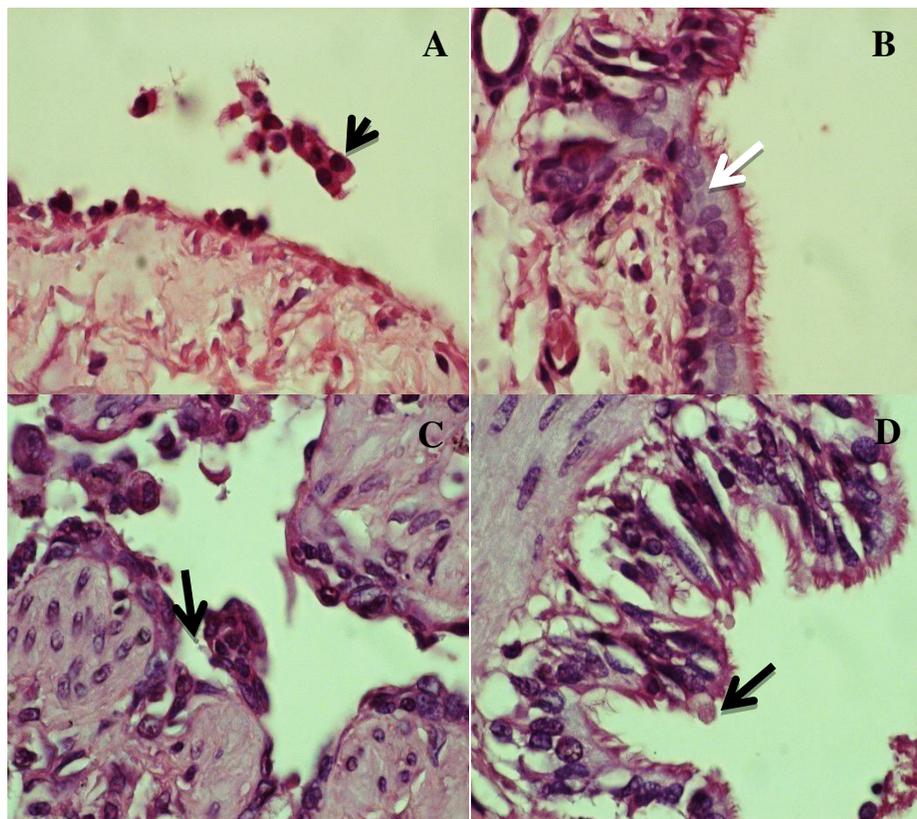


Figura 7. Resultados Histopatológicos del caso 2 de CRC. Resultado a la necropsia de una hembra criolla eutanasiada por cuadro respiratorio severo y sintomatología nerviosa. **En la imagen A,** se muestran células descamadas con presencia de cuerpos de inclusión intranucleares de CAV-2 en tráquea. (flecha) 100X. **En la imagen B,** se muestran cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos observados en tráquea. (flecha) 100X. **En la imagen C,** se observan cuerpos de inclusión fuera del epitelio bronquial debido a la descamación asociada al reflejo tusígeno observada en pulmón (flecha) 100X. **En la imagen D,** se muestra la descamación y salida de partículas virales observados en pulmón. (flecha) 100X.

Caso número 3.

En la inspección macroscópica de este caso se encontró a nivel de sistema respiratorio los pulmones muy congestionados, distendidos y edematosos, sin haberse colapsado al abrir la cavidad torácica, la presencia de líquido rojizo amarillento sugerente de hidrotórax. En la tráquea, en el interior del órgano a nivel de la mucosa, se observó la presencia de una cantidad moderada de espuma blanquecina.

A la histopatología para el caso 3 en el aparato respiratorio a nivel pulmonar se apreció a nivel del parénquima, marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción severa en el espacio aéreo de los mismos, los cuales se encuentran ocupados por gran cantidad de células inflamatorias del tipo polimorfonuclear principalmente neutrófilos, asimismo, se encontró una gran cantidad de eritrocitos, muchos de los cuales estaban dispersos en el parénquima pulmonar y fuera de los vasos sanguíneos (Fig.8A). Por otro lado, también se observó hiperplasia marcada de los neumocitos tipo I y II, en los cuales se apreciaron cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilos, así como numerosos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos, mientras que numerosos vasos sanguíneos mostraron marcada degeneración fibrinoide y gran cantidad de eritrocitos en su interior (Fig. 8 B). En bronquios y bronquiolos se apreció a nivel de la mucosa, hiperplasia epitelial marcada y con presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinófilos, eritrocitos abundantes y numerosas células epiteliales descamadas. En la tráquea se observó a nivel de la mucosa, hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, en el cual se

apreciaron algunos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos (Fig. 8C) en numerosas células epiteliales, así como también algunos cuerpos de inclusión intranucleares basófilos (Fig. 8D), además, de una congestión moderada difusa y pérdida epitelial en algunas áreas.

Para el aparato digestivo a nivel de hígado en parénquima, se apreció una discreta disociación de los cordones hepáticos, así como una congestión moderada difusa. En el intestino delgado y grueso se apreció a nivel de la mucosa un infiltrado inflamatorio discreto compuesto por células del tipo mononuclear principalmente linfocitos y algunas células plasmáticas, además de una descamación discreta de las células epiteliales.

En el aparato urinario a nivel renal se diagnosticaron hemorragias cortico-medulares marcadas.

El sistema nervioso, a nivel cerebral se presentó en la corteza de la sustancia gris, una desmielinización marcada, en sustancia blanca hubo una congestión y edema perivascular discreto difuso, edema perineural moderada, así como gliosis reactiva.

De acuerdo a la historia clínica, a las lesiones encontradas en la necropsia, así como a las alteraciones observadas al microscopio, el animal cursó con un cuadro respiratorio severo, asociado a una infección de tipo viral causado por la presencia del virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 2 y lesiones compatibles con el virus de la influenza canina.

Caso número 4.

Las observaciones macroscópicas más importantes para este caso fueron hechas en el aparato respiratorio a nivel pulmonar, donde se observaron áreas de consolidación de color blanco-grisáceo distribuidas de manera uniforme en los diferentes lóbulos, además de una congestión severa difusa. En la tráquea se observó a nivel de la mucosa un contenido espumoso y moco de color verde.

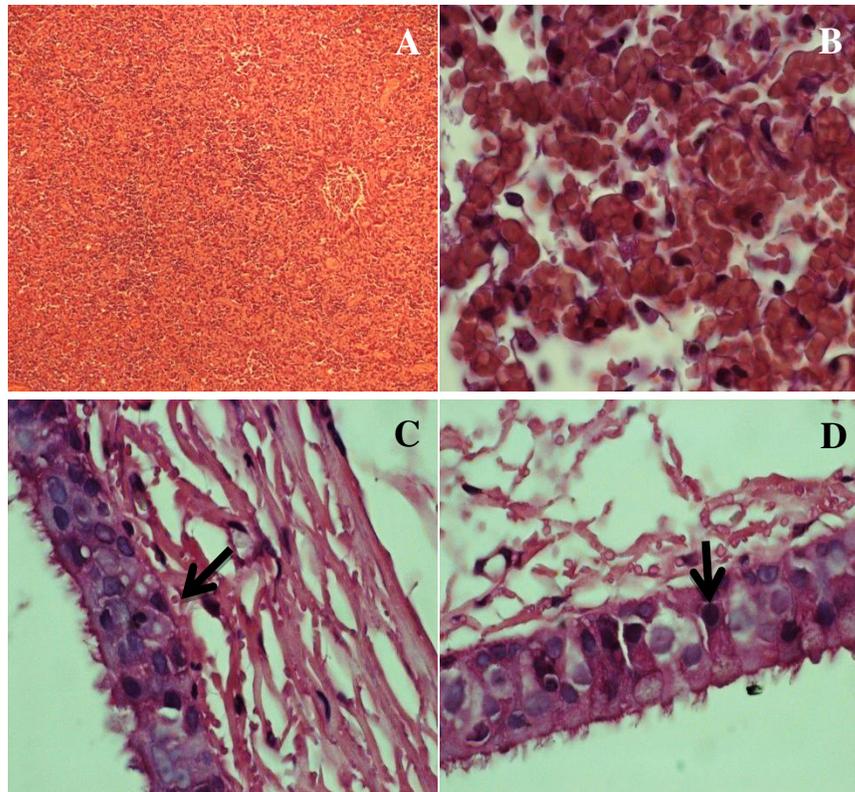


Figura 8. Resultados histopatológicos del caso 3 de CRC. Resultados a la necropsia del Pit Bull de tres meses de edad que fallece a causa de un cuadro respiratorio severo. **En la imagen A**, se observa la presencia de células inflamatorias con engrosamiento marcado de los espacios alveolares en pulmón 10X. **En la imagen B**, se observa congestión y hemorragia severa difusa en pulmón 100X. **En la imagen C**, se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV encontrados en tráquea (flecha) 100X. **En la imagen D**, se observan cuerpo de inclusión intranuclear de CAV-2 observados en tráquea (flecha) 100X.

En la histopatología del aparato respiratorio a nivel pulmón se observó marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción marcada en el espacio aéreo de los mismos, asimismo, se encontró una congestión moderada difusa. Por otro lado, también se apreció hiperplasia marcada de los neumocitos tipo I y II (Fig. 9C), en los cuales se apreciaron escasos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, mientras que numerosos vasos sanguíneos mostraron marcada degeneración fibrinoide y gran cantidad de eritrocitos en su interior. A nivel de los bronquios y bronquiolos, hubo la presencia de una hiperplasia epitelial marcada, con presencia de escasos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos (Fig. 9B) e intranucleares eosinofílicos (Fig. 9A), eritrocitos y numerosas células epiteliales descamadas. A nivel tráqueal se detectó en la mucosa, hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado con salida de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV, con gran actividad de las células caliciformes (Fig. 9D)

En el aparato digestivo a nivel de hígado se observó en el parénquima se apreció una discreta disociación de los cordones hepáticos, así como una congestión moderada difusa, numerosos hepatocitos se observaron entremezclados con pigmento biliar disperso. Para el Intestino delgado y grueso en ambos órganos se observaron a nivel de la mucosa con un infiltrado inflamatorio discreto, compuesto por células del tipo mononuclear principalmente linfocitos y algunas células plasmáticas, descamación moderada de las células epiteliales, así como fusión marcada de las vellosidades intestinales.

En el sistema linfoide a nivel de bazo se diagnosticó congestión esplénica moderada difusa a nivel del parénquima en pulpa roja. En los nódulos linfático se detectó una atrofia linfoide en centros germinativos a nivel de la corteza del parénquima.

En el sistema nervioso a nivel de cerebro se observó a nivel de las meninges una congestión moderada difusa, en parénquima a nivel de la sustancia gris cortical, se apreciaron amplias áreas de desmielinización y en sustancia blanca hubo una congestión y edema perivascular discreto difuso, además de edema perineural moderada y gliosis marcada. El cerebelo presentó desmielinización marcada en sustancia gris, congestión cerebelar moderada difusa, infiltrado linfocitario multifocal marcado.

De acuerdo a la historia clínica, a las lesiones encontradas en la necropsia, así como a las alteraciones observadas al microscopio, el animal cursó con un cuadro respiratorio severo, asociado a una infección severa de tipo viral causado por la presencia del virus del moquillo canino, adenovirus canino tipo 2 y lesiones compatibles con el virus de la influenza canina.

Caso número 5.

Las lesiones macroscópicas para caso 5 en el aparato respiratorio a nivel pulmonar, encontradas fueron una congestión, distensión y edema en los lóbulo craneal y el lóbulo caudal del lado izquierdo, en la cara diafragmática de ambos lóbulos se observaron unas protuberancias blanquecinas de consistencia firme y de superficie irregular. En el pulmón del lado derecho; en los lóbulos craneal y

medial, se observan estas mismas protuberancias blanquecinas de consistencia firme, que son observadas en las la cara diafragmática y en la cara medial; en el lóbulos caudal se pudieron distinguir zonas de consolidación de color rosa pálido, de consistencia firme. En el lóbulo accesorio, se observan zonas de consolidación blanquecinas que se observan en la cara diafragmática. A nivel traqueal en la mucosa se observó la presencia de gran cantidad de moco verdoso y ligera espuma.

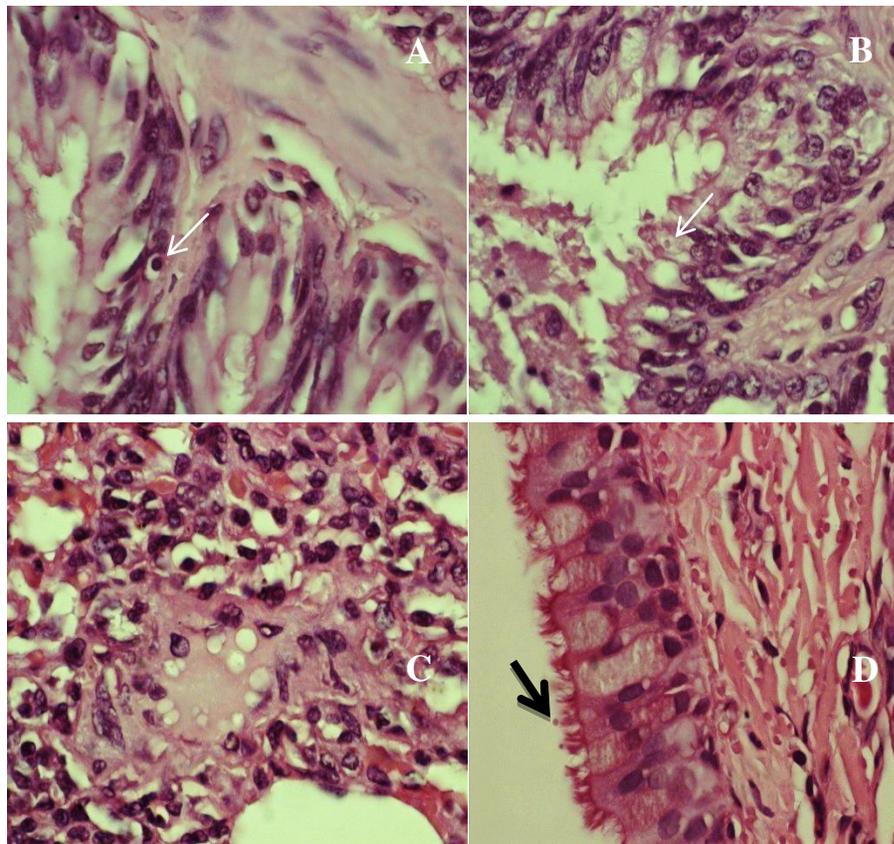


Figura 9. Resultados a la histopatología del caso 4 de CRC. Resultados a la necropsia de un Bull Terrier de un año y medio de edad eutanasiado por insuficiencia respiratoria, enflaquecimiento progresivo y sintomatología nerviosa severa. **En la imagen A**, se observan cuerpos de inclusión intranucleares de CAV-2, observados en pulmón (flecha) 100X. **En la imagen B**, se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV observados epitelio bronquial en pulmón (flecha) 100X. **En la imagen C**, se observa edema intersticial con engrosamiento de neumocitos tipo I y II sugerentes de influenza canina (flecha) 100X. **En la imagen D**, a nivel de tráquea se observa la salida de cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV, con gran actividad de las células caliciformes (flecha) 100X.

En la histopatología del aparato respiratorio se observó a nivel del parénquima marcado engrosamiento de los septos alveolares, reducción marcada en el espacio aéreo de los mismos, así como la presencia de fuerte infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear compuesto principalmente por neutrófilos, asimismo, se encuentra una congestión moderada difusa. Por otro lado, también se aprecia hiperplasia marcada de los neumocitos tipo I y II, en los cuales se aprecian abundantes cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, mientras que numerosos vasos sanguíneos muestran marcada degeneración fibrinoide y gran cantidad de eritrocitos en su interior. A nivel de los bronquios y bronquiolos, se aprecia en su interior un fuerte infiltrado inflamatorio de tipo polimorfonuclear compuesto principalmente por neutrófilos, mientras que a nivel de la mucosa hay la presencia de una hiperplasia epitelial marcada, con presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares eosinofílicos (Fig. 10B), eritrocitos y numerosas células epiteliales descamadas. En la tráquea se observa a nivel de la mucosa hiperplasia marcada del epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado, en el cual se aprecian cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en el citoplasma de numerosas células epiteliales (Fig. 10 D), además de una congestión moderada difusa, un edema traqueal en la submucosa con separación del cartílago hialino (Fig. 10 C) y pérdida epitelial en algunas áreas (Fig. 10 A).

Para el aparato digestivo a nivel de hígado en el parénquima se aprecia una severa disociación de los cordones hepáticos, así como una congestión severa difusa, numerosos hepatocitos se observan con marcada vacuolización de sus

citoplasmas. En el Intestino delgado y grueso se observó una enteritis linfoplasmocitaria moderada con descamación epitelial moderada, fusión marcada de las vellosidades intestinales. Se observa a nivel de la mucosa un infiltrado inflamatorio discreto compuesto por células del tipo mononuclear principalmente linfocitos y algunas células plasmáticas, descamación moderada de las células epiteliales, así como fusión marcada de las vellosidades intestinales.

El aparato urinario presento a nivel de riñón numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en urotelio de los cálices. Se aprecia a nivel de la médula en el urotelio de los cálices, la presencia de numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos. En la vejiga urinaria también se presentaron numerosos cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos eosinofílicos en mucosa.

En el sistema linfoide a nivel de bazo se diagnosticó congestión esplénica moderada difusa a nivel del parénquima en pulpa roja. En los nódulo linfáticos se observa a nivel de la corteza en el parénquima, atrofia linfoide marcada de los centros germinativos.

Para el sistema nervioso a nivel de cerebro los principales hallazgos microscópicos fueron una congestión meníngea marcada, desmielinización cortical marcada, congestión y edema perivascular discreto difuso, edema perineural moderada, gliosis marcada. Se observa a nivel de las meninges una congestión moderada difusa, en parénquima a nivel de la sustancia gris cortical, se aprecian amplias áreas de desmielinización y en sustancia blanca hay una congestión y

edema perivascular discreto difuso, además de edema perineural moderada y gliosis marcada. El cerebelo presentó una desmielinización marcada en sustancia gris, congestión cerebelar moderada difusa. Se observa marcada desmielinización de la sustancia gris, así como una congestión moderada difusa.

De acuerdo a la historia clínica, a las lesiones encontradas en la necropsia, así como a las alteraciones observadas al microscopio, el animal cursaba con un cuadro respiratorio severo, asociado a una infección severa de tipo viral causado por la presencia del virus del moquillo canino, y lesiones compatibles con el virus de la influenza canina.

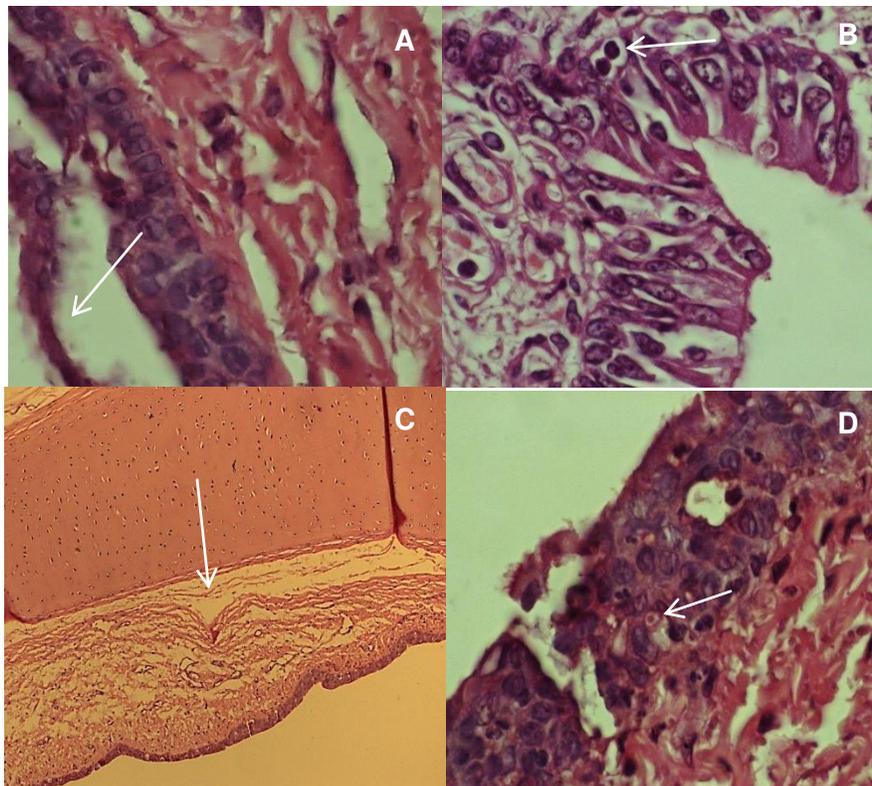


Figura 10. Resultados histopatológicos del caso 5 de CRC. Resultados a la necropsia de hembra Golden Retriever, de 2 y medio meses de edad, que fallece a consecuencia de una neumonía intersticial con implicación del SNC. **En la imagen A**, se observa el desprendimiento de la mucosa traqueal debido al reflejo tusígeno (flecha) 100X. **En la imagen B**, se observan cuerpos de inclusión intranuclear de CAV-2 en pulmón (flecha) 100X. **En la imagen C**, se observa edema

traqueal a nivel de submucosa con separación del mismo del cartílago hialino (flecha) 100X. **En la imagen D**, se observan cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos de CDV (flecha) 100X.

Para estos 5 casos además de las muestras de hisopos nasales y conjuntivales, se realizó a partir de las lesiones encontradas en parénquima pulmonar análisis de PCR para CAV-2 y de RT-PCR/PCR anidado para los virus de CDV, CPIV y CIV. Los casos 1 y 2 fueron positivos a CAV-2 a partir de parénquima pulmonar pero no así para los hisopados nasales y conjuntivales tomados de estos mismos caninos. Sin embargo hubo positividad en los cinco casos para CDV y CIV y estos mismos fueron negativos para el CPIV en parénquima pulmonar. En el caso de los hisopados nasales y conjuntivales, para CDV todos fueron positivos; en cambio para CIV, sólo uno de los casos fue positivo. Por otro lado, en el caso de CPIV el caso número 4 fue positivo en hisopado nasal y conjuntival, mientras que en la muestra a partir de pulmón, el resultado fue negativo.

Tabla 10. Resultados de las pruebas moleculares realizadas a los caninos que perecieron por CRC.

Número de caso	CAV-2	CDV	CPIV	CIV
1	(+)	(+)	(-)	(+)
2	(+)	(+)	(-)	(+)
3	(-)	(+)	(-)	(+)
4	(-)	(+)	(-)	(+)
5	(-)	(+)	(-)	(+)
Totales	40%	100%	0	100%

Resultados al RT-PCR y PCR correspondientes a muestras de parénquima pulmonar con lesiones diversas.

5. DISCUSIÓN.

El Complejo Respiratorio Canino (CRC) es un síndrome generalmente agudo de origen multifactorial en el cual están implicados una multitud de agentes infecciosos virales y no virales (Buonavoglia & Martella, 2007; Jeoung et al., 2013). Debido al amplio espectro clínico que muestran los caninos afectados por el CRC, el cual resulta de la participación del agente(s) implicado (su patogenia e inmunidad específica entre otros), la terapia y pronóstico de este síndrome depende de un diagnóstico preciso y oportuno del o los agentes infecciosos involucrado. En el presente estudio en un período de 13 meses (29-enero-2013 al 19-marzo-2014) se obtuvieron muestras de 102 caninos con síntomas sugerentes del Complejo Respiratorio Canino remitidos a clínicas del área metropolitana de Monterrey, N.L. México. Los criterios de inclusión clínica del estudio fueron la presencia de secreción nasal y lagrimal abundante, tos y dificultad respiratoria y además de que los ejemplares no hubiesen sido vacunados dentro de las últimas tres semanas contra los Virus de Distemper Canino, Adenovirus Canino Tipo 2 o Parainfluenza Canina. La detección de este cuadro respiratorio fue enteramente realizada por veterinarios de las distintas clínicas consideradas por su deseo de cooperar en el estudio. En primera instancia la sospecha inicial del clínico veterinario fue confirmar o descartar la presencia del Virus del Distemper Canino. Del total de muestras 31.4% (32/102), los veterinarios clínicos señalaron haber realizado una análisis previo, basado en el uso de una prueba inmunoenzimática disponible comercialmente, para la detección de antígeno del Distemper canino.

De esta muestras solo 20 fueron señaladas como positivas (62.5%) y 12 negativas (37.5%). Ante esta situación, se incorporaron en el estudio con la finalidad de obtener una mejor aproximación diagnóstico, por lo menos con los agentes virales que han sido implicados como partícipes del CRC considerados aquí. Para ello fue necesario establecer las condiciones necesarias para establecer el diagnóstico molecular basado ya sea en PCR o RT-PCR/PCR anidado para detectar los virus frecuentemente reportados en este complejo: el Adenovirus Canino tipo 2 (CAV-2)(Damian et al., 2005; Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008; Rodriguez-Tovar et al., 2007), el Virus de la Parainfluenza Canina (CPIV) (Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008), el Virus de Distemper Canino(CDV) (Erles et al., 2004; Buonavoglia & Martella, 2007; König, M. 2004) y el Virus de Influenza Canina (CIV) (Buonavoglia & Martella, 2007; Hayward et al., 2010). Además, tanto el CDV como el CIV fueron especialmente considerados en el estudio debido a que la mayoría de los clínicos refirieron que CDV es el patógeno principal involucrado en problemas respiratorios de caninos en el área metropolitana y para el caso de CIV debido a la sospecha clínica y epidemiológica de su presencia en el área metropolitana, su potencial zoonótico (Dubovi, E. 2010; (Yong-Hwan et al., 2001) y que ha sido recientemente involucrado en el CRC en otras partes del mundo (Jeoung et al., 2013; Li et al., 2010; D. Song et al., 2008)

Debido a que las muestreas clínicas fueron principalmente de hisopados nasales/conjuntivales se establecieron para los virus de CDV, CPIV y CIV un RT-PCR y PCR anidado para cada virus, respectivamente con el propósito de aumentar la sensibilidad de la misma, ya que la cantidad de virus eventualmente

presente puede no detectarse con un RT-PCR en un solo paso. Para ello, se utilizaron oligonucleótidos reportados por distintos autores (Erles, 2004; König, M. 2004; (WHO, 2009). Fue muy importante establecer esta metodología para detectar en pacientes enfermos, los virus objeto de estudio en esta investigación y poder establecer un sistema diagnóstico que le permitiera a los veterinarios del área metropolitana de Monterrey tener una herramienta más que les permitiera con mayor certeza un dar un diagnóstico definitivo, pero sobre todo establecer mejores medidas de tratamiento y control para estos virus. A diferencia de estudios realizados en otros países donde se establecieron estos pero a partir de animales que perecieron por estas infecciones, es decir estudios histopatológicos (Damian et al., 2005; Rodriguez-Tovar et al., 2007).

Para el Virus de Distemper Canino se estableció un RT-PCR/PCR anidado (König, 2004) que pudo detectar un fragmento del gen que codifica para la proteína N tanto en muestras de hisopados nasales como conjuntivales, además de tejidos (parénquima pulmonar). Como control positivo se uso una vacuna (Vanguard® Plus 5 L4 ,Pfizer) que contenía al menos $10^{3.5}$ TCID₅₀ de Virus del Distemper Canino. El establecimiento del PCR anidado fue muy importante para aumentar la sensibilidad de la prueba, ya que al RT-PCR solo fueron positivas el 57.63% del total de los resultados positivos para CDV (75.44% (77/102)), lo que indica que sin el PCR anidado se hubieran dado como negativas el 42.46% de las muestras analizadas positivas a este virus. Esto nos sugiere que la cantidad de virus que se secreta en fluido nasal y conjuntival no siempre puede ser detectable a pruebas como las inmunoenzimáticas de antígeno (SNAP) donde un tercio de las mismas

fueron negativas (12/32) analizadas por ambos métodos. Aún más importante que solo el RT-PCR tampoco hubiera sido capaz de detectar al 100% de las muestras positivas.

Este mismo efecto de sensibilidad de la prueba utilizada se mostró para el Virus de la Parainfluenza Canina, donde solo el 14.28% por ciento de las muestras incluyendo el control extraído a partir de la vacuna ($10^{5.5}$ TCID₅₀ de virus de la Parainfluenza Canina, Vanguard® Plus 5 L4, Pfizer)) fue positiva en el RT-PCR, siendo detectado el resto de los positivos solo en el PCR anidado. Para el caso del Virus de Influenza Canina se obtuvieron resultados similares, siendo muy importante el establecimiento de un PCR anidado para aumentar la sensibilidad de la prueba.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren fuertemente que a través de RT-PCR/PCR, utilizando muestras clínicas de caninos que presentan sintomatología sugerente del CRC se pueden detectar a los virus del CDV, CIV, CPIV y CAV-2 en su forma individual o combinada en caninos del Área metropolitana de Monterrey. Lo anterior, además de reforzar la hipótesis inicial de trabajo también demuestra la circulación y co-circulación de los virus antes mencionados en caninos con CRC. En primera instancia, se logró determinar la positividad para al menos uno de los virus involucrados en CRC en el 75.5% de las muestras y en una buena proporción en a manera de coinfecciones (22.6%).

Acorde a lo observado, en las muestras analizadas se presentaron co-infecciones entre el virus de CDV/CIV con una mayor frecuencia (14.7%). Seguida de la co-infección entre CDV/CIPV con un 4.9% y aún se pueden encontrar la participación de tres virus: CDV/CIV/CAV-2 (2%) y CDV/CPIV/CIV (1%).

La infección múltiple que se detectó en un porcentaje más alto en las muestras fue la de CDV y CIV, esto contrasta con los resultados de Mochizuki y colaboradores quienes, en un estudio realizado en Japón donde obtuvo muestras de 68 perros, no encontró ninguna co-infección entre éstos dos virus (Mochizuki et al., 2008). En un estudio realizado en México se encontró la mayor co-infección fue entre CDV y CPIV en 5 muestras de un total de 35 (Damian et al., 2005); sin embargo en este estudio no se incluyó a CIV, en nuestro estudio esta co-infección se encontró sólo en el 4.9% del total de las muestras (102). Damián et al (2005) en su estudio encontraron la co-infección de CAV, CPIV y CDV en el 28% de sus muestras, mientras que en nuestro estudio, no se encontraron ninguna muestra que involucrara los tres virus analizados por Damián; por otro lado en el 2% de las muestras analizadas en este estudio, se encontró la co-infección entre CDV, CAV-2 y CIV. Mientras que CIV, no fue reportado en las investigaciones hechas por Erles y Mochizuki (Erles et al., 2004; Mochizuki et al., 2008). Otro resultado no reportado en la literatura fue la co-infección entre CDV/CPIV/CIV, en presente estudio se encontró que en el 1% de los casos analizados mostró esta infección múltiple. En nuestro estudio el virus de mayor índice de frecuencia de detección ya sea en su forma individual (50 %) y/o asociado con uno o hasta tres distintos agentes virales (22.6%) fue el CDV. Este virus fue considerado como el principal

agente etiológico involucrado en CRC según la sintomatología clínica reportado por los veterinarios. Acorde a lo observado, se puede sugerir que es el CDV es el virus con la más notable participación CRC y de mayor circulación en los caninos del área metropolitana de Monterrey con cuadros clínicos respiratorios de variable intensidad. Dentro de la sintomatología que se asociaron con casos positivos a CDV fue principalmente secreción nasal y conjuntival, tos, dificultad respiratoria y en menor proporción cuadros nerviosos y digestivos. Sin embargo en los estudios histopatológicos de 5 casos de caninos de distintas edades, razas y sexo que perecieron por problemas respiratorios se pudo comprobar a través de la histopatología y pruebas moleculares la presencia de este virus en sistema respiratorio, y solo por estudios histopatológicos en sistema nervioso central, sistema urinario, linfático y en algunos casos en sistema digestivo. Para este virus se utilizan vacunas de distintas marcas comerciales y diversos protocolos de vacunación para proteger a los caninos, sin embargo una alta proporción de los mismos no terminan el calendario de vacunación o inclusive muchos de ellos no son vacunados. En el caso de las muestras analizadas solamente un el 15.68% (16/102) de los caninos con sintomatología respiratoria habían sido inmunizados con una de las variantes de protocolo completo de vacunación y en este grupo solo un 4/16 fueron positivos a CDV. Se pudo observar una mayor proporción de caninos positivos en los grupos con protocolo de vacunación incompleto (24/25) y con protocolo incompleto de vacunación (45/61). Lo que puede indicar que la vacunación adecuada puede disminuir la presencia del virus del CDV en la población canina del área metropolitana de Monterrey. Se puede ver una tendencia a una mayor susceptibilidad a CDV en caninos de 3 a 6 meses de edad

(81.81%) y con calendario incompleto o nulo de vacunación, lo que concuerda con que los perros en ese rango de edad son los más susceptibles a contraer CDV (Martella et al., 2008; Yong-Hwan et al., 2001).

Los resultados fueron analizados, de acuerdo a la edad, municipio de procedencia, sintomatología al momento de la toma de muestra y si contaban o no con un protocolo completo de vacunación para cada uno de los virus incluidos en el estudio. Aparentemente y con excepción del calendario completo de vacunación, dada la dispersión de los datos de las otras variables, no fue posible establecer asociación ($P > 0.05$) entre la presencia de la infección con estas variables estudiadas (datos no mostrados). Se logró establecer que los animales no vacunados contra el Virus de Distemper Canino tienen mayor riesgo a presentar el CDV que aquellos caninos vacunados ($P < 0.0001$).

El virus que se encontró en segundo lugar con mayor frecuencia fue el Virus de la Influenza Canina (19.7%), aquí la prueba diagnóstica se dirigió hacia una región muy conservada para los miembros de la influenza A, por lo que no se pudo establecer qué tipo de cepa es de acuerdo a la neuraminidasa y hemaglutinina que posee. Este virus se presentó como un mono-infección solo en 2 casos del total de 102, aquí los signos clínicos comunes para ambos casos fueron secreción nasal y ocular, así como temperatura alta. En el 14.6% del total de los casos se presentó una co-infección entre CIV/CDV. Además se detectaron co-infecciones entre 3 virus, CDV/CAV-2/CIV en un 2% (2/102) y entre CDV/CPIV/CIV en un caso. Esto nos indica en los problemas respiratorios de caninos de Monterrey y su

área metropolitana se encuentra circulando el virus de CIV en su forma individual y asociado con otros virus. Hasta donde sabemos, no ha ocurrido reportes sobre CIV en México por lo que el presente estudio representa el primer reporte de la circulación de este virus en la población canina del país. Contrario a esto, se ha reportado ampliamente en brotes en distintos países tales como Estados Unidos (Buonavoglia & Martella, 2007; Hayward et al., 2010), China; (D. S. Song et al., 2011). A pesar de esto, se han estudiado poco sobre los tipos y subtipo de Influenza que puede infectar a caninos y si estos tipos pueden ser transmitidos al humano: Se ha comprobado que los subtipos de influenza H3N8 equino y H3N2 aviar son capaces de adaptarse en la población canina y son los que actualmente se encuentran en circulación en América, Asia y Europa (Giese et al., 2008; Harder & Vahlenkamp, 2010; Kirkland et al., 2010; D. S. Song et al., 2011; Wang et al., 2013). Experimentalmente también se han comprobado que caninos pueden infectarse con cepas humanas como el subtipo H3N2, pero no se ha detectado en forma natural aun (D. S. Song et al., 2011). Por este motivo es importante establecer en futuros estudios lo tipos y subtipos de Influenza Canina que circulan en la población de perros del área metropolitana de Monterrey, si estos caninos pueden ser una fuente de infección para humanos o viceversa y que se adopten las medidas pertinentes para disminuir su presencia en la zona. Por otro lado es importante establecer la necesidad del desarrollo de vacunas y la aplicación de estas en las poblaciones caninas de la zona, ya que de momento no se cuenta con un biológico que contenga cepas de CIV. Al momento existe una Vacuna en Estados Unidos sin embargo a pesar de la aplicación de la misma ha existido la propagación del CIV en la población canina de este país (Boonsuk et al., 2008).

En el caso del virus de la Parainfluenza Canina se pudo diagnosticar solo en el 7.9% del total de las muestras y solo en 1 de ella como un a mono-infección. Por lo que se sugiere que este virus circula en una proporción menor en caninos del área metropolitana de Monterrey, debido a la aplicación de vacunas que ayudan a controlar la enfermedad y disminuir la severidad de los síntomas como lo sugieren algunos investigadores (Buonavoglia & Martella, 2007). Por otro lado es importante resaltar que solamente se obtuvieron resultados positivos a hisopados nasales y conjuntivales y no así en las muestras de pulmón lo que concuerda con los datos publicados de replicación de este virus solo mucosa de tracto respiratorio alto (Greene & Addie, 2008).

Por último para el virus de CAV-2 solamente se encontraron resultados positivos para 2 casos de la histopatología y ningún resultado positivo para hisopados nasales y conjuntivales. Esto puede ser según la literatura consultada porque los caninos que se infectan con CAV-2 presentan un cuadro clínico agudo generalmente se recuperan espontáneamente sin mostrar signos de la enfermedad, y rara vez termina con la muerte (Buonavoglia & Martella, 2007; Rodriguez-Tovar et al., 2007). Por otro lado en los casos que se presentó el CAV-2, se encontró asociado con otros virus (CDV/CAV-2/CIV en un 3.92% (4/102) y donde se detectó por histopatología cuerpos de inclusión intranuclear basófilos en epitelio bronquial, bronquiolar y neumocitos, una neumonía bronco intersticial con necrosis y exfoliación del epitelio bronquiolar y alveolar, seguido por una hiperplasia de los neumocitos de tipo 2, como lo reportan otros autores (Buonavoglia & Martella, 2007; Damian et al., 2005; Rodriguez-Tovar et al., 2007).

Por otro lado es importante resaltar que de estos 4 casos compatibles en las lesiones histopatológicas solamente se pudo detectar fragmentos del genoma en dos de las muestras al PCR, esto se pudo deber a que para este virus solo se montó un PCR punto final y no se agregó un PCR anidado, esto limita la sensibilidad de la prueba comparada con los pruebas establecidas para CDV, CPIV y CIV. Por lo que se recomienda establecer un PCR anidado o un Real time PCR para aumentar la sensibilidad de la prueba.

En resumen las diferencias en los índices de frecuencias encontrados, para todos y cada uno de los virus incluidos en este trabajo comparados con aquellos estudios similares realizados en otras partes del mundo probablemente se deban al diseño del estudio, tipos de pruebas diagnósticas empleadas para detectar a los patógenos virales y a la dinámica epidemiológica de los diferentes agentes involucrados en la población canina del lugar de estudio. Como se ha señalado anteriormente, se sugiere continuar con estudios similares para revelar la participación de otros agentes infecciosos y/o condiciones que posibilitan la aparición del CRC y su impacto en la salud de la población canina. Por otro lado, es necesario determinar la dinámica epidemiológica de todos y cada uno de los agentes involucrados para establecer las pautas para el control y eventual erradicación de los patógenos virales involucrados.

6. CONCLUSIONES.

Se establecieron las condiciones para efectuar el diagnóstico molecular de los virus del CDV, CIV, CPI, asociados al complejo respiratorio canino.

Dada la alta sensibilidad y especificidad del protocolo establecido para detectar al Virus del Distemper Canino se sugiere fuertemente que las pruebas inmunoenzimáticas para la detección de antígenos del Distemper en muestras clínicas del CRC podrían tener un valor limitado de uso para confirmar el diagnóstico clínico.

Para el virus de CAV-2 es necesario establecer un PCR anidado o Real time PCR para aumentar la sensibilidad a partir de muestras obtenidas de animales con el CRC.

Las muestras del tipo hisopos nasal y conjuntival son adecuadas cuando una de la sintomatología más importante es descarga nasal y conjuntival para los virus de CDV, CIV y CPIV. La muestra más adecuada cuando el CAV-2 participa en el Complejo Respiratorio Canino son muestras de tejido pulmonar.

El virus que se presenta con mayor frecuencia en caninos del área metropolitana de Monterrey es CDV en animales con protocolos incompletos o nulos de vacunación. La co-infección más frecuente de este virus fue CDV/CIV y además se presentó en menor proporción con CDV/CAV-2/CIV en un 2% (2/102) y entre

CDV/CPIV/CIV. Lo que sugiere que el CDV puede ser una agente inmunodepresor que permite las co-infecciones, sin embargo se requieren mayores estudios para establecer este punto.

El Virus de Influenza Canina se encuentra circulando en el área metropolitana de Monterrey, en su forma individual y participando en co-infecciones con otros virus. Es importante realizar posteriores estudios de aislamiento, análisis moleculares y de caracterización genética que nos permitan identificar los tipos y subtipos y establecer si los caninos son una fuente eventual de infección para la población humana.

Una vez demostrada la presencia de CDV, CIV, CPIV, CAV-2 se recomienda realizar estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de estos virus en la población canina del área Metropolitana de Monterrey.

7. BIBLIOGRAFÍA.

- Amude, A. M., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2007). Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res Vet Sci*, *82*(3), 416-422.
- Armadas, I. d. P. d. I. F., & Prophet, E. B. (1995). *Métodos histotecnológicos: Registro de Patología*.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., & Baumgartner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet Immunol Immunopathol*, *127*(1-2), 1-18.
- Benetka, V., Weissenbock, H., Kudielka, I., Pallan, C., Rothmuller, G., & Mostl, K. (2006). Canine adenovirus type 2 infection in four puppies with neurological signs. *Vet Rec*, *158*(3), 91-94.
- Bonami, F., Rudd, P. A., & von Messling, V. (2007). Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. *J Virol*, *81*(21), 12066-12070.
- Boonsuk, P., Payungporn, S., Chieochansin, T., Samransamruajkit, R., Amonsin, A., Songserm, T., Poovorawan, Y. (2008). Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction. *Tohoku J Exp Med*, *215*(3), 247-255.
- Bru, T., Salinas, S., & Kremer, E. J. (2010). An update on canine adenovirus type 2 and its vectors. *Viruses*, *2*(9), 2134-2153.

- Bulut, O., Yapici, O., Avci, O., Simsek, A., Atli, K., Dik, I., Mamak, N. (2013). The serological and virological investigation of canine adenovirus infection on the dogs. *Scientific World Journal*, 2013, 587024.
- Buonavoglia, C., & Martella, V. (2007). Canine respiratory viruses. *Vet Res*, 38(2), 355-373.
- Carvalho, O. V., Botelho, C. V., Ferreira, C. G., Scherer, P. O., Soares-Martins, J. A., Almeida, M. R., & Silva Junior, A. (2012). Immunopathogenic and neurological mechanisms of canine distemper virus. *Adv Virol*, 2012, 163860.
- Chen, Z., Xu, P., Salyards, G. W., Harvey, S. B., Rada, B., Fu, Z. F., & He, B. (2012). Evaluating a parainfluenza virus 5-based vaccine in a host with pre-existing immunity against parainfluenza virus 5. *PLoS One*, 7(11), e50144.
- Chvala, S., Benetka, V., Mostl, K., Zeugswetter, F., Spargser, J., & Weissenböck, H. (2007). Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. *Vet Pathol*, 44(4), 508-512.
- Crawford, P. C., Dubovi, E. J., Castleman, W. L., Stephenson, I., Gibbs, E. P., Chen, L., . . . Donis, R. O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, 310(5747), 482-485.
- Céspedes, P., 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. *Rev. Bibliográfica. Arch Med Vet.* 42, 15-28.

- Damian, M., Morales, E., Salas, G., & Trigo, F. J. (2005). Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. *J Comp Pathol*, 133(4), 289-293.
- de Blas , I. (2006). Win Epi: Working in Epidemiology (versión 2.0) [Software] Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España. Consultado en línea: <http://www.winepi.net/sp/index.htm>
- Decaro, N., Camero, M., Greco, G., Zizzo, N., Tinelli, A., Campolo, M., Buonavoglia, C. (2004). Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol*, 27(2), 177-181.
- Decaro, N., Martella, V., & Buonavoglia, C. (2008). Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38(4), 799-814, viii.
- Dubovi, E. J. (2010). Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1063-1071.
- Dubovi, E. J., & Njaa, B. L. (2008). Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38(4), 827-835, viii.
- Ek-Kommonen, C., Sihvonen, L., Pekkanen, K., Rikula, U., & Nuotio, L. (1997). Outbreak off canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec*, 141(15), 380-383.
- Erles, K., Dubovi, E. J., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2004). Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4524-4529.
- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H. W., & Brownlie, J. (2003). Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology*, 310(2), 216-223.

- Frisk, A. L., 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. *J Clin Microbiol*, 37(11), 3634-3643.
- Giese, M., Harder, T. C., Teifke, J. P., Klopfleisch, R., Breithaupt, A., Mettenleiter, T. C., & Vahlenkamp, T. W. (2008). Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis*, 14(2), 308-310.
- Greene, C. E., & Addie, D. D. (2008). *Enfermedades infecciosas del perros y el gato*: Inter-Médica.
- Harder, T. C., & Vahlenkamp, T. W. (2010). Influenza virus infections in dogs and cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 134(1-2), 54-60.
- Hayward, J. J., Dubovi, E. J., Scarlett, J. M., Janeczko, S., Holmes, E. C., & Parrish, C. R. (2010). Microevolution of canine influenza virus in shelters and its molecular epidemiology in the United States. *J Virol*, 84(24), 12636-12645.
- Hu, R. L., Huang, G., Qiu, W., Zhong, Z. H., Xia, X. Z., & Yin, Z. (2001). Detection and Differentiation of CAV-1 and CAV-2 by Polymerase Chain Reaction. *Veterinary Research Communications*. 25, 77-84.
- Jeoung, H. Y., Song, D. S., Jeong, W. S., Lee, W. H., Song, J. Y., & An, D. J. (2013). Simultaneous detection of canine respiratory disease associated viruses by a multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction assay. *J Vet Med Sci*, 75(1), 103-106.

- Kirkland, P. D., Finlaison, D. S., Crispe, E., & Hurt, A. C. (2010). Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis*, 16(4), 699-702.
- König, M. (2004.). *Nachweis eines Genomabschnittes des Hundestaupevirus (CDV) mit Hilfe der reversen Transkription/Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)*. Gienssen, Deutschland.
- Lan, N. T., Yamaguchi, R., Inomata, A., Furuya, Y., Uchida, K., Sugano, S., & Tateyama, S. (2006). Comparative analyses of canine distemper viral isolates from clinical cases of canine distemper in vaccinated dogs. *Vet Microbiol*, 115(1-3), 32-42.
- Li, S., Shi, Z., Jiao, P., Zhang, G., Zhong, Z., Tian, W., . . . Wan, X. F. (2010). Avian-origin H3N2 canine influenza A viruses in Southern China. *Infect Genet Evol*, 10(8), 1286-1288.
- Maclachlan, N. J., & Dubovi, E. J. (2010). *Fenner's Veterinary Virology*: Elsevier Science.
- Martella, V., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38(4), 787-797, vii-viii.
- Merck, M. (2010). *Veterinaria forense : investigaciones sobre crueldad hacia los animales*: Editorial Acribia, S.A.
- Mochizuki, M., Yachi, A., Ohshima, T., Ohuchi, A., & Ishida, T. (2008). Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J Vet Med Sci*, 70(6), 563-569.
- Park, S. A., Park, S. Y., Song, C. S., Choi, I. S., Kim, H. Y., Lee, J. B., & Lee, N. H. (2012). Development of a novel vaccine against canine parvovirus infection

- with a clinical isolate of the type 2b strain. *Clin Exp Vaccine Res*, 1(1), 70-76.
- Priestnall, S. L., Brownlie, J., Dubovi, E. J., & Erles, K. (2006). Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol*, 115(1-3), 43-53.
- Priestnall, S. L., Pratelli, A., Brownlie, J., & Erles, K. (2007). Serological prevalence of canine respiratory coronavirus in southern Italy and epidemiological relationship with canine enteric coronavirus. *J Vet Diagn Invest*, 19(2), 176-180.
- Rodriguez-Tovar, L. E., Ramirez-Romero, R., Valdez-Nava, Y., Nevarez-Garza, A. M., Zarate-Ramos, J. J., & Lopez, A. (2007). Combined distemper-adenoviral pneumonia in a dog. *Can Vet J*, 48(6), 632-634.
- Rudd, P. A., Cattaneo, R., & von Messling, V. (2006). Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol*, 80(19), 9361-9370.
- Salazar, M. I., Lopez-Ortega, O., Leon-Avila, G., Ramirez-Gonzalez, J. E., & Castro-Mussot, M. E. (2010). [The origin of the genetic variability of influenza viruses]. *Gac Med Mex*, 146(3), 199-206.
- Simon-Martinez, J., Ulloa-Arvizu, R., Soriano, V. E., & Fajardo, R. (2008). Identification of a genetic variant of canine distemper virus from clinical cases in two vaccinated dogs in Mexico. *Vet J*, 175(3), 423-426.
- Song, D., Kang, B., Lee, C., Jung, K., Ha, G., Kang, D., . . . Oh, J. (2008). Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerg Infect Dis*, 14(5), 741-746.

- Song, D. S., An, D. J., Moon, H. J., Yeom, M. J., Jeong, H. Y., Jeong, W. S., . . . Kang, B. K. (2011). Interspecies transmission of the canine influenza H3N2 virus to domestic cats in South Korea, 2010. *J Gen Virol*, 92(Pt 10), 2350-2355.
- Stanton, J. B., Poet, S., Frasca, S., Jr., Bienzle, D., & Brown, C. C. (2002). Development of a semi-nested reverse transcription polymerase chain reaction assay for the retrospective diagnosis of canine distemper virus infection. *J Vet Diagn Invest*, 14(1), 47-52.
- Tong, S., Li, Y., Rivaller, P., Conrardy, C., Castillo, D. A., Chen, L. M., . . . Donis, R. O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(11), 4269-4274.
- Vandeveld, M., & Zurbriggen, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol*, 109(1), 56-68.
- Von Messling, v., Milosevic, D., & Cattaneo, R. (2004). Tropism Illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *P Natl Acad Sci*. 101, 14216-14221.
- Wang, H., Jia, K., Qi, W., Zhang, M., Sun, L., Liang, H., . . . Li, S. (2013). Genetic characterization of avian-origin H3N2 canine influenza viruses isolated from Guangdong during 2006-2012. *Virus Genes*, 46(3), 558-562.
- Weese, J. S., & Stull, J. (2013). Respiratory disease outbreak in a veterinary hospital associated with canine parainfluenza virus infection. *Can Vet J*, 54(1), 79-82.
- WHO. (2009). WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009. Geneva, Switzerland: WHO.

- Yong-Hwan, K., Kyu-Woan, C., Hwa-Young, Y., Han Sang, Y., & Hong-Ryul, H. (2001). Detection of canine distemper virus (CDV) through one step RT-PCR combined with nested PCR. *Journal Veterinary Science.*, 59-63.
- Zachary James F., D., PhD, & McGavin Donald, M., PhD, FACVSc. (2012). *Pathologic Basis of Veterinary Disease.* (5th Edition ed.): Elsevier.
- Zachary, J. F., & McGavin, D. (2013). *Pathologic Basis of Veterinary Disease:* Elsevier Health Sciences.

ANEXOS

RESULTADOS DE LA DETECCIÓN DE VIRUS ASOCIADOS AL COMPLEJO REPIRATORIO CANINO.

FECHA	NOMBRE	VACUNAS	MUNICIPIO	CDV	CPIV	CAV-2	CIV	SINTOMATOLOGIA
29/04/13	1.LULU	N	SN	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña
30/04/13	2.ZIP	N	GPE	+	+	-	+	Moco, lagaña, dificultad respiratoria, Tics nerviosos, anorexia, vómito
2/05/13	3.S/N	N	SN	+	-	-	-	Depresión, lagaña, anorexia
3/05/13	4.GUNTHER	P	APDA	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, dificultad respiratoria, hiperqueratosis, anorexia
1/05/13	5.MATEO	N	SN	+	-	-	+	Moco, lagaña, tos
6/05/13	6.DUQUESA	P	APDA	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, dificultad respiratoria, hiperqueratosis, anorexia
6/05/13	7.NICKY	N	APDA	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, hiperqueratosis, anorexia, vómito
7/05/13	8.CANDY	N	SN	-	-	-	-	Lagaña
8/05/13	9.WILLY	N	SN	+	-	-	+	Tos, estornudos, lagaña, dificultad respiratoria, anorexia
13/05/13	10.S/N	P	APDA	+	-	-	+	Estornudos, tos, lagaña, dificultad respiratoria, Tics nerviosos, hiperqueratosis
13/05/13	11.MORETTA	P	APDA	+	-	-	+	Tos, estornudos, lagaña, moco, dificultad respiratoria
17/05/13	12.COQUITA	P	SN	+	-	-	+	Lagaña
17/05/13	13.CHUECO	N	APDA	+	-	-	-	Lagaña, hiperqueratosis, anorexia
11/05/13	14.MARA	N	SN	+	-	-	+	Estornudo, moco, lagaña
11/05/13	15.ALINNE	C	SN	+	-	-	-	Estornudo, moco, lagaña
11/05/13	16.CAMILA	P	SN	+	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos, dificultad respiratoria, anorexia
11/05/13	17.GALA	N	SN	+	-	-	-	Dificultad respiratoria, lagaña, tics nerviosos
16/05/13	18.BOTAS	N	SN	+	-	-	-	Lagaña
14/05/13	19.TEKILA	P	SN	+	-	-	-	Anorexia, lagaña
20/05/13	20.BUDDY	N	APDA	+	-	-	-	Moco, lagaña, anorexia, tics nerviosos
21/05/13	21.KIMBERLY	N	SN	+	-	-	-	Anorexia, tics
	22.ANULADA							
23/05/13	23.RAYITO	N	SN	+	-	-	-	Lagaña, diarrea, vómito, anorexia
25/05/13	24. GORDA	N	SN	-	-	-	-	Moco, lagaña, dificultad respiratoria
25/05/13	25.P.ALEMAN	N	SN	-	-	-	-	Lagaña
26/05/13	26.ORSON	C	SN	-	-	-	-	Lagaña
26/05/13	27.MUSA	C	SN	-	-	-	-	Lagaña
26/05/13	28.JOZY	C	SN	-	-	-	-	Estornudos
27/05/13	29.FLICA	C	SN	-	-	-	-	Lagaña
29/05/13	30.BONITA	N	APDA	+	+	-	-	Tos , lagaña
30/05/13	31.TOSSO	C	SN	-	-	-	-	Estornudos
1/06/13	32.MUÑECA	N	APDA	-	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos, hiperqueratosis
1/06/13	33.LUNA	N	APDA	+	-	-	-	Moco, lagaña, hiperqueratosis, anorexia

FECHA	NOMBRE	VACUNAS	MUNICIPIO	CDV	CPIV	CAV-2	CIV	SINTOMATOLOGIA
3/06/13	34.HÚNGARO	C	MTY	+	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos
10/06/13	35.NEGRO	N	MTY	+	-	-	-	Moco, diarrea c/sangre, anorexia, fiebre
10/06/13	36.CAFÉ	N	MTY	+	-	-	-	Tos, estornudos, diarrea, moco, lagaña, anorexia
10/06/13	37.S/N	N	SN	+	-	-	-	Estornudo, moco, lagaña, dificultad respiratoria.
11/06/13	38. S/N CAFÉ	N	SN	-	-	-	-	Lagaña, anorexia, débil
12/06/13	39. VITO	N	SN	-	-	-	-	Lagaña, anorexia, hiperqueratosis, vómito, tics nerviosos
13/06/13	40.KIARA	N	SN	-	-	-	-	Diarrea, anorexia, vómito
14/06/13	41.HÉRCULES	N	SN	+	-	-	-	Lagaña, moco, vómito, anorexia, fiebre, diarrea
15/06/13	42.LAILA	C	SN	-	-	-	-	Tics nerviosos
17/06/13	43.YANKY	P	SN	-	-	-	-	Tics nerviosos, diarrea, anorexia
19/06/13	44.KISSY	N	MTY	-	-	-	-	Moco, lagaña, dificultad respiratoria, vómito, tics nerviosos
19/06/13	45. NIKY	N	SN	+	-	-	-	Vómito, diarrea
21/06/13	46.NICO	N	SN	+	-	-	-	Lagaña, moco
4/07/13	47.DAGER	P	SN	+	-	-	-	Tos, estornudos, moco, lagaña
10/07/13	48.BOLA	N	SN	-	-	-	-	Estornudos, moco, lagaña
22/07/13	49.COOKIE	P	SN	+	-	-	-	Lagaña verdosa
2/08/13	50.S/N	N	SN	+	-	-	-	Estornudo, moco, lagaña
23/08/13	51.HÉRCULES	N	ESC	+	-	-	-	Estornudo, moco, lagaña, dificultad respiratoria, diarrea
2/09/13	52.RENATA	N	SN	+	+	-	-	Estornudo, moco, lagaña
9/09/13	53. PULGA	N	SN	+	-	-	-	Dificultad respiratoria, vómito, diarrea
2/09/13	54.TYLER	N	ESC	-	-	-	-	Estornudo, lagaña, dificultad respiratoria, anorexia
18/09/13	55.LUNA	P	ESC	+	-	-	-	Tos, Estornudo, lagaña, dificultad respiratoria, Anorexia
12/09/13	56.RECOGIDO	N	SN	+	-	-	-	Tos, estornudo, moco
27/09/13	57.MAX	N	SN	+	-	-	-	Moco, lagaña, anorexia, tics nerviosos
23/09/13	58.BILLY	N	SN	+	-	-	-	Lagaña, dificultad respiratoria
3/10/13	59.INNU	N	SN	-	-	-	-	Tos, estornudos, moco, dificultad respiratoria, Anorexia
12/10/13	60.S/N	N	SN	-	-	-	-	Lagaña, moco
2/11/13	61.NOE	C	MTY	+	-	-	+	Tos, estornudos, moco, lagaña, anorexia
14/11/13	62.NINA	N	SN	+	-	-	-	Tos, estornudo, moco, lagaña ,anorexia
10/11/13	63.NINA	P	SN	+	-	-	-	Estornudo, moco, lagaña, anorexia, convulsión
20/11/13	64.CAFECITO	N	SN	+	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos
26/11/13	65.MIA	C	SN	-	-	-	-	Moco, lagaña
14/12/13	66.KIMY	P	GPE	+	-	-	-	Moco, lagaña, dificultad respiratoria, tos y tics nerviosos
28/11/13	67.NIKY	N	ESC	+	-	-	-	Moco, lagaña, tos, diarrea, vómito
11/12/13	68. JACK	N	ESC	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, tics nerviosos

FECHA	NOMBRE	VACUNAS	MUNICIPIO	CDV	CPIV	CAV-2	CIV	SINTOMATOLOGIA
17/12/13	69.CACHO	N	ESC	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, anorexia, depresión
2/01/14	70.BLACKY	C	SN	-	-	-	-	Tos, estornudo, lagaña, dificultad respiratoria, hiperqueratosis
2/01/14	71. DOKY	N	SN	+	-	-	-	Tics nerviosos
3/01/14	72. BETO	P	SN	+	-	-	-	Moco, lagaña
10/01/14	73.BRUNO	N	SN	-	+	-	-	Moco, tics, dificultad respiratoria
14/01/14	74.LUIGI	N	APDA	+	-	-	-	Tics nerviosos, lagaña
13/01/14	75.SAMMY	N	SN	-	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos, hiperqueratosis
26/11/13	76.SORULLA	P	GPE	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, diarrea, tics nerviosos
2/02/14	77.ROCKY	C	SN	-	-	-	-	Tos, estornudos, moco, lagaña, dificultad respiratoria
8/02/14	78.CHIHUA	N	SN	+	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos
13/02/14	79. KEYLA	P	SN	+	-	-	-	Estornudos, moco, lagaña, dificultad respiratoria, tics nerviosos
13/02/14	80.S/N	N	APDA	-	-	-	-	Estornudos, moco, lagaña, dificultad respiratoria
21/02/14	81.TYSON	N	GPE	+	-	-	-	Moco, lagaña, tics nerviosos, diarrea
22/02/14	82.PALOMO	P	ESC	+	+	-	-	Tos, moco, lagaña, hiperqueratosis, tics nerviosos, vómito, anorexia
21/02/14	83.MAKE	P	GPE	+	+	-	-	Tos, lagaña, moco, tics nervioso, diarrea, vómito
20/02/14	84.PEQUE	N	GPE	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, tics nerviosos, diarrea
19/03/14	85.LADY	P	MTY	+	-	-	-	Tos, moco, lagaña, tics nerviosos, dificultad respiratoria
28/01/13	86 (1c).NENA	N	ESC	+	-	-	-	Tos, estornudos, moco, lagaña
13/02/13	87 (2c). JAMA	C	ESC	-	-	-	+	Moco, lagaña, tics nerviosos, temperatura alta
16/02/13	88 (3c). GREG	P	ESC	+	-	-	+	Moco, lagaña verdosa
20/02/13	89 (4c). TONCA	P	ESC	+	-	-	+	Estornudos, lagaña
25/02/13	89 (5c).BEBE	S/D	ESC	-	-	-	-	Sin datos
22/02/13	90 (6c). LOVELY	C	ESC	-	-	-	+	Moco, lagaña, anorexia, temperatura alta
22/03/13	91 (7c). LOLA	P	ESC	+	-	-	-	Lagaña, tics nerviosos, diarrea
9/04/13	92 (8c). TOBIAS	P	ESC	+	-	-	-	Tics nerviosos, anorexia
17/04/13	93 (9c). BUMMER	S/D	ESC	+	-	-	-	Sin datos
15/04/13	94 (10c). JESICA	C	MTY	-	-	-	-	Tics nerviosos
3/05/13	95 (11c). CAMIL	P	ESC	+	-	-	+	Sin datos
20/05/13	96 (12c). TJ	N	ESC	+	-	-	+	Moco, lagaña
23/05/13	97 (13c). PRETTY	P	ESC	+	-	-	-	Sin datos
	98 (14c). SHOKER	S/D	ESC	+	-	-	-	Sin datos
	99 (15c). SAMARA	S/D	ESC	+	-	-	-	Sin datos
28/10/13	100 (16c). KODA	C	MTY	+	-	-	+	Tos, estornudo, lagaña, dificultad respiratoria

FECHA	NOMBRE	VACUNAS	MUNICIPIO	CDV	CPIV	CAV-2	CIV	SINTOMATOLOGIA
23/03/13	101 (17c). HUSKY	S/D	GPE	+	+	-	-	Dificultad respiratoria, estornudos, moco, lagaña, hiperqueratosis, vómito
24/04/13	102 (18c). JAIME	S/D	GPE	+	-	-	-	Sin datos

Abreviaturas: Monterrey (MTY); Guadalupe (GPE); Escobedo (ESC); Apodaca (APDA); San Nicolás (SN). Protocolo de vacunación Parcial (P), Protocolo de vacunación Completa (C), Protocolo de vacunación Nula (N). Positivo (+); Negativo (-).

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA PARA CANIDEOS CON ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

Nombre de la clínica:	
Nombre de la mascota:	
Edad:	Sexo:
Raza:	Fecha de toma de muestra:

Marca con una x la respuesta correspondiente a cada indicador de la siguiente encuesta

Indicador					
¿Tiene vacunación polivalente previa?	SI			NO	
	Fecha ultima aplicación:				
¿Sigue un calendario de vacunación establecido desde cachorro?	SI			no	
Tipo de hábitat de la mascota:	Casa habitación	Criadero		Tienda de mascotas	
Nivel socioeconómico del área donde vive la mascota	Bajo	Medio		Alto	
¿La mascota tiene acceso a la calle?	SI			NO	
¿Cohabita con otras caninos?	SI			NO	
¿Los caninos con los que habita presentan sintomatología similar?	SI			NO	
Presenta los siguientes signos clínicos	Tos	Estornudos	Descarga nasal	Descarga ocular	
	Dificultad respiratoria	Sinología nerviosa	Hiperqueratosis plantar	Disminución apetito	Heces firmes
	Vómito				
Tiempo transcurrido o desde el inicio de los					

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA PARA CANIDEOS CON ENFERMEDADES RESPIRATORIAS

signos clínicos					
Tratamientos previos a la toma de la muestra.	SI				NO
	Antibiótico	Inmunoestimulante	Expectorantes	Otros	
Duración del tratamiento	1 sem.	2sem.	3sem.	4sem.	5 sem.

PROTOCOLO DE VACUNACIÓN UTILIZADO POR CLÍNICOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE MONTERREY

Virus vacunales	1era dosis	2da dosis	3era dosis	Revacunación
CPV2, CDV, CPIV, CAV-2, CAV-1,	6 semanas	8 semanas	10 semanas	Anual

Protocolo utilizado con más regularidad en clínicas de Monterrey y su área metropolitana. CPV2 (Parvovirus Canino), CDV (Virus del Distemper Canino), CPIV (Virus de la Parainfluenza Canina), CAV-2 (Adenovirus Canino Tipo 2), CAV-1 (Adenovirus Canino tipo 1), CAV-2 (Adenovirus Canino tipo 2)

Virus vacunales	1era. dosis	2da. dosis	3era dosis	Revacunación
CPV2, CDV, CPIV, CAV-2, CAV-1, CCV, L. Canicola y L.icterohemorrhagiae	Vacuna Quíntuple	8 semanas	10 semanas	Cada 6-8 meses

Protocolo alternativo que se utiliza en clínicas de Monterrey y su área metropolitana. CPV2 (Parvovirus Canino), CDV (Virus del Distemper Canino), CPIV (Virus de la Parainfluenza Canina), CAV-2 (Adenovirus Canino Tipo 2), CAV-1 (Adenovirus Canino tipo 1), CAV-2 (Adenovirus Canino tipo 2), L. Canicola (*Leptospira canicola*), L. icterohemorrhagiae (*Leptospira icterohemorrhagiae*)

Vacunas comerciales utilizadas con mayor frecuencia.

Recombitek C6 (Merial)

Suspensión inyectable. Vacuna contra Moquillo, Hepatitis infecciosa canina causada por Adenovirus tipo 1, enfermedad respiratoria por Adenovirus tipo 2, Parainfluenza, Parvovirus y Leptospirosis canina.

Fracción liofilizada: Virus activos modificados de: Moquillo canino (CDV) recombinante en vector canarypox, Adenovirus canino (TIPO 2, CEPA TORONTO), virus de Parainfluenza canino (CEPA D-008), Parvovirus canino (CEPA 780916).

Fracción líquida: *Leptospira canicola* (CEPA 1503), *Leptospira icterohaemorrhagiae* (CEPA 1518).

Vacuna Vanguard® Plus 5 L4(Pfizer)

Virus vivo modificado y virus muerto. Cada dosis contiene un mínimo de 103.5 TCID50 de Virus del Distemper Canino, 103.4 TCID50 del Adenovirus Canino tipo 2, 105.5TCID50 de virus de la Parainfluenza Canina, CPV 107.2 TCID50 de Parvovirus canino, 600 Unidades Nefelométricas (UN) de *L. canicola*, 600 UN de *L. icterohaemorrhagiae*, 600 UN de *L. grippotyphosa* y 600 UN de *L. pomona*

Vacuna Puppy Jet N5 (Norvet)

Para la inmunización de: Moquillo canino (CDV), Virus de la Hepatitis Infecciosa Canina (CAV-1), Adenovirus tipo 2, Parvovirus Canino, Coronavirus Canino y Leptospira.

NOBIVAC® DHPPI+Lepto

Es una vacuna múltiple a virus activo atenuado y liofilizado para la prevención del moquillo (CDV), virus de la hepatitis canina (CAV-1), Parvovirus canino y contra las enfermedades respiratorias causadas por el Virus de la Parainfluenza tipo 2, así como Leptospira.

Cepa Onderstepoort (Virus del Distemper Canino)

Cepa C 154 (Parvovirus Canino) tecnología de clonación

Cepa Manhattan LPV3 (Adenovirus Canino tipo 2)

Cepa Cornell tipo 2 (Parainfluenza canina)

Leptospira Interrogans canicola Ca-12-000

L. icterohemorrhagiae 820K Bacterina inactivada