

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**DISTEMPER CANINO: CUANTIFICACIÓN VIRAL EN TEJIDO NERVIOSO,
MEDIANTE PCR DIGITAL Y EVALUACIÓN DE LAS LESIONES
MICROSCÓPICAS.**

Por

GODIÑO MORALES, Guillermo Jesús

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina veterinaria

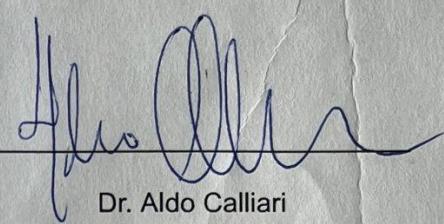
MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2025**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

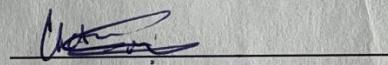
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



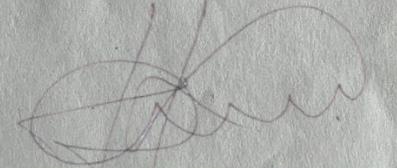
Dr. Aldo Calliari

Segundo miembro (Tutor):



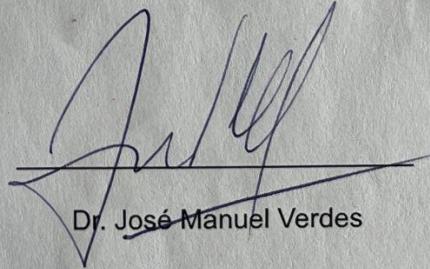
Dra. Victoria Iribarne Garay

Tercer miembro:



Dr. Luis Delucchi

Cuarto miembro

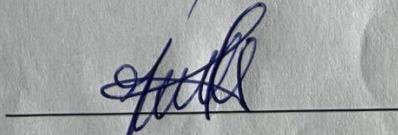


Dr. José Manuel Verdes

Fecha:

19/2/25

Autores:



Br. Guillermo Godíño

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer en primer lugar a mis padres, por su apoyo incondicional y por el incentivo constante hacia mi formación académica. Su motivación fue muy importante para concluir esta etapa de mi vida. A mi hermana y cuñado, por darme el mejor regalo que es mi sobrina Eimy, que trajo alegría a todos. También agradecerles por el apoyo constante, por estar siempre presente y ser una fuente de aliento en cada etapa de este camino.

A Melina, mi amor y mi gran apoyo, gracias por estar siempre a mi lado, por tu amor, tus consejos y esa forma tan tuya de acompañarme con el corazón. En cada paso de este camino estuviste presente, dándome fuerzas y celebrando cada pequeño logro como si fuera tuyo. Esta etapa no habría sido igual sin vos.

A mi tutora, Victoria, por su enorme dedicación, paciencia y por estar siempre ahí para guiarme en todo este proceso. Agradezco mucho su apoyo y disposición para seguir adelante a pesar de las dificultades que se iban presentando durante el trabajo.

A mi co-tutor, José, por su invaluable orientación, disposición y compromiso durante todo este proceso. Sin duda alguna su motivación y apoyo fueron fundamentales para culminar este trabajo.

También quisiera agradecer a Victoria Yozzi, por su compromiso y paciencia para lograr las mejores láminas, sin su habilidad y compromiso este trabajo no hubiera sido lo mismo.

A Camila Larrañaga, por dedicarme su tiempo y enseñarme el procesamiento de las muestras con tanta paciencia y compromiso.

A mis compañeros de trabajo de Patología, por su apoyo y colaboración durante las necropsias.

Por último y no menos importante, quisiera agradecer a mis compañeros de facultad que fueron parte de esta etapa de mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN:	1
AGRADECIMIENTOS	2
TABLA DE CONTENIDO	3
LISTA DE CUADROS	5
1. RESUMEN	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
4.1 Definición	11
4.2 Agente etiológico	11
4.3 Huéspedes	14
4.4 Patogénesis	15
4.4.1 Transmisión	15
4.4.2 Mecanismo de infección	15
4.4.3 Mecanismo de infección en el SNC	16
4.4.4 Manifestaciones clínicas	17
4.5 Prevención de la infección	17
4.6 Aspectos patológicos de la infección por CDV	18
4.6.1 Patología no nerviosa	18
4.6.2 Patología nerviosa	18
4.7 Diagnóstico	20
4.7.1 Diagnóstico clínico	20
4.7.2 Inmunocromatografía	20
4.7.3 Ensayos serológicos	20
4.7.4 Análisis microscópico mediante técnicas histológicas	21
4.7.4.1 Histopatología	21
4.7.4.2 Inmunohistoquímica (IHQ)	21
4.7.6 Pruebas moleculares para la detección del CDV	22
4.7.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR convencional)	22
4.7.6.2 PCR en tiempo real (qPCR)	23
4.7.6.3 Digital droplet PCR (DdPCR)	23
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS	25
6.1 Objetivo general	25
6.2 Objetivos específicos	25
7. MATERIALES Y MÉTODOS	26
7.1 Muestras de SNC de caninos infectados naturalmente con CDV.	26
7.2 Autopsia y obtención de las muestras	26
7.3 Procesamiento histológico	26
7.3.1 Selección de zonas para la evaluación de lesiones producidas por el CDV.	26
7.3.2 Obtención del bloque y lámina histológica	26
7.3.3 Hematoxilina y Eosina (H&E)	27
7.3.4 Luxol fast blue	27

7.3.5 Observación y Captura de imágenes de histológicas	27
7.3.6 Clasificación histopatológica de las lesiones asociadas al CDV	27
7.4 Procesamiento molecular	28
7.4.1 Extracción de ARN a muestras de cerebelo	28
7.4.2 RT - PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa precedida de Retro-Transcripción)	29
7.4.3 PCR convencional para amplificación del Gen N del CDV	29
7.4.4 Procesamiento de muestras mediante Droplet digital PCR para CDV	29
8. RESULTADOS	31
8.1 Descripción de casos clínicos	31
8.2 RT - PCR convencional	34
8.3 Cuantificación de la carga viral mediante Droplet digital PCR (ddPCR)	35
8.4 Evaluación de las lesiones microscópicas mediante H&E y LFB.	36
8.5. Análisis de resultados	41
8.5.1 Relación entre las lesiones histopatológicas con la edad, raza y el sexo	41
8.5.2 Comparación de la clasificación histopatológica con la carga viral	42
9. DISCUSIÓN	45
10. CONCLUSIÓN	52
11. BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE CUADROS

- Figura 1. Organización del genoma y del virión del CDV. a. Diagramas esquemáticos de la partícula del CDV en sección transversal: N: cadena de ARN, P: fosfoproteína, M: proteína de matriz, F: proteína de fusión, H: hemaglutinina, L: proteína polimerasa grande. b. Mapa del ARN genómico (3' a 5') del CDV (tomado de Rendon-Marin et., 2019). 12
- Figura 2. Replicación del ciclo del CDV. Se ilustra el reconocimiento de partículas virales por los receptores de la célula huésped (SLAM o nectina-4), la liberación de RNP al citoplasma, la replicación, el proceso de transcripción y la gemación de partículas virales (tomado de Rendon-Marin et al., 2019). 14
- Figura 3. Distribución de las edades de los caninos. Fueron agrupados según la frecuencia observada en cada rango de edad. 31
- Figura 4. Representación porcentual de las razas de caninos. Se destaca que la mayoría corresponde a mestizos, seguidos por las razas caniches y pitbull. 32
- Figura 5. Frecuencia de signos clínicos. Se representa en un gráfico de barras la presentación de los diferentes signos clínicos registrados en los casos analizados. 32
- Figura 6. Distribución de los signos neurológicos observados en los casos analizados. Se representa la frecuencia de cada signo neurológico identificado, destacando que las mioclonías fueron el hallazgo más común, los demás signos presentaron una frecuencia homogénea. 33
- Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. De izquierda a derecha: carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb), carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8: muestras positivas con un producto de amplificación específico de 287 pb, carril 9: control negativo, carril 10: control positivo mostrando banda correspondiente al mismo tamaño esperado. 34
- Figura 8. Gráfico 1D donde se observa un diagrama de dispersión de la ddPCR. Se observa el resultado de la ddPCR para las muestras estudiadas desde B05 –C07 y control negativo; control sin plantilla (NTC) (G07). En azul se observan las gotas positivas (eventos positivos) y en gris eventos negativos. La línea violeta indica el umbral de las señales positivas. 35
- Figura 9. Imágenes histológicas de cortes de cerebelo en un canino del grupo control. A) Sustancia blanca periventricular sin cambios observables. H&E. B) Sustancia blanca periventricular sin evidencia de desmielinización. LFB. C) Laminillas cerebelosas sin alteraciones ni desmielinización. LFB. Escala = 100 µm. 36
- Figura 10. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo de canino teñidas con H&E. A y B) Canino con lesión aguda en laminillas del cerebelo caracterizada por vacuolización focal (asterisco) en la sustancia blanca. C) Congestión vascular (flecha) y edema en sustancia blanca (asterisco). Escala = 1000 µm. 37
- Figura 11. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. A) Se observa lesión subaguda, donde se evidencia una región periventricular con desmielinización, evidenciada por áreas claras indicando la pérdida de mielina en el tejido nervioso (asterisco). Escala = 40 µm. 38
- Figura 12. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. Cuerpo de inclusión intranuclear (flecha) en parénquima cerebeloso. H&E, Escala = 100 µm. 38
- Figura 13. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 1 con leve desmielinización sustancia blanca (asterisco), escala = 40 µm. B) Obsérvese la desmielinización periventricular en sustancia blanca, caracterizada por una menor intensidad de la tinción azul (asterisco), escala = 100 µm. 39
- Figura 14. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 2 con foco de

desmielinización en sustancia blanca del cerebelo (asterisco), escala = 40 μ m. B)	39
Presencia de desmielinización en zona periventricular evidenciada por la pérdida de coloración azulada característica de la mielina (asterisco), escala = 100 μ m.	
Figura 15. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 3 con una extensa desmielinización en sustancia blanca del cerebelo (asterisco) escala = 40 μ m. B) Desmielinización severa en la región periventricular, caracterizada por una marcada pérdida de la coloración azulada representativa de la mielina (asterisco), escala = 100 μ m.	40
Figura 16. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. Animal del grupo crónico con necrosis en sustancia blanca (flecha) acompañado de manguitos perivasculares. escala = 40 μ m.	40
Figura 17. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo. A) Desmielinización entre las laminillas del cerebelo en sustancia blanca (asterisco). H&E. escala = 40 μ m. B) La desmielinización se identifica por la pérdida de coloración azulada característica de la mielina. LFB, escala = 40 μ m. C) Se observa manguito perivascular en el parénquima cerebral (flecha). H&E, escala = 100 μ m.	41
Figura 18. Gráfico de carga viral (copias/ reacción) para los niveles de clasificación histopatológica. En el eje X se representan las categorías de la clasificación histopatológica (Subagudo 1, Subagudo 2, Subagudo 3, Crónico y Agudo), mientras que en el eje Y se muestra la carga viral expresada en copias por reacción.	44
Tabla 1. Resumen de los signos clínicos antemortem compatibles con CDV	33
Tabla 2. Análisis de la carga viral en las muestras de cerebelo. La tabla presenta el promedio de la carga viral (copias/20 μ L) junto con sus respectivas medidas estadísticas: media, desvío estándar (SD), y coeficiente de variación (CV).	35
Tabla 3. Hallazgos histopatológicos, carga viral mediante ddPCR y cuadro clínico en casos de CDV	42

1. RESUMEN

El virus del Distemper Canino (CDV) provoca una enfermedad infecciosa de alta mortalidad conocida como Distemper o moquillo canino, que afecta a los caninos domésticos como a diversas especies de fauna silvestre. Esta enfermedad se manifiesta con signos clínicos relacionados con daños en el aparato respiratorio, digestivo, tegumentario y/o en el sistema nervioso central (SNC). La afectación del SNC genera una patología severa, caracterizada por desmielinización, cuya evolución puede conducir a la muerte de un elevado porcentaje de los pacientes. La cuantificación de partículas virales es fundamental en la investigación, el desarrollo de vacunas, la terapéutica y otras aplicaciones biotecnológicas. En este contexto, la droplet digital PCR (ddPCR) representa una tecnología innovadora que permite una cuantificación absoluta con alta sensibilidad y precisión, aunque su uso sigue siendo limitado en los laboratorios de diagnóstico veterinario. El objetivo de este estudio fue cuantificar la carga viral en el cerebelo de caninos infectados de manera natural, utilizando ddPCR, y correlacionar estos resultados con las lesiones microscópicas observadas. Para esto se partió de 20 casos de infección natural producida por el CDV, y luego de la eutanasia o muerte espontánea de los pacientes, se procedió a su autopsia completa, toma de muestras para histopatología en formol tamponado (pH = 7,4) al 10%, en las que posteriormente se realizó el estudio histopatológico, muestreando simultáneamente para realizar el diagnóstico molecular por PCR. En el estudio histopatológico del SNC, se encontraron las típicas lesiones de la infección por CDV, siendo la zona con lesiones más severas el cerebelo y el tronco encefálico. En esta región, además de la H&E, se realizó la técnica de histoquímica (Luxol fast blue). Las PCR y la PCR digital en gota se hicieron a partir de las muestras contralaterales congeladas a -80°C. Sobre la base de las lesiones se estableció la clasificación por curso: agudo, subagudo 1, 2, 3 y crónico. Los resultados revelaron que el 65% de los casos presentaron lesiones subagudas caracterizadas por desmielinización multifocal y manguitos perivasculares. La cuantificación mediante ddPCR permitió determinar con alta precisión la carga viral en el cerebelo, demostrando que el cerebelo presenta altas carga viral. Además se observó una correlación positiva y moderada entre la carga viral y la escala de daño histopatológico, evidenciando que un incremento en la carga viral se asocia de manera significativa ($p = 0.02966$) con un mayor grado de lesión en el cerebelo, clasificado como daño crónico.

El desarrollo de este estudio remarca la utilidad de la ddPCR como herramienta innovadora para el diagnóstico y cuantificación del CDV, y reafirma la importancia del cerebelo como sitio clave en la patogénesis del virus. Los hallazgos subrayan la necesidad de fortalecer las estrategias de vacunación para prevenir esta enfermedad en la población canina.

2. SUMMARY

The Canine Distemper Virus (CDV) causes a highly lethal infectious disease known as distemper or canine distemper, which affects both domestic dogs and various species of wildlife. This disease presents with clinical signs associated with damage to the respiratory, digestive, integumentary systems and/or the central nervous system (CNS). CNS involvement results in a severe pathology characterized by demyelination, whose progression can lead to the death of a high percentage of patients. The quantification of viral particles is essential in research, vaccine development, therapy, and other biotechnological applications. In this context, droplet digital PCR (ddPCR) represents an innovative technology that enables absolute quantification with high sensitivity and precision, although its use remains limited in veterinary diagnostic laboratories. The aim of this study was to quantify the viral load in the cerebellum of naturally infected dogs using ddPCR and to correlate these results with the observed microscopic lesions. The study was based on 20 cases of natural infection caused by CDV, and after euthanasia or spontaneous death of the patients, a complete autopsy was performed. Samples were collected for histopathology in 10% buffered formalin (pH = 7.4), followed by histopathological examination, with simultaneous sampling for molecular diagnosis by PCR. In the histopathological study of the CNS, typical lesions of CDV infection were found, with the cerebellum and brainstem being the most severely affected areas. In this region, in addition to H&E, the histochemical technique (Luxol fast blue) was performed. PCR and droplet digital PCR were carried out from contralateral samples frozen at -80°C. Based on the lesions, a classification by disease course was established: acute, subacute 1, 2, 3, and chronic. The results revealed that 65% of the cases presented subacute lesions characterized by multifocal demyelination and perivascular cuffs. Quantification by ddPCR allowed for high-precision determination of viral load in the cerebellum, showing that the cerebellum harbors high viral loads. Furthermore, a positive and moderate correlation was observed between viral load and the histopathological damage scale, indicating that an increase in viral load is significantly associated ($p = 0.02966$) with a higher degree of cerebellar damage, classified as chronic damage.

The development of this study highlights the usefulness of ddPCR as an innovative tool for the diagnosis and quantification of CDV, and reaffirms the importance of the cerebellum as a key site in the pathogenesis of the virus. The findings underscore the need to strengthen vaccination strategies to prevent this disease in the canine population.

3. INTRODUCCIÓN

El Distemper canino (DC) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta principalmente a los caninos domésticos y puede transmitirse a diversas especies de fauna silvestre (Karki et al., 2022). Es causado por el virus del Distemper canino (CDV), un miembro del género *Morbillivirus*, y su transmisión ocurre principalmente a través de aerosoles o por contacto directo con secreciones corporales infectadas (Lempp et al., 2014; Loots et al., 2017).

La enfermedad fue registrada por primera vez en España en 1761 y, desde entonces, se cree que se ha propagado globalmente (Karki et al., 2022). Edward Jenner fue el primero en referirse a esta afección como "moquillo canino", mientras que, en 1905, Carré realizó el primer estudio sobre su agente causal (Appel & Robson, 1973; Karki et al., 2022).

El CDV presenta un marcado tropismo que provoca lesiones en los sistemas respiratorio, gastrointestinal y nervioso (Beineke et al., 2009; Martella et al., 2008). Tras la infección, el curso clínico del DC varía desde infecciones subclínicas hasta manifestaciones graves con altas tasas de mortalidad, que dependen de la virulencia de la cepa viral y el estado inmunológico del hospedador (Summers et al., 1984).

Los signos clínicos suelen ser inespecíficos y la gran mayoría son compartidos con otros agentes virales o bacterianos (Demeter et al., 2007; Loots et al., 2017). Estos incluyen síntomas respiratorios, como rinitis, secreción nasal serosa o purulenta, tos; en el sistema digestivo, vómitos, diarrea y deshidratación. En el sistema nervioso, los signos, que típicamente emergen entre 20 y 50 días post infección, incluyen mioclonías, ataxia, cambios de comportamiento, convulsiones y déficits neurológicos progresivos (Amude et al., 2007; Beineke et al., 2009; Martella et al., 2008).

Una característica distintiva del CDV es su capacidad para inducir inmunosupresión severa, predisponiendo al hospedador a infecciones secundarias y complicaciones neurológicas graves (Beineke et al., 2009). En el sistema nervioso central, las lesiones más relevantes incluyen polioencefalitis y leucoencefalitis desmielinizante (CDV-DL), que afectan principalmente la sustancia blanca del cerebro y cerebelo, provocando inflamación, necrosis y desmielinización (Beineke et al., 2009; Vandervelde et al., 1981). En tejidos periféricos, el virus genera lesiones como bronconeumonía, enteritis catarral, dermatitis pustular y cambios como hiperqueratosis nasal y plantar (Beineke et al., 2009; Caswell & Williams, 2007).

El diagnóstico clínico del DC, se basa en la identificación de signos compatibles, aunque la diversidad de manifestaciones dificulta la diferenciación de otras enfermedades infecciosas, como el coronavirus canino, el parvovirus canino o infecciones bacterianas (Loots et al., 2017; Tipold et al., 1992). El test de inmunocromatografía (IC) es una herramienta clave en el diagnóstico temprano dado que permite un diagnóstico rápido y sencillo, con una buena sensibilidad y especificidad (An et al., 2008; Kim et al., 2006).

Entre las herramientas de laboratorio, los estudios serológicos, como ELISA o pruebas de neutralización, permiten evaluar la respuesta inmune del hospedador, aunque no diferencian entre infecciones naturales y vacunales (Loots et al., 2017). El aislamiento viral mediante líneas celulares, como las Vero Dog-SLAM, sigue siendo

útil para la caracterización del virus, aunque su uso es limitado por la complejidad del procedimiento (Seki et al., 2003; Tatsuo et al., 2001).

La histopatología es esencial para caracterizar las lesiones típicas, como desmielinización y cuerpos de inclusión intracelulares, especialmente en el sistema nervioso central (Baumgärtner et al., 1989; Vandevelde et al., 1981). La inmunohistoquímica complementa este enfoque al identificar antígenos virales en tejidos afectados. Paralelamente, las técnicas moleculares, como RT-PCR y qPCR, ofrecen alta sensibilidad y especificidad para confirmar la presencia del virus y cuantificar su carga viral, incluso en muestras biológicas (Elia et al., 2006; Frisk et al., 1999; ; Saito et al., 2006; Shen et al., 1981). Entre las innovaciones tecnológicas destaca la digital droplet PCR (ddPCR), una técnica de última generación que permite detectar y cuantificar con alta sensibilidad la carga viral. Esto es posible gracias a la fragmentación de la muestra en nanogotas, cada una representando una reacción individual en una emulsión de aceite (Quan et al., 2018).

Con base en estos antecedentes, en este ensayo experimental presentado como tesis se planea utilizar ddPCR para cuantificar la carga viral de CDV en muestras de cerebelo de caninos infectados naturalmente y correlacionar estos hallazgos con el daño histopatológico. Este enfoque contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos de la enfermedad y a la mejora de las estrategias diagnósticas.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Definición

El Distemper canino (DC) es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa de origen viral, causado por el virus del Distemper canino (CDV), miembro del género *Morbillivirus* en la familia *Paramyxoviridae*. Este virus afecta a un amplio rango de carnívoros, incluyendo caninos domésticos y salvajes, felinos y otras especies de fauna silvestre (Osterhaus et al., 1995; Summers & Appel, 1994). Se caracteriza por su tropismo multisistémico, afectando el sistema linfático, respiratorio, gastrointestinal, nervioso central y epitelial (Deem et al., 2000; Martella et al., 2008). Su transmisión es principalmente por contacto directo con secreciones corporales infectadas, como las nasales y oculares, o por aerosoles (Lempp et al., 2014).

Presenta un curso clínico variable, desde infecciones subclínicas hasta manifestaciones multisistémicas severas que pueden incluir síntomas respiratorios, gastrointestinales, cutáneos y neurológicos. La gravedad de la enfermedad está influenciada por factores como la edad, el estado inmunológico del hospedador y la virulencia de la cepa involucrada (Summers et al., 1984).

El diagnóstico del DC combina diferentes enfoques para asegurar resultados precisos. Por un lado, se utilizan técnicas como la histopatología y la inmunohistoquímica para observar los cambios en los tejidos afectados. Por otro lado, los métodos moleculares, como la amplificación de genes específicos, permiten confirmar la presencia del virus de manera directa (Frisk et al., 1999). Además, estudios filogenéticos y epidemiológicos ayudan a identificar las cepas del virus en circulación y a entender cómo se propaga la enfermedad en distintas regiones (McCarthy et al., 2007; Woma et al., 2010).

4.2 Agente etiológico

El CDV, también conocido como *Morbillivirus canino*, perteneciente al orden *Mononegavirales*, a la familia *Paramyxoviridae* y es parte del género *Morbillivirus*, los miembros de este género incluyen otros patógenos altamente contagiosos y de gran importancia, tales como, el virus del sarampión (MeV), el virus de la peste bovina (RPV), el virus de la peste de los pequeños rumiantes (PPRV), el virus del moquillo focino (PDV), el *Morbillivirus* de los cetáceos (CeMV) y el recientemente descubierto *Morbillivirus felino* (FeMV), todos ellos con un impacto significativo en la salud animal y humana (Maes et al., 2019). Es un virus pleomórfico, posee una envoltura lipídica, que tiene un diámetro de aproximadamente 150 nm, que incluyen a un ARN monocatenario negativo no segmentado (ssRNA), similares a los otros miembros del orden *Mononegavirales* (Rendon-Marin et al., 2019). El genoma contiene 15.690 nucleótidos en toda su longitud y codifica para las siguientes proteínas: hemaglutinina (H), fusión (F), matriz (M), fosfoproteína (P), polimerasa grande (L) y nucleocápside (N) y también se identifican otras proteínas accesorias como las proteínas C y V, que generalmente se presentan como unidades transcripcionales adicionales dentro del gen P (Beineke et al., 2009; da Fontoura & von Messling, 2016; Diallo, 1990; Hall et al., 1980; Rendon-Marin et al., 2019). La estructura del genoma del CDV (**Figura 1**) incluye seis unidades de transcripción organizadas de forma lineal, que están separadas por regiones intergénicas no traducidas (UTR) que son relativamente uniformes en longitud, con la excepción de la UTR entre el gen de la matriz (M) y el gen de fusión (F) (Kolakofsky et al., 2016; Rendon-Marin et al., 2019). Esas unidades de transcripción contribuyen a la formación de las ocho

proteínas mencionadas anteriormente. Sin embargo, el gen P codifica las proteínas C y V, utilizando un marco de lectura abierto superpuesto (ORF) y edición de ARN mediante la inserción de un residuo G no moldeable durante la síntesis de ARNm, respectivamente (Cattaneo et al., 1989; da Fontoura & von Messling, 2016; Rendon-Marin et al., 2019).

Todas las proteínas del virus del CDV desempeñan funciones específicas en su ciclo viral y replicación. La proteína de la nucleocápside (N) encapsula el ARN genómico y, según la expresión del gen, actúa como plantilla para la transcripción y replicación mediadas por la polimerasa viral (L) y su cofactor, la fosfoproteína (P). Estas proteínas, junto con el ARN viral, conforman el complejo ribonucleoproteína (RNP) (von Messling et al., 2001). La envoltura viral del CDV incluye dos proteínas integrales de membrana: la proteína de fusión (F) y la hemaglutinina (H), además de una proteína asociada a la membrana (M), que facilita el contacto con la RNP y participa en la formación de la envoltura viral durante el proceso de gemación en la membrana de la célula huésped (da Fontoura & von Messling, 2016; Rendon-Marin et al., 2019).

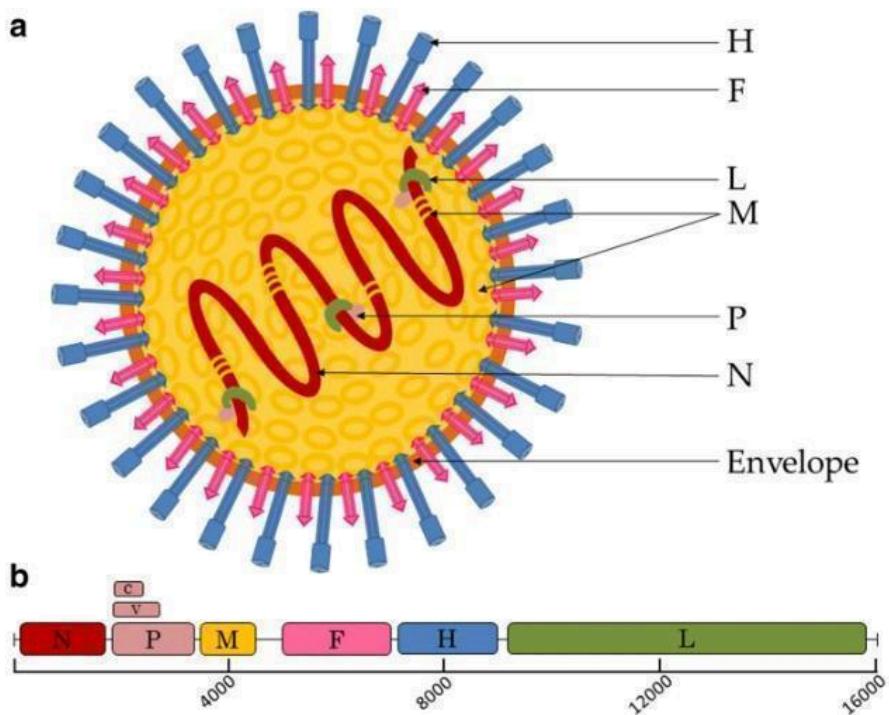


Figura 1. Organización del genoma y del virión del CDV. a. Diagramas esquemáticos de la partícula del CDV en sección transversal: N: cadena de ARN, P: fosfoproteína, M: proteína de matriz, F: proteína de fusión, H: hemaglutinina, L: proteína polimerasa grande. b. Mapa del ARN genómico (3' a 5') del CDV (tomado de Rendon-Marin et al., 2019).

El CDV utiliza estrategias de replicación y transcripción similares a las de otros miembros del orden *Mononegavirales* (Moss et al., 2006) (Figura 2). Antes de iniciar su ciclo de replicación, el CDV debe reconocer y unirse a los receptores de la célula huésped mediante sus proteínas integrales de membrana, F y H. Estas proteínas permiten al virus superar la membrana plasmática, considerada la primera barrera de defensa celular, mediante un complejo heterooligomérico formado por una hemaglutinina (H) tetramérica y una proteína de fusión (F) trimérica, las mismas desempeñan funciones clave en el reconocimiento, unión y fusión del virus con la

célula huésped. Se produce la unión a receptores específicos en la superficie de la célula huésped mediante la hemaglutinina (H). En células inmunitarias, el receptor principal es SLAM (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule*, también conocido como CD150) (Tatsuo et al., 2000), mientras que en células epiteliales el receptor es nectina-4 (Mühlebach et al., 2011). Tras la unión al receptor, se producen cambios conformacionales en la hemaglutinina y en la proteína de fusión (F), facilitando la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de la célula huésped. Este proceso permite la liberación del RNP en el citoplasma celular (Plattet et al., 2005). Una vez en el citoplasma, el genoma viral de ARN de cadena negativa es transcrita por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral para generar ARNm virales. Estos ARNm son traducidos por los ribosomas celulares para producir las proteínas virales necesarias para la replicación y ensamblaje del virus (Barrett et al., 1999). El genoma viral se replica a través de la síntesis de una cadena complementaria de ARN positivo, que sirve como plantilla para la producción de nuevos genomas de ARN negativo. Este proceso es mediado por el complejo de replicación viral, asegurando la generación de copias genómicas para las partículas virales hijas (Whelan et al., 2004). Seguidamente de la replicación, las glicoproteínas virales H y F son sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas al aparato de Golgi para su procesamiento y glicosilación. Posteriormente, se dirigen a la membrana plasmática, donde se ensamblan con los RNP virales recién formados, preparando la formación de nuevas partículas virales (Cathomen et al., 1998). Por último, las partículas virales completas son liberadas de la célula huésped mediante un proceso de gemación. Este proceso permite al virus adquirir su envoltura lipídica y propagarse a células adyacentes (Rendon-Marin et al., 2019).

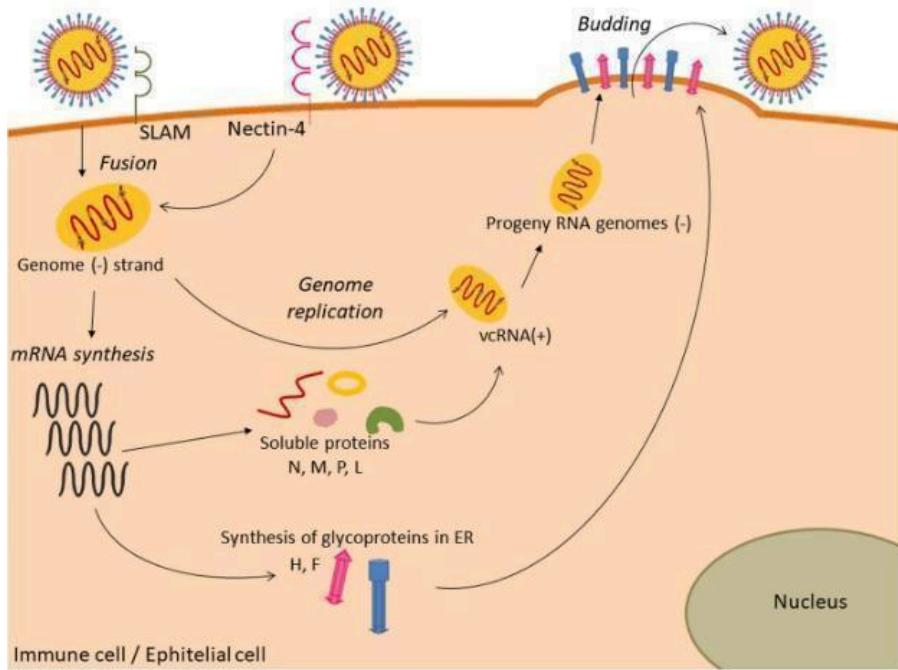


Figura 2. Replicación del ciclo del CDV. Se ilustra el reconocimiento de partículas virales por los receptores de la célula huésped (SLAM o nectina-4), la liberación de RNP al citoplasma, la replicación, el proceso de transcripción y la gemación de partículas virales (tomado de Rendon-Marin et al., 2019).

4.3 Huéspedes

Históricamente el CDV ha afectado a una amplia gama de huéspedes dentro del orden *Carnívora*. Entre sus hospedadores tradicionales se encuentran familias como *Canidae* (caninos domésticos, zorros, chacales), *Procyonidae* (mapaches), *Mustelidae* (hurones, visones), *Mephitidae* (zorillo), *Hyaenidae* (hienas), *Ailuridae* (pandas), *Viverridae* (civetas), *Ursidae* y *Viverridae* y *Felidae* (gatos domésticos y grandes felinos), pero además afecta a la familia *Tayassuidae* (Amundson & Yuill 1981; Appel & Summers, 1995; Loots et al., 2017; Roelke-Parker et al., 1996; Uhl et al., 2019).

Los caninos domésticos son los principales animales afectados por la enfermedad, por otra parte, como se mencionó anteriormente otras especies pertenecientes al orden *Carnívora* también son susceptibles a la infección por CDV y la mortalidad varía mucho entre especies (Appel & Summers, 1995). Particularmente en caninos domésticos, presenta la segunda tasa de mortalidad más alta de enfermedades infecciosas en caninos domésticos, después de la rabia (Appel & Summers, 1995). La susceptibilidad a la infección está relacionada con la edad, los cachorros son más vulnerables que los caninos de mayor edad, dado que los cachorros jóvenes están protegidos por inmunidad pasiva proveniente de la madre, pero aumenta la susceptibilidad cuando cesa la inmunidad pasiva transmitida por la madre (dos Santos et al., 2016). La mayoría de los caninos adultos están protegidos por inmunización con vacunas (Martella et al., 2008) siendo más susceptibles a la infección aquellos caninos no vacunados (Tipold et al., 1992).

Existen reportes a nivel mundial de brotes causados por el CDV que amenazan la fauna silvestre, en 1994 un brote devastador de DC en el Parque Nacional del Serengueti, Tanzania, impactó a los grandes felinos, reduciendo drásticamente la población de leones (*Panthera leo*) y afectando a otras especies como chacales y hienas moteadas (*Crocuta crocuta*) (Roelke-Parker et al., 1996). Eventos similares ocurrieron previamente en zoológicos de América del Norte entre 1991 y 1992, donde tigres y leopardos presentaron la enfermedad (Appel et al., 1994). En 1989, surge un brote en pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en el sur de Arizona, Estados Unidos, donde los ejemplares presentaban signos clínicos compatibles con la infección natural por CDV y posteriormente se pudo evidenciar la presencia de antígenos virales en neuronas (Appel et al., 1991). Posteriormente, entre 1993 y 1996, se realizaron estudios serológicos para evaluar la prevalencia de la infección en esta especie y evidenciaron la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el CDV (Noon et al., 2003). Otro informe publicado en 2016 reportó un brote reciente de infección por CDV en pandas gigantes (*Ailuropoda melanoleuca*) en China, una especie en peligro de extinción. De los seis pandas afectados, cinco fallecieron, mientras que el único superviviente había recibido previamente la vacuna contra el CDV (Feng et al., 2016).

4.4 Patogénesis

4.4.1 Transmisión

El CDV es un patógeno altamente contagioso que se transmite con facilidad entre huéspedes susceptibles, ya sea por contacto directo o a través de fluidos y exudados orales, respiratorios y oculares en forma de aerosoles. Durante la fase aguda de la infección, el virus también puede encontrarse en otras excreciones y secreciones corporales, como la orina, las heces e incluso la piel (Loots et al., 2017). La eliminación viral puede producirse tanto en animales con signos clínicos como en aquellos subclínicos, y puede extenderse hasta 90 días tras la infección. Sin embargo, el pico de excreción viral ocurre durante la fase aguda, que dura entre 1 y 2 semanas, siendo las principales fuentes de infección el aire, el agua y los alimentos contaminados (dos Santos et al., 2016; Loots et al., 2017).

La propagación del CDV depende en gran medida de la proximidad entre animales infectados y susceptibles, lo que facilita su transmisión. En este contexto, los caninos domésticos (*Canis familiaris*) desempeñan un papel clave como reservorios primarios debido a su amplia distribución, siendo también vectores importantes para la transmisión de CDV (Alexander et al., 2010; Flacke et al., 2013; Loots et al., 2017).

4.4.2 Mecanismo de infección

El CDV es un patógeno que tiene la capacidad de infectar tres tipos diferentes de células huésped, incluidas las células epiteliales, linfoides y del sistema nervioso (Rendon-Marin et al., 2019). Su transmisión en caninos domésticos es a través de la vía oronasal, mediante la inhalación de aerosoles contaminados (Ludlow et al., 2014). El período de incubación puede variar entre 1 y 4 semanas y las presentaciones clínicas abarcan desde cuadros asintomáticos hasta formas graves con una mortalidad cercana al 50% en casos severos (Schwab et al., 2007; Beineke et al., 2009). Una vez inhalado, el virus se replica inicialmente en los tejidos linfoides del tracto respiratorio, infectando principalmente a los macrófagos presentes en dichos tejidos (Lempp et al., 2014; Vandervelde & Zurbriggen, 2005). Estos macrófagos transportan el virus hacia las amígdalas y los nódulos linfáticos bronquiales (Lempp et al., 2014). Posteriormente, se genera una viremia primaria

que facilita la propagación del patógeno hacia otros órganos linfoides y hematopoyéticos, incluyendo el timo, el bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea, donde inducen linfopenia severa e inmunosupresión prolongada (Beineke et al., 2009). Este proceso afecta principalmente a los linfocitos CD4+, que experimentan apoptosis inducida por el virus, mientras que los linfocitos CD8+ se ven menos afectados y muestran una recuperación más rápida (Tipold et al., 2001). La inmunosupresión generada predisponde al huésped a infecciones bacterianas secundarias (Beineke et al., 2009). En ausencia de una respuesta inmune antiviral efectiva, el virus entra en una fase de viremia secundaria, donde se disemina a múltiples tejidos epiteliales, mesenquimales y al SNC (Lempp et al., 2014; Miele et al., 1983). En esta etapa, el CDV infecta una amplia variedad de células dianas, incluyendo epiteliales bronquiales y gastrointestinales, queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales y neuroectodérmicas (Baumgärtner et al., 1989; Beineke et al., 2009). La presencia del virus en tejidos linfoides, epiteliales y el SNC refleja su capacidad para inducir una enfermedad multisistémica, cuya severidad depende de factores como la virulencia de la cepa viral y la respuesta inmune del huésped (Ludlow et al., 2014; Miele et al., 1983; Summers et al., 1984). La afectación del SNC representa la complicación más grave, que a menudo ocurre en paralelo o posteriormente a las demás afecciones sistémicas y están asociados con una variedad de síndromes neurológicos de mal pronóstico (Vandevalde & Zurbriggen, 2005).

4.4.3 Mecanismo de infección en el SNC

La principal vía de neuroinvasión del CDV es la hematogena, atravesando la barrera hematoencefálica (BHE) mediante linfocitos y células mieloides infectadas que transportan el virus hacia el SNC, donde se libera e infecta células epiteliales y endoteliales locales (Frisk et al., 1999; Laksono et al., 2021; Mutinelli et al., 1989; Rudd et al., 2006). Existe la hipótesis de que los linfocitos infectados pueden llevar el virus al SNC y transmitirlo a la microglía, donde, en la mayoría de los casos, puede ser controlado el sistema inmunológico del huésped, aunque en ciertas situaciones el virus puede adquirir mutaciones hiperfusogénicas que le permiten propagarse de la microglia a las neuronas y posteriormente de neurona a neurona (Laksono et al., 2021). La infección del endotelio en el SNC podría preceder al tráfico de leucocitos infectados y en las primeras etapas del proceso se han identificado células virales en el plexo coroideo y en los vasos cerebrales, lo que sugiere que el virus se disemina por diferentes rutas (Axthelm y al., 1987; Feijóo et al., 2021; Summers et al., 1979). Otro mecanismo de propagación involucra el avance del virus desde las células de la piámadre hacia la sustancia gris subpial (Baumgärtner et al., 1989; Beineke et al., 2009; Feijóo et al., 2021), mientras que dentro del cerebro utiliza el líquido cefalorraquídeo (LCR) para diseminarse, infectando células ependimarias, gliales y neuronas (Rudd et al., 2006; Vandevalde & Zurbriggen, 2005).

En hurones se ha identificado una vía alternativa en la que el virus accede al SNC a través del nervio olfatorio tras invadir las neuronas de la mucosa olfatoria, extendiéndose hacia los glomérulos olfatorios y propagándose a estructuras más profundas, aunque aún no está claro si este mecanismo ocurre en caninos domésticos (Laksono et al., 2021; Rudd et al., 2006).

El receptor SLAM, clave en la replicación viral, presenta una expresión limitada en el SNC, lo que sugiere que podrían existir otros receptores aún no identificados que faciliten la invasión de las células neuronales (Ludlow et al., 2014; Noyce et al.,

2013; Pratakpiriya et al., 2012). Aunque no se ha determinado si la microglia, al igual que los macrófagos, expresan este receptor, estudios recientes sugieren que su expresión en estas células podría ser inducible (Bispo et al., 2017; Laksono et al., 2021).

4.4.4 Manifestaciones clínicas

Clínicamente, las manifestaciones del CDV pueden clasificarse en formas catarrales, nerviosas o combinadas, con una fase sistémica aguda y una forma nerviosa crónica (Beineke et al., 2009; Rendón-Marín et al., 2019).

En la fase aguda, el virus está presente en todas las secreciones y excreciones corporales, asociándose con signos inespecíficos (Loots et al., 2017; Wright et al., 1974). También se pueden observar exantema cutáneo, secreción nasal y ocular serosa o purulenta, conjuntivitis, y progresión a signos respiratorios y gastrointestinales (Beineke et al., 2009; Martella et al., 2008). En esta etapa, los signos clínicos pueden confundirse con los causados por otros agentes virales, como el virus de Parainfluenza canino, Adenovirus canino tipo 2 (CAV-2) o Coronavirus respiratorio canino (CCoV) (Demeter et al., 2007). Las infecciones bacterianas secundarias suelen agravar estas manifestaciones. Además, pueden aparecer hiperqueratosis nasal y de las almohadillas plantares, hipoplasia del esmalte y pústulas dérmicas (Martella et al., 2008).

Los signos neurológicos, que tienden a manifestarse entre 20 y 50 días después de la infección, y son de carácter progresivos (Martella et al., 2008). Incluyen alteraciones corticales, como cambios en el comportamiento, marcha compulsiva y convulsiones; déficits vestibulares, como nistagmo, estrabismo e inclinación de la cabeza; y déficits cerebelosos, como ataxia e hipermetría. También pueden presentarse reflejo de amenaza disminuido, tetraparesia, tetraplejía y mioclonias (Amude et al., 2007; Beineke et al., 2009).

Aunque el virus se elimina gradualmente de la mayoría de los órganos y de la sangre periférica, puede persistir en tejidos como la úvea, el SNC, los órganos linfoides y las almohadillas plantares (Rendón-Marín et al., 2019; Schobesberger et al., 2005). En etapas avanzadas, la persistencia del CDV en el SNC induce desmielinización aguda o crónica, causando contracciones musculares involuntarias, presión de la cabeza contra objetos y movimientos descoordinados (Martella et al., 2008). La infección del SNC suele ser mortal, la gran mayoría de los caninos no sobreviven y aquellos que lograron recuperarse pueden presentar déficits neurológicos de por vida (Amude et al., 2007; Rendón-Marín et al., 2019).

4.5 Prevención de la infección

Una estrategia eficaz contra la infección por CDV es la vacunación (Loots et al., 2017; Martella et al., 2008). En la década de 1960, se desarrollaron dos vacunas de virus vivos modificados (MLV) contra el CDV. La primera, conocida como vacuna Onderstepoort, se derivó de un aislamiento natural adaptado a embriones de pollo y más tarde a cultivos de células de pollo (Haig, 1953). La segunda, basada en la cepa Rockborn, fue adaptada a células de riñón canino (Rockborn, 1959). Aunque estas vacunas son eficaces para manejar el CDV en caninos domésticos, en casos raros pueden causar encefalitis post vacunación (Hartley, 1974). Las vacunas de virus vivos modificados, como Onderstepoort, Rockborn y Snyder Hill, generan una inmunidad protectora de larga duración y son recomendadas para la inmunización de los caninos domésticos (Martella et al., 2008). En los últimos años se ha

introducido una vacuna recombinante viral contra el CDV que ha demostrado ser segura y eficaz, ya que el vector viral no se replica eficientemente en mamíferos (Pardo et al., 1997).

Un desafío importante en cachorros es la interferencia de los anticuerpos maternos, que pueden impedir la inmunización activa. Para superar esto, se recomienda administrar la vacuna MLV contra CDV a las 6-8 semanas de edad y repetir la dosis cada 2-4 semanas hasta completar la serie (Martella et al., 2008). La Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales (WSAVA) establece que las vacunas esenciales para perros incluyen las que protegen CDV, el CAV-1 y el CPV-2. Estas directrices destacan la necesidad de personalizar los esquemas de vacunación según el riesgo epidemiológico y el estilo de vida de cada animal, asegurando una inmunización adecuada incluso en poblaciones con anticuerpos maternos persistentes.

Aunque la vacunación es la herramienta útil para prevenir la infección del CDV, existen diversos reportes de casos de caninos domésticos infectados de forma natural por el CDV a pesar de estar vacunados y se reporta que la incidencia de la enfermedad inducida por CDV está aumentando en caninos vacunados en todo el mundo (Anis et al., 2018; Budaszewski et al., 2014; Feijóo et al., 2021; Galán et al., 2014; Lan et al., 2006; Richards et al., 2011; Riley & Wilkes, 2015; Sarute et al., 2014). Dicha infección puede estar ocasionada porque en algunas regiones del mundo tienen una vacunación reducida o incompleta en las poblaciones de caninos domésticos, como ocurre frecuentemente en algunas regiones de Sudamérica, la inmunidad de grupo es insuficiente, lo que incrementa la incidencia de la infección natural con posterior desarrollo de la enfermedad clínica producida por el CDV incluso en animales previamente vacunados debido a una mayor exposición al virus (Riley & Wilkes, 2015).

4.6 Aspectos patológicos de la infección por CDV

Tras la diseminación del virus, se observan antígenos virales y lesiones asociadas, incluidas inclusiones citoplasmáticas e intranucleares, en múltiples órganos (Beineke et al., 2009).

4.6.1 Patología no nerviosa

En el sistema respiratorio, las lesiones incluyen rinitis serosa a mucopurulenta, neumonía intersticial y bronquiolitis necrotizante. Estas lesiones se complican frecuentemente con bronconeumonía supurativa secundaria a infecciones bacterianas (Beineke et al., 2009; Caswell y Williams, 2007). En el sistema digestivo, la infección provoca enteritis catarral con un marcado agotamiento de las placas de Peyer (Beineke et al., 2009; Decaro et al., 2004; Krakowka et al., 1987).

Las lesiones cutáneas incluyen una dermatitis pustular conocida como exantema de moquillo, localizada en los muslos, abdomen ventral y la superficie interna de los pabellones auriculares (Maeda et al., 1994).

El CDV también afecta el desarrollo de los dientes permanentes al infectar los brotes dentales y los ameloblastos, lo que resulta en hipoplasia del esmalte (Beineke et al., 2009).

4.6.2 Patología nerviosa

La infección por el CDV puede ocasionar diversas lesiones en SNC, manifestándose en varias formas clínicas de la enfermedad. Una de las manifestaciones más

relevantes es la polioencefalitis, que abarca la encefalitis del perro viejo (ODE), la encefalitis postvacunal (PVE) y la encefalitis con cuerpos de inclusión. La PVE, asociada a la administración de vacunas con virus vivos modificados, se caracteriza por necrosis neuronal, infiltrados mononucleares perivasculares y la presencia de cuerpos de inclusión intraneuronales. Por otro lado, la encefalitis del perro viejo (ODE) es una condición rara que afecta a perros adultos inmunocompetentes y parece estar vinculada a la persistencia de un virus defectuoso en su capacidad de replicación (Lempp et al., 2014). En general, la polioencefalitis por CDV predomina en áreas corticales y núcleos del tronco encefálico, afectando principalmente a las neuronas y los astrocitos protoplásicos (Beineke et al., 2009; Nessler et al., 1999).

La leucoencefalitis desmielinizante asociada al CDV (CDV-DL) constituye una de las manifestaciones más frecuentes y devastadoras de la infección por este virus en el SNC, que puede presentarse al mismo momento que las manifestaciones sistémicas o posteriormente (Lempp et al., 2014). A diferencia con la polioencefalitis, que afecta principalmente a la materia gris, la CDV-DL se caracteriza por producirse lesiones predominantemente en la sustancia blanca, lo que la convierte en un modelo relevante para estudiar enfermedades desmielinizantes inmunomediadas en humanos, como es el caso de la esclerosis múltiple (Beineke et al., 2009).

La enfermedad suele iniciarse con una infección en la sustancia gris, seguida por la propagación del virus hacia la sustancia blanca, un proceso que se correlaciona estrechamente con las alteraciones neuropatológicas observadas en cada etapa de la infección (Lempp et al., 2014). Las lesiones de CDV-DL afectan predominantemente el cerebro y las regiones periventriculares, aunque también pueden observarse en la sustancia blanca cerebral y la médula espinal (Baumgärtner et al., 1989; Beineke et al., 2009). La evolución de la CDV-DL sigue un curso temporal bien definido, que se correlaciona estrechamente con las alteraciones neuropatológicas características de cada etapa de la infección. Para describir este proceso, se ha postulado un esquema de clasificación histológica ampliamente utilizado, que categoriza las lesiones de la sustancia blanca en agudas, subagudas y crónicas (Vandervelde et al., 1981).

El curso de la CDV-DL refleja un proceso bifásico en su patogénesis, donde el inicio está mediado directamente por el virus, mientras que la progresión parece depender de mecanismos inmunopatológicos (Beineke et al., 2009). Durante las etapas iniciales, la infección viral afecta predominantemente a los astrocitos, que constituyen alrededor del 95% de las células infectadas, con menor participación de las células microgliales, ependimarias y del plexo coroideo (Lempp et al., 2014; Mutinelli et al., 1989). Un aspecto relevante es que los oligodendrocitos no presentan cambios necróticos ni apoptóticos significativos tras la infección por CDV, y solo una minoría de estas células contiene antígenos virales (Griot et al., 2003; Zurbriggen et al., 1997). Aunque se ha descrito que solo una baja proporción de oligodendrocitos contiene ácidos nucleicos de CDV (Zurbriggen et al., 1997), esta infección oligodendrogial limitada, sin evidencia de producción significativa de proteínas virales, podría inducir alteraciones metabólicas que eventualmente conducen a la desmielinización (Griot et al., 2003; Zurbriggen et al., 1997).

En la fase crónica de la CDV-DL, se describe que uno de los mecanismos implicados sería la "desmielinización colateral", atribuida al daño provocado por astrocitos y microglías activados. Estas células liberan enzimas proteolíticas y radicales de oxígeno, causando daño a la mielina incluso en ausencia de infección directa de los

oligodendrocitos (Vandervelde y Zurbriggen, 1995). La activación de estos fagocitos, caracterizada por una mayor expresión del MHC de clase II y moléculas de adhesión, amplifica su actividad fagocítica y la liberación de factores tóxicos (Beineke et al., 2009). Además, las respuestas inmunes humorales antivirales pueden contribuir al daño al afectar indirectamente a los oligodendrocitos como "víctimas inocentes" del proceso inflamatorio (Vandervelde y Zurbriggen, 2005). Asimismo, se ha propuesto que las células T autorreactivas desempeñan un rol en la inducción de inmunidad específica contra la mielina, posiblemente exacerbada por la diseminación de epítopos secundarios al daño en el SNC. Sin embargo, el impacto exacto de esta respuesta autoinmune aún no se comprende por completo (Beineke et al., 2009).

4.7 Diagnóstico

4.7.1 Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se basa en la identificación de los signos clínicos característicos de la infección. No obstante, este diagnóstico presenta un gran desafío dado la gran diversidad de manifestaciones clínicas que produce la infección por CDV (Elia et al., 2006; Loots et al., 2017; Tipold et al., 1992). Es necesario diferenciar el CDV de otros agentes infecciosos que pueden generar signos clínicos similares, como el virus de la rabia, el coronavirus canino (CCoV), parainfluenza, el CPV-2, también se los debe diferenciar de agentes bacterianos causantes de cuadros respiratorios como *Bordetella* sp., *Pasteurella* sp., y por último se debe considerar el diagnóstico diferencial con la infección por *Toxoplasma gondii* (Demeter et al., 2007; Karki et al., 2022; Loots et al., 2017; Tipold et al., 1992). En ocasiones, los caninos domésticos pueden presentar signos clínicos como mioclonias, que es un signo clínico bastante indicativo de CDV (Tipold et al., 1992).

4.7.2 Inmunocromatografía

El test de inmunocromatografía (IC) es una herramienta clave en el diagnóstico, permite un diagnóstico rápido y sencillo, con una buena sensibilidad y especificidad (An et al., 2008; Kim et al., 2006). Las muestras de hisopados conjuntivales son las más adecuadas para realizar este test, probablemente debido a la eliminación persistente de CDV en el ojo (An et al., 2008), sin embargo, los hisopados conjuntivales deben recolectarse en la fase temprana de la infección (Kim et al., 2006). Como desventaja se puede mencionar que están limitados por la cantidad de antígeno que pueden detectar, ya que se requieren grandes cantidades de antígeno viral para producir una banda claramente visible. Como resultado, la interpretación de los resultados puede verse afectada por la subjetividad del operador y a pesar de estas desventajas, la IC se destaca por ser rápida, económica y adecuada, para su uso tanto por veterinarios como por propietarios, lo que facilita el diagnóstico temprano y la intervención oportuna para reducir la morbilidad y mortalidad asociadas al CDV (An et al., 2008).

4.7.3 Ensayos serológicos

Los ensayos serológicos para identificar y cuantificar títulos específicos contra el virus el CDV incluyen la prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT), ELISA y la seroneutralización, tanto IFAT como ELISA permiten detectar anticuerpos IgM e IgG contra CDV en perros domésticos (Loots et al., 2017). La detección de IgM es una herramienta valiosa para confirmar una infección aguda activa y para

realizar un diagnóstico retrospectivo, ya que permite identificar la seroconversión en muestras de suero pareadas tomadas durante las fases aguda y de recuperación de la enfermedad (Blixenkrone-Moller et al., 1991; Loots et al., 2017).

Sin embargo, el uso de pruebas serológicas como diagnóstico principal tiene limitaciones, ya que no permite diferenciar entre infecciones naturales por CDV, infecciones derivadas de cepas vacunales atenuadas o respuestas inmunitarias a vacunas recombinantes vectorizadas por virus (Frisk et al., 1999; Loots et al., 2017).

4.7.4 Análisis microscópico mediante técnicas histológicas

El examen patológico es empleado en el diagnóstico *postmortem* de la infección ocasionada por el CDV, generalmente implica un examen exhaustivo de diferentes órganos y tejidos, incluyendo el bazo, nódulos linfáticos, estómago, pulmones, intestino delgado, hígado, páncreas, vejiga urinaria, riñones con pelvis renal y SNC (Feijóo et al., 2019; Feijóo et al., 2021; Loots et al., 2017; Verdes, Larrañaga, Varela et al., 2024). Este diagnóstico se basa en la identificación de lesiones histopatológicas características en el tejido linfoide, el epitelio de los tractos respiratorio, urinario y gastrointestinal, así como en el SNC (Loots et al., 2017).

4.7.4.1 Histopatología

La histopatología es una herramienta útil en el diagnóstico *postmortem*, dado que a partir de los órganos afectados, principalmente el SNC (Alldinger et al., 2000; Amude et al., 2011; Feijóo, 2020; Lan et al., 2006; Lempp et al., 2014; Spitzbarth et al., 2016; Summers et al., 1979; Vandervelde et al., 1981) y los pulmones (Feijóo et al., 2019). Las lesiones histológicas más típicas se localizan en el cerebro y las regiones periventriculares, donde el CDV genera mayor daño (Baumgärtner et al., 1989; Beineke et al., 2009; Feijóo et al., 2021; Vandervelde et al., 1981). Diversos estudios han desarrollado esquemas de clasificación histopatológica basados en tinción con hematoxilina y eosina (H&E), identificando tres etapas principales: aguda, subaguda y crónica (Alldinger et al., 2000; Feijóo et al., 2021; Lempp et al., 2014; Vandervelde et al., 1981). La etapa aguda se caracteriza por vacuolización focal, gliosis leve y la presencia de cuerpos de inclusión, sin evidencia de desmielinización. En la fase subaguda, aparecen lesiones más severas, incluyendo desmielinización, gliosis moderada, cuerpos de inclusión, necrosis y manguitos perivasculares formados por dos o tres capas de células mononucleares. Por último, las lesiones crónicas muestran características similares a las subagudas, pero con manguitos perivasculares más prominentes, compuestos por más de tres capas de células mononucleares (Vandervelde et al., 1981). Sumado a la H & E existe la tinción Luxol Fast Blue (LFB) que es una técnica histoquímica ampliamente utilizada en medicina veterinaria como una herramienta fundamental para evaluar y diagnosticar la presencia de desmielinización en el SNC cuando los caninos domésticos son infectados por CDV y el mismo induce desmielinización (Feijóo et al., 2021; Verdes, Larrañaga, Godíño et al., 2024). Estudios recientes han utilizado LFB para analizar la relación entre la desmielinización y las reacciones celulares en el cerebro de perros infectados con CDV, observando que la desmielinización comienza en la médula adyacente al cuarto ventrículo y se extiende gradualmente por todo el cerebro (Verdes, Larrañaga, Godíño et al., 2024).

4.7.4.2 Inmunohistoquímica (IHQ)

La IHQ es otra herramienta fundamental en el diagnóstico *postmortem* de la infección por CDV a partir de muestras fijadas en parafina, es una técnica que

representa un método altamente sensible y específico para la detección del antígeno del CDV en tejido obtenido *postmortem* (Frisk et al., 1999)

Diversos estudios han empleado técnicas IHQ en el marco de la infección producida por el CDV, dado que posee una marcada utilidad para identificar y diferenciar los distintos tipos de células presentes en los tejidos, permitiendo así reconocer las características morfológicas asociadas a las lesiones en el cerebro y cerebelo propias de la infección producida por el CDV (Feijóo et al., 2021; Moro et al., 2003; ; Pan et al., 2013; Seehusen et al., 2007). Además, la IHQ resulta útil para detectar la presencia de antígenos virales del CDV y poder caracterizar qué células infecta el CDV (Feijóo et al., 2021; Verdes, Larrañaga, Godíño et al., 2024).

4.7.6 Pruebas moleculares para la detección del CDV

Las pruebas moleculares basadas en la detección de ácidos nucleicos surgieron a principios de los años 80, con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consolidándose como una herramienta de gran utilidad para la biología molecular. Innovaciones como el desarrollo de polimerasas termoestables y la fabricación de equipos especializados impulsaron su implementación en los laboratorios de microbiología clínica. Más adelante, se desarrollaron técnicas de PCR cuantitativas, como la PCR cuantitativa (qPCR) y la PCR digital, actualmente poseen una significativa utilidad clínica, al permitir no solo la detección, sino también la cuantificación precisa de ácidos nucleicos específicos en muestras clínicas (Kuypers et al., 2017).

4.7.6.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR convencional)

Dentro de las pruebas moleculares tenemos a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la misma es una técnica que permite amplificar de forma masiva un fragmento específico de ADN en condiciones de laboratorio. La longitud del fragmento amplificado está determinada por dos pequeñas secuencias de ADN, conocidas como oligonucleótidos, que se añaden a la reacción y delimitan el segmento a replicar. Estas secuencias también señalan el punto de inicio para la reacción de amplificación, que es catalizada por la enzima ADN polimerasa (Peña-Castro et al., 2013). La creación de termocicladores y el descubrimiento de las ADNpolimerasas termoestables fueron cruciales para que la PCR se transformase en una herramienta innovadora para la comunidad científica (Peña-Castro et al., 2013).

Un avance tecnológico significativo de la técnica de PCR convencional es su combinación con un proceso adicional denominado retrotranscripción (RT). Durante la RT, se utiliza una enzima conocida como retrotranscriptasa, que tiene la capacidad de sintetizar ADN complementario (ADNc) a partir de ARN (Baltimore, 1970; Peña-Castro et al., 2013). Es así que gracias al desarrollo de metodologías moleculares como las basadas en retrotranscriptasa-PCR (RT-PCR), se ha logrado en muchos casos un diagnóstico más rápido, más sensible y específico respecto a pruebas diagnósticas anteriormente mencionados (Frisk et al., 1999; Gebara et al., 2004; Kim et al., 2001; Saito et al., 2006).

La RT-PCR es una herramienta de diagnóstico altamente sensible y específico que permite la detección precoz del CDV utilizando diversas muestras como suero, sangre, orina, LCR y tejido del SNC (Amude et al., 2007; Frisk et al., 1999; Iribarne-Garay et al., 2024). Además, presentan la ventaja de una detección sensible y específica tanto en las muestras *antemortem* como *postmortem* (Amude et al., 2006; Headley et al., 2009; Karki et al., 2022)

4.7.6.2 PCR en tiempo real (qPCR)

Con el transcurso de los años ha surgido otra técnica molecular denominada RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), actualmente se ha establecido como una herramienta de gran utilidad en biología molecular, permitiendo la cuantificación precisa y eficiente de moléculas de ADN en diversas muestras (Elia et al., 2006; Peña-Castro et al., 2013; Saito et al., 2006). Este método combina la amplificación del ADN con la detección simultánea mediante fluorescencia, utilizando colorantes como SYBR Green, que se intercalan en las moléculas de ADN durante la etapa de extensión. El principio de la qPCR radica en la medición de la fluorescencia acumulada durante cada ciclo de amplificación, generando una curva de amplificación típica con forma sigmoidea en una escala lineal. Esta curva se caracteriza por tres fases principales: una fase de referencia inicial, una fase exponencial donde la amplificación alcanza su máxima eficiencia y la cantidad de ADN se duplica en cada ciclo, y finalmente una fase lineal que se estabiliza en una meseta, esto permite monitorear la reacción en tiempo real con alta sensibilidad y especificidad (Bustin et al., 2009; Quan et al., 2018; Peña-Castro et al., 2013).

En el contexto del diagnóstico del CDV, la RT-PCR en tiempo real ofrece una ventaja significativa frente a la PCR convencional, ya que permite la cuantificación precisa de la carga viral en diferentes muestras biológicas. Esta técnica ha demostrado ser particularmente útil para detectar la carga viral en tejidos linfoides, demostrando en los mismos una alta carga viral del CDV (Elia et al., 2006), así como en orina, lo que la convierte en una herramienta valiosa para el diagnóstico *in vivo* (Elia et al., 2006; Saito et al., 2006; Shen et al., 1981). Además, la RT-PCR en tiempo real ha demostrado ser eficaz en el análisis post mortem del CDV, al facilitar la investigación de la distribución del CDV en tejidos cerebrales. Esto ha permitido identificar las áreas más adecuadas para el muestreo, mejorando la precisión del diagnóstico (Elia et al., 2006). Algunos trabajos han utilizado esta técnica para analizar la distribución del virus en el SNC, encontrando que ciertas regiones cerebrales, como el lóbulo frontal, presentan una alta concentración de carga viral (Elia et al., 2006). Estos hallazgos sugieren una distribución heterogénea del CDV en el cerebro y abren la posibilidad de investigar la relación entre la localización viral y las manifestaciones clínicas o las lesiones histopatológicas. No obstante, aún se requieren estudios que exploren específicamente el vínculo entre la carga viral y en el SNC, lo cual constituye un aspecto original y relevante para la patogenia de la enfermedad.

4.7.6.3 Digital droplet PCR (DdPCR)

El progreso tecnológico continuo en las técnicas moleculares ha impulsado la creación la PCR digital, considerada la última generación en esta área. Esta tecnología permite no sólo la detección, sino también la cuantificación precisa de la carga viral en muestras biológicas, superando en sensibilidad a la qPCR. Gracias a estas características, la ddPCR se ha consolidado como una herramienta fundamental en estudios moleculares y diagnósticos de alta precisión (Quan et al., 2018).

La ddPCR se ha establecido como una técnica innovadora para la cuantificación precisa y absoluta de ácidos nucleicos, superando algunas limitaciones asociadas con la qPCR (Kalinina et al., 1997; Quan et al., 2018; Sykes et al., 1992). Las limitaciones se ven superadas dado que la qPCR depende de valores de umbral (CT) y curvas estándar, pero la ddPCR divide la muestra en miles de sub-reacciones

independientes, logrando una partición eficiente mediante micropocillos, capilares, emulsiones de aceite o matrices (Kuypers et al., 2017). Esta fragmentación asegura que cada sub-reacción contenga una sola molécula objetivo o ninguna, lo que permite amplificaciones independientes (Kuypers et al., 2017; Quan et al., 2018). El análisis posterior se basa en el conteo de particiones positivas (fluorescentes) y negativas, complementado por cálculos estadísticos regidos por la Ley de Poisson (Dube et al., 2008; Quan et al., 2018). Este enfoque garantiza una estimación precisa de la concentración molecular original, destacándose por su sensibilidad incluso en muestras con concentraciones bajas. Por ejemplo, el uso de nanogotas dentro de emulsiones de aceite asegura reacciones independientes, optimizando la detección de moléculas objetivo con alta fiabilidad (Quan et al., 2018). Recientemente en un trabajo publicado por nuestro grupo (Iribarnegaray et al., 2024) se destaca que la ddPCR ofrece una sensibilidad superior en la identificación del CDV en comparación con métodos tradicionales como la RT-PCR y la RT-qPCR. Este estudio subraya la eficacia de la ddPCR para detectar el virus incluso en concentraciones virales bajas, lo que la convierte en una herramienta prometedora para el diagnóstico preciso de la infección por CDV.

5. HIPÓTESIS

Las lesiones inducidas por el virus del Distemper canino (CDV) en el cerebelo están directamente relacionadas con la carga viral. Es decir, a mayor carga viral hay aumento de las lesiones en el cerebelo.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Comparar las alteraciones histopatológicas en el cerebelo de caninos domésticos infectados naturalmente por el CDV, con la detección del virus, y la carga viral de CDV mediante el uso de RT-PCR y ddPCR.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar mediante H&E muestras de cerebelo de caninos infectados por el CDV.
2. Evaluar la pérdida de mielina en el cerebelo de caninos infectados naturalmente por CDV mediante Luxol Fast Blue (LFB).
3. Detectar CDV por RT-PCR convencional (gen N) a partir de las muestras del tejido nervioso central de animales presuntamente infectados naturalmente con el virus.
4. Cuantificar de la carga viral en las muestras mediante ddPCR.
5. Correlacionar los hallazgos obtenidos mediante H&E y LFB con la severidad del daño en el cerebelo de caninos infectados por CDV.
6. Comparar las lesiones microscópicas que provoca el CDV en el cerebelo y la carga viral detectada mediante ddPCR.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestras de SNC de caninos infectados naturalmente con CDV.

En este ensayo experimental, se estudiaron 20 muestras de cerebro de caninos infectados naturalmente con el CDV. Las muestras fueron obtenidas de caninos que murieron espontáneamente o fueron eutanasiados por signos clínicos compatibles con CDV y con pronóstico clínico grave (**Tabla 1**), los mismos ingresaron en un período de tres años (2020 - 2023) al servicio diagnóstico de la Unidad de Patología de la Facultad de Veterinaria - Udelar. Al ingreso de los canes, se generó una ficha donde se registraban los signos clínicos observados, edad, raza, sexo y estado sanitario. Dentro de las 24 horas *postmortem* se realizó una autopsia completa. Las edades de los animales estaban comprendidas desde los 25 días de vida hasta los 8 años. Había 10 caninos machos y 10 hembras, respectivamente. La infección viral se confirmó mediante RT - PCR convencional.

Además, teniendo en cuenta la edad de los caninos infectados por CDV, se seleccionaron cinco caninos de entre 45 días y 6 años, que fueron negativos a CDV usando la prueba de RT - PCR convencional, como grupo de control. En el grupo de control, se excluyeron las enfermedades infecciosas como causa de muerte.

7.2 Autopsia y obtención de las muestras

A partir de los cadáveres ingresados a la Unidad de Patología de Facultad de Veterinaria - Udelar fueron sometidos a una autopsia completa dentro de las 24 horas posteriores a su muerte. Durante la misma se realizó un registro fotográfico y se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo, parénquima pulmonar, hepático, esplénico, cerebro, cerebelo y por último, de tronco encefálico. Posteriormente se realizó un reporte de los hallazgos macroscópicos más relevantes de la autopsia. El cerebro y el cerebelo de cada animal fueron cortados en forma sagital, guardando en freezer a -80°C el hemisferio izquierdo para su utilización en las pruebas de diagnóstico molecular. Mientras que el hemisferio derecho, fue colocado en una solución de formol tamponado (pH = 7,4) al 10% para posteriormente su procesamiento histológico.

7.3 Procesamiento histológico

7.3.1 Selección de zonas para la evaluación de lesiones producidas por el CDV.

Luego de la fijación, el cerebro y cerebelo fueron seccionados en forma transversal en 5 zonas diferentes y estandarizadas (según Veterinary Anatomy – University of Minnesota <http://vanat.cvm.umn.edu/brainsect/levels.html?1>). Ellas fueron: lóbulo frontal, hipotálamo intermedio, colículo rostral, pedúnculo cerebeloso rostral y núcleo olivar. Finalmente fueron tomadas de referencia para la interpretación de los resultados, las zonas de hipotálamo intermedio y pedúnculo cerebeloso rostral, por ser las regiones donde se han descrito mayor número, extensión y severidad de las lesiones causadas por el CDV (Feijoó et al., 2021; Vandevelde et al., 1981; Vandevelde & Zurbriggen, 2005; Verdes, Larrañaga, Varela et al., 2024).

7.3.2 Obtención del bloque y lámina histológica

Utilizando el procesador de tejidos tipo carrusel (MTP, Slee Medical GmbH, Nieder-Olm, Alemania) las muestras fueron fijados en solución de formaldehído durante 12 hs y sumergidos en concentraciones crecientes de etanol (70°, 96° y

100°), xilol e impregnados en parafina para la confección de los bloques. A partir de los bloques histológicos se realizaron cortes de 5 μm de espesor en un micrómetro (CUT 4062, Slee Medical GmbH, Nieder-Olm, Alemania), luego de obtenidos los cortes se colocaron en un baño de flotación de agua corriente a 37 °C, rápidamente se levantaron los cortes en portaobjetos obtenido la lámina histológica. Como último paso se colocaron las láminas *overnight* en estufa a 37 °C.

7.3.3 Hematoxilina y Eosina (H&E)

A partir de las láminas se llevó a cabo la tinción de H&E, para ello se realizó el desparafinado en estufa a 60° (10 minutos), inmersión en xilol (10 minutos); luego se hidrataron por inmersión en concentraciones crecientes de alcohol (70°, 95°, 100°), durante un minuto en cada alcohol, luego se realizaron lavados; primero con agua corriente y por último un lavado con agua destilada. Seguidamente se sumergieron las láminas en Hematoxilina por 10 minutos, se lavó durante 10 minutos en agua corriente, luego se agregó Eosina durante 4 minutos y se lavó con agua corriente para realizar una deshidratación con alcoholes crecientes a (70°, 95° 100°). Por último se realizó el aclaramiento con xilol y el montaje con Bálsamo de Canadá Sintético (Biopack®, Buenos Aires, Argentina) y se colocó el cubreobjetos, para visualizarlo en microscopio óptico.

7.3.4 Luxol fast blue

Para evaluar el grado de desmielinización, se realizó una tinción con el kit de tinción Luxol Fast Blue (LFB) (Abcam, Waltham, MA 02453, EE. UU. n.º ab 150675) como se describe brevemente a continuación. Los cortes histológicos se desparafinaron y se incubaron en solución LFB a 60 °C, luego se lavaron en alcohol al 95 %. Posteriormente, las secciones se incubaron en solución de carbonato de litio y alcohol etílico al 70 % y finalmente se contra-tiñeron en solución de violeta de cresilo. Después de la deshidratación, se realizó el montaje con Bálsamo de Canadá sintético (Biopack®, Buenos Aires, Argentina) y se colocó el cubreobjetos, para visualizarlo en microscopio óptico.

7.3.5 Observación y Captura de imágenes de histológicas

Los preparados histológicos provenientes de cada una de las secciones, teñidas con H&E y LFB, fueron analizados buscando hallazgos histopatológicos compatibles con lesiones causadas por el CDV. Cada lámina fue observada al microscopio durante 3 días consecutivos, para verificar la repetición de los mismos hallazgos. Además, fueron evaluadas por tres observadores diferentes de forma independiente para luego comparar los resultados encontrados. Los parámetros evaluados en el cerebelo incluyeron zonas de desmielinización, necrosis, meningitis, gliosis, manguitos perivasculares, hemorragia y cuerpos de inclusión (tanto intranucleares como intracitoplasmáticos).

Todas las láminas histológicas se escanearon con un escáner de láminas (Motic Easy Scan One ®, Motic China Group Co., Ltd., Xiamen, China) para su posterior análisis, y todas las imágenes de las láminas se visualizaron y capturaron utilizando el software Motic DS Assistant ® (Motic VM V1 Viewer 2.0 ®, versión 2019-08-02, China).

7.3.6 Clasificación histopatológica de las lesiones asociadas al CDV

Las lesiones histopatológicas se clasificaron como agudas, subagudas o crónicas según estudios previos sobre infecciones naturales y experimentales en caninos

(Alldinger et al., 2000; Feijoó et al., 2021; Summers et al., 1979; Vandervelde et al., 1981; Verdes, Larrañaga, Varela et al., 2024). Las lesiones agudas se caracterizan por presentar vacuolización focal, gliosis, cuerpos de inclusión y ausencia de desmielinización, las lesiones subagudas presentan desmielinización, gliosis, necrosis, cuerpos de inclusión e infiltración mononuclear perivascular de dos a tres capas de espesor, y las lesiones crónicas son similares a la etapa subaguda, pero la infiltración perivascular es más prominente, de al menos tres capas de espesor.

Sumado se realizó una segunda clasificación basados en los criterios establecidos en Verdes, Larrañaga, Godíño et al., 2024, donde se realizó en cinco grupos según el grado de desmielinización observado mediante tinciones H&E y LFB. En la etapa aguda, al igual que en el grupo control, no se evidencia desmielinización. En la etapa subaguda se identifican tres subgrupos: subaguda 1, con menos del 30% de desmielinización en la muestra; subaguda 2, con una afectación entre el 30% y el 70%; y subaguda 3, con más del 70% de desmielinización. Finalmente, en el grupo crónico, la desmielinización fue extensa y claramente evidente.

7.4 Procesamiento molecular

7.4.1 Extracción de ARN a muestras de cerebelo

A partir del cerebelo conservado a -80°C, se procedió a la extracción de ARN empleando Trizol (Invitrogen™), siguiendo los pasos del fabricante.

Se pesan 30 mg de cerebelo, luego se agrega 1 mL de Trizol y se resuspende vigorosamente con micropipeta hasta la disgregación total del tejido. Luego se centrifuga 12.000g por 10 minutos a 15 °C. Posteriormente el sobrenadante se transfiere a otro tubo donde se le agrega 120 µL de isopropanol, seguidamente se realizó una agitación con vortex, para finalizar este paso se incuba por 3 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se vuelve a centrifugar por 15 minutos, 12.000g a 15 °C. Luego de este paso se obtiene una fase inferior de fenol-cloroformo, una interfase y una fase acuosa superior incolora. Se toma (inclinando el tubo a 45°) 300 µL de la fase acuosa (superior) y se coloca en un nuevo tubo Eppendorf, sin tocar la interfase. Se agregan 300 µL de isopropanol y se agita manualmente hasta evidenciar una especie de gel blanco en el fondo del tubo, luego de realizar la agitación manual, se incuba a temperatura ambiente por 10 minutos. Culminados los 10 minutos se realiza otra centrifugación a 12.000g por 10 minutos, finalizada la centrifugación, se desecha el sobrenadante con una micropipeta. Rápidamente se continúa con el lavado del ARN, que se realiza agregando 1 mL de Etanol al 75%, se agita brevemente y luego se centrifuga durante 5 minutos a 7500g a 4°C. Culminado el proceso de centrifugación, se prosigue a desechar el sobrenadante con una micropipeta y se coloca el tubo Eppendorf a secar el pellet al aire durante 10 minutos. Finalizando la extracción ARN, se realiza la resuspensión del pellet en 40 µL de agua libre de ARNasa. Rapidamente, la solución obtenida se almacena a -80 °C. Con el objetivo de asegurar una alta pureza del ARN extraído, las muestras fueron tratadas con la enzima ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), la cual permite degradar y eliminar posibles residuos de ADN genómico que podrían interferir en análisis posteriores, como la retrotranscripción o la amplificación mediante PCR. Posteriormente, la calidad y concentración del ARN purificado fueron evaluadas mediante espectrofotometría, utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.), esto nos permite determinar la concentración de ARN en nanogramos por microlitro (ng/µL) y evaluar su pureza a través de la relación de

absorbancia 260/280 nm. Una relación cercana a 2.0 se considera indicativa de ARN de alta calidad, libre de proteínas u otros contaminantes. En caso de que las muestras no cumplieran con estos criterios, fueron descartadas o sometidas a una nueva purificación antes de ser utilizada en los análisis posteriores.

7.4.2 RT - PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa precedida de Retro-Transcripción)

Se empleó la técnica de RT-PCR para retro-transcribir ARN a ADNc (ADN complementario) empleando el kit comercial SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit, de meridian bioscience (BIO-65053), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se realiza una mezcla de 1 µL Transcriptasa inversa, 4 µL Buffer TransAmp 5x, 20 µL de Agua libre de DNasa/RNasa y 5 µL de nuestro ARN, cuya concentración promedio estuvo entre 50 y 100 ng/µL. Obtenida la mezcla se procede a la hibridación de *primers*, a 25 °C durante 10 minutos. Luego de la hibridación de *primers*, se continua con la transcripción inversa a 42 °C durante 15 minutos, y se realiza el paso opcional a 48 °C durante 15 minutos para ARN con estructuras altamente complejas. Para finalizar se realiza la inactivación a 85 °C durante 5 minutos. El ADNc obtenido se almacena a -20 °C.

7.4.3 PCR convencional para amplificación del Gen N del CDV

Se utilizaron los *primers* descritos por Frisk et al. 1999, el cual amplifica un fragmento de 287 pb del gen N que codifica para la proteína de la nucleocápside (NP), utilizando las siguientes secuencias de *primers*: CDV-NP: 5'ACAGGATTGCTGAGGACCTAT3' (Forward), y CDV-NP: 5'CAAGATAACCATGTACGGTGC3' (Reverse). La reacción PCR se realiza en un volumen final de 25 µL mezclando 12,5 µL de MangoMixTM (Bioline); 1µL primer Forward [10 µM] CDV-NP; 1µL primer Forward [10 µM] CDV-NP; 9,5 µL de agua DEPC y 1 µL de ADNc.

La amplificación consiste en un paso de desnaturación inicial a 94 °C durante 1 minuto, seguido de 40 ciclos que consisten en un paso de desnaturación de 1 minuto a 94°C, un paso de hibridación de 2 minutos a 59,5 °C y un paso de extensión de 1 minuto a 72°C, y una extensión final a 72°C durante 5 minutos, que se realiza en un termociclador (C1000 touch cycler; Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Como control positivo, se utilizó ADNc de la vacuna comercial canigen MHA/2 PPI/L (Virbac) cepa Lederle. Posteriormente, el producto de PCR se cargó en un gel de agarosa al 2% teñido con GoodView™ (SBS Genetech) y la electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 24 minutos.

7.4.4 Procesamiento de muestras mediante Droplet digital PCR para CDV

La reacción de ddPCR se llevó a cabo empleando QX200TM Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Las secuencias de sonda y *primers* fueron utilizadas según lo descrito en Iribarnegaray et al., 2024, las mismas amplifican un segmento parcial del gen N. La secuencia para la sonda fue: CDV probe: 5'FAM-TGGCATTGAAACTATGTATCCGGCTCT- BHQ1-3' y la de los *primers*: CDV-forward: 5'AGCTAGTTCATCCTAACTATCAAGT3' y CDV- reverse 5'ATGAGTTTCCGGAGAATTAACAA3'. Para llevar a cabo la reacción se realizó una mezcla que contenía 20 µL totales, de los cuales 10 µL fueron de la ddPCR Supermix for Probes (Bio-Rad Laboratories Inc), 1,2 µL para de *primers Forward* y *Reverse* [10 µM] 1 µL de ADNc. Inicialmente, se transfirieron 20 µL de mezcla a un cartucho DG8 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.) y se cargaron 70 µL de aceite de

generación de gotas en el DG8. Posteriormente, se utilizó un generador de gotas QX200 (Bio Rad, Hercules, CA, EE. UU.) para generar las particiones. Luego de los 70 μ L, se tomaron 40 μ L de las gotas creadas y se cargaron en una placa de 96 pocillos. La placa se corrió en un termociclador T100 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.), con 40 ciclos de amplificación (20 s de desnaturalización a 95 °C, seguido de 30 s a 58 °C de hibridación y extensión). Después de la amplificación, las gotas se leyeron individualmente utilizando un lector de gotas QX200 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Los resultados se analizaron con QuantaSoft v.1.7.4 (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Se consideraron las reacciones con un número total de gotas superior a 10000. Todas las muestras se analizaron por triplicado y también se incluyó una reacción de control sin ADN (NTC).

Para el análisis de los datos obtenidos mediante ddPCR, empleamos el software Bio-Rad QX ManagerTM y análisis de regresión lineal. El umbral entre las poblaciones de gotas positivas y negativas se estableció manualmente, guiado por controles positivos por placa y controles sin ADN. La concentración se expresa como copias/ μ L de los eventos positivos utilizando la estadística de Poisson.

7.5 Análisis de resultados

El análisis estadístico se realizó utilizando GraphPad Prism® (versión 10.1.1 -323- para Windows de 64 bits, GraphPad Software, Boston, MA, EE. UU., www.graphpad.com). Dado que la distribución de los datos no cumplía con los supuestos de normalidad, se optó por emplear pruebas no paramétricas. Para comparar la carga viral entre las distintas clasificaciones histopatológicas, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Además, para evaluar la relación entre variables cuantitativas y binarias, se aplicó el coeficiente de correlación de *Spearman*.

8. RESULTADOS

8.1 Descripción de casos clínicos

De los 20 casos analizados, se evalúan variables como edad, raza, sexo, estado de vacunación y signos clínicos. En cuanto a la edad, se incluyeron diez caninos menores de 1 año, siete con edades entre 1 y 4 años, y dos mayores de 6 años (**Figura 3**). Finalmente, un canino no contaba con registro de su edad (sin datos).

Respecto a la raza, el 65 % (14/20) correspondía a animales mestizos, mientras que un 10 % (2/20) eran de raza definida. Dentro de este grupo, el 5 % (1/20) pertenecía a la raza caniche y otro 5 % (1/20) a la raza pitbull. El 25 % restante (4/20) no contaba con información sobre la raza al momento de ingresar al servicio de patología (**Figura 4**).

Distribución de las edades

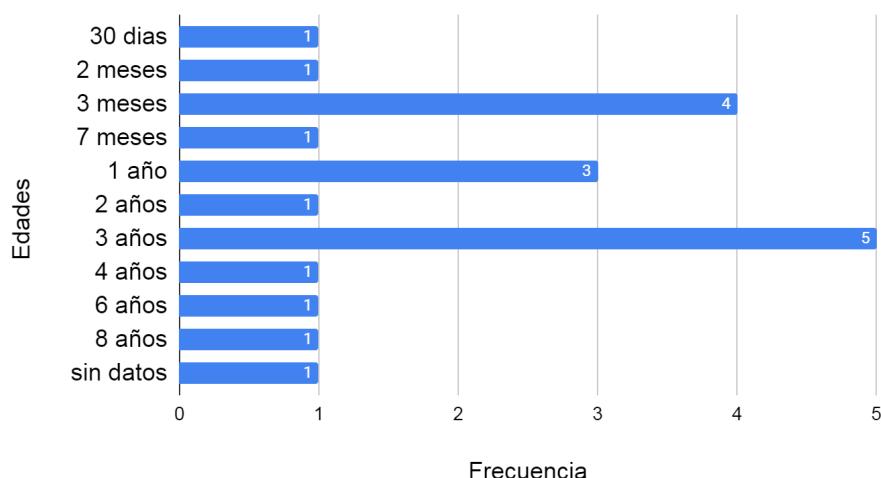


Figura 3. Distribución de las edades de los caninos. Fueron agrupados según la frecuencia observada en cada rango de edad.

En cuanto al sexo, se observó una distribución equitativa: el 50 % (10/20) eran hembras y el otro 50 % (10/20) machos.

Con respecto al estado de vacunación, ninguno de los animales analizados tenía un plan de vacunación vigente para la prevención de la enfermedad.

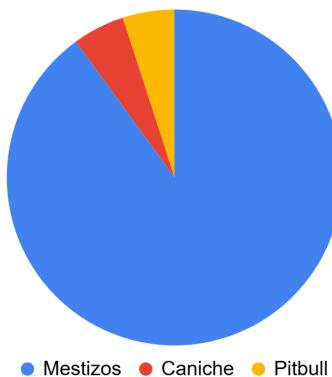


Figura 4. Representación porcentual de las razas de caninos. Se destaca que la mayoría corresponde a mestizos, seguidos por las razas caniches y pitbull.

En los casos evaluados, los signos clínicos *antemortem* (**Figura 5**) evidenciaron la presentación multisistémica de la enfermedad. Los principales sistemas afectados fueron el digestivo, el respiratorio y el neurológico, a menudo en combinaciones de ambas.

Los resultados obtenidos mostraron que el 20% (4/20) de los casos presentaron una combinación de signos clínicos que reflejan afectaciones en los sistemas digestivo, respiratorio, neurológico y en un caso, el sistema dermatológico (**Tabla 1**). Asimismo, el 10 % (2/20) de los caninos presentó signos clínicos compatibles con alteraciones en los sistemas digestivo y neurológico. Otro 15 % (3/20) mostró compromiso de los sistemas respiratorio y neurológico, mientras que un 10 % (2/20) evidenció signos clínicos en los sistemas digestivo y respiratorio.

De manera individual, el 25% (5/20) de los casos presentaron exclusivamente alteraciones neurológicas. Finalmente, el 20% (4/20) restante no contó con registros de signos clínicos debido a diversas circunstancias.

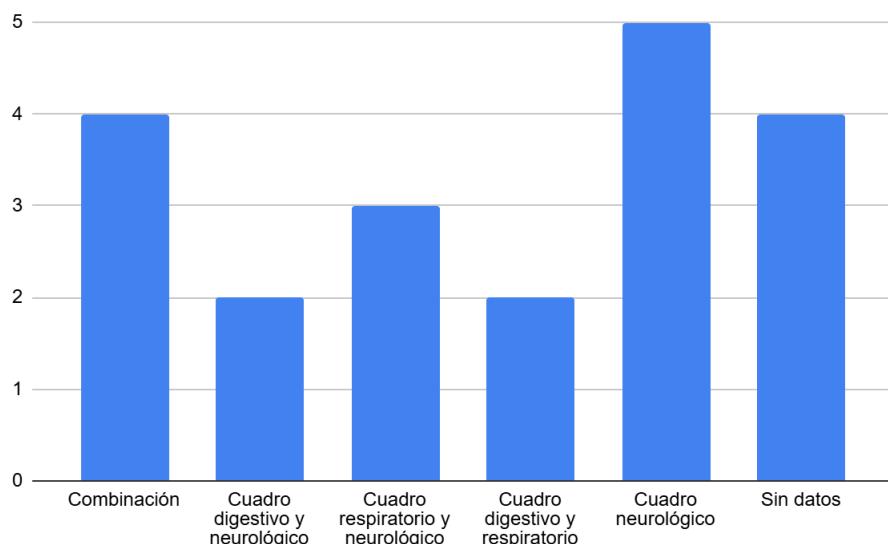


Figura 5. Frecuencia de signos clínicos. Se representa en un gráfico de barras la presentación de los diferentes signos clínicos registrados en los casos analizados.

Tabla 1. Resumen de los signos clínicos antemortem compatibles con CDV

NEUROLÓGICO	DIGESTIVO	RESPIRATORIO	DERMATOLÓGICOS	OTROS
Mioclonias	Vómitos	Secreción nasal	Hiperqueratosis nasal	Secreción ocular
Vocalizaciones	Anorexia	Disnea	Hiperqueratosis plantar	Fiebre
Ataxia	Hiporexia	Tos		
Paraparesia	Diarrea			
Paraplejia				
Cuadriplejia				

El sistema nervioso fue uno de los más comprometidos ya sea de manera combinada o individual. Entre los signos neurológicos más frecuentes, destacan las mioclonias (**Figura 6**). Además, se registraron paraparesia, ataxia, cuadriplejia, vocalizaciones, convulsiones y paraplejia, mientras que un grupo de signos neurológicos quedó clasificado como inespecífico debido a la falta de detalles en algunos informes.

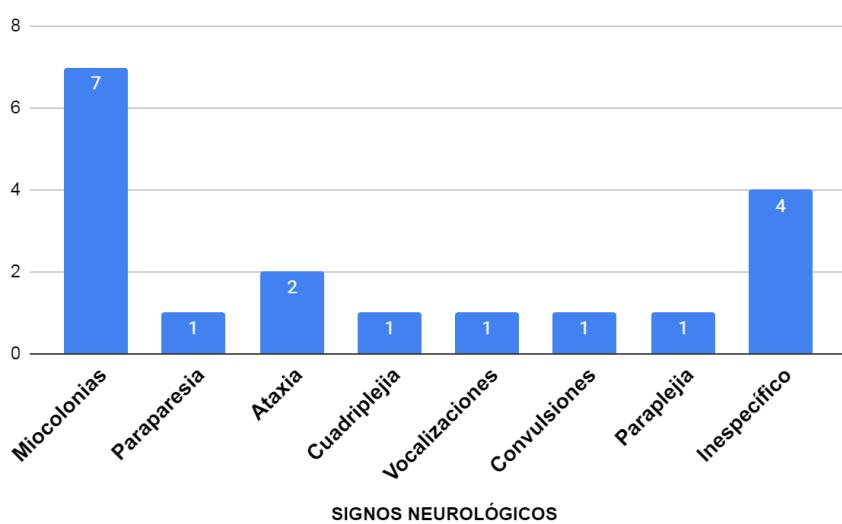


Figura 6. Distribución de los signos neurológicos observados en los casos analizados. Se representa la frecuencia de cada signo neurológico identificado, destacando que las mioclonías fueron el hallazgo más común, los demás signos presentaron una frecuencia homogénea.

En varios casos, estos signos neurológicos coexistieron con afecciones digestivas, como anorexia, diarrea y vómitos, o con síntomas respiratorios, incluyendo secreción nasal purulenta y disnea. Por ejemplo, en el canino 20 (**Tabla 3**), un mestizo de 4 años, se reportaron ataxia, mioclonias y paraplejia en combinación con anorexia, fiebre y secreción ocular, lo que confirmó la conocida presentación multisistémica del Distemper canino.

El sistema respiratorio también mostró alta incidencia de compromiso, manifestándose en cuadros que incluían secreción nasal purulenta, dificultad respiratoria e incluso ictericia en un caso específico (**Tabla 3**). En contraste, el sistema digestivo presenta signos como anorexia y diarrea en un número considerable de pacientes, frecuentemente asociados con manifestaciones neurológicas como se mencionó anteriormente.

En algunos casos, los signos digestivos fueron prominentes, como en el canino 4 que presentó anorexia, diarrea y vómitos como signos principales, acompañados de paraparesia (**Tabla 3**). Además, en ciertos individuos, la anorexia fue un signo destacado, reflejando la pérdida de apetito como uno de los primeros indicadores de compromiso del organismo ante la infección. Por otra parte, la diarrea y los vómitos se presentan en contextos de descompensación clínica, siendo indicativos de un daño gastrointestinal.

Por otro lado, algunos caninos mostraron signos clínicos más focalizados, como en el canino 9 (**Tabla 3**) evidenció signos neurológicos solamente (cuadriplejía y mioclonias), esto también se registró en el canino 3, 12, 14 y 16.

8.2 RT - PCR convencional

En cuanto a la detección del genoma viral, al menos en 20 cerebros analizados se obtuvo el fragmento de 287 pb del gen N mediante PCR. En la **Figura 9** se muestra una corrida electroforética donde se observa el producto de 287 pb obtenido..

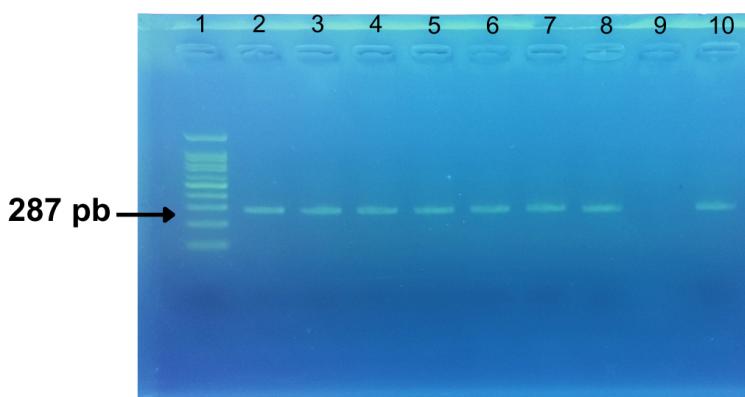


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. De izquierda a derecha: carril 1: Marcador de peso molecular (100 pb), carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8: muestras positivas con un producto de amplificación específico de 287 pb, carril 9: control negativo, carril 10: control positivo mostrando banda correspondiente al mismo tamaño esperado.

8.3 Cuantificación de la carga viral mediante Droplet digital PCR (ddPCR)

En todas las muestras de cerebro analizadas ($n=20$) se logró cuantificar la carga viral del CDV mediante la técnica de ddPCR (**Figura 8**). Los resultados se expresaron como el promedio de copias virales por 20 microlitros de reacción, acompañado del coeficiente de variación (CV) individual, con el objetivo de evaluar la precisión de las mediciones obtenidas (**Tabla 2**). En el eje Y del gráfico de dispersión (**Figura 8**), la amplitud representa la intensidad de fluorescencia medida en cada gota, la cual permite distinguir entre gotas positivas (que contienen el objetivo amplificado y muestran una señal fluorescente elevada) y gotas negativas (sin señal o con señal basal), facilitando así la cuantificación precisa en cada muestra.

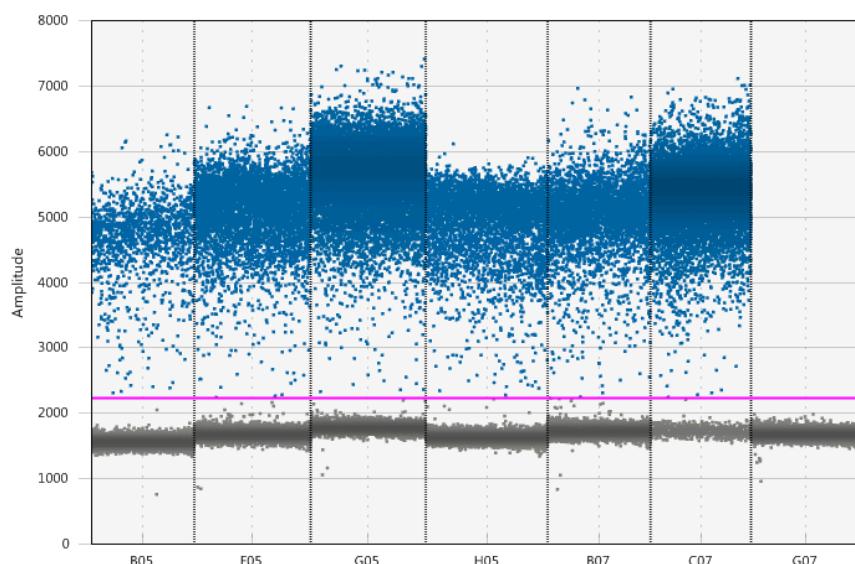


Figura 8. Gráfico 1D donde se observa un diagrama de dispersión de la ddPCR. Se observa el resultado de la ddPCR para las muestras estudiadas desde B05 –C07) y control negativo; control sin plantilla (NTC) (G07). En azul se observan las gotas positivas (eventos positivos) y en gris eventos negativos. La línea violeta indica el umbral de las señales positivas.

Tabla 2. Análisis de la carga viral en las muestras de cerebro. La tabla presenta el promedio de la carga viral (copias/20 μ L) junto con sus respectivas medidas estadísticas: media, desvío estándar (SD), y coeficiente de variación (CV).

Clasificación histopatológica	Promedio carga viral copias/ 20 μ L	SD	CV	CV (%)
Agudo	38,59			
	89,119			
	40,11	42.496,94	1,61	160,55
	16.678			
Subagudo 1	14,66			
	87,99	79453,44	1,82	182,19
	9,93			

	183.171			
	34.765			
Subagudo 2	1.176,57 13,17 13.347,21	7.385,51	1,52	152,42
Subagudo 3	76.734,07 116.681,11 34.169,81 22.645,41 205.014,41	73.763,69	0,81	81,02
Crónico	65.756,66 5.560,95 49.024,59	31.071,35	0,78	77,46

8.4 Evaluación de las lesiones microscópicas mediante H&E y LFB.

Con la tinción de H&E y LFB, se evaluaron los veinte casos estudiados ($n = 20$) y cinco ($n = 5$) controles negativos. Dentro de los veinte casos estudiados el 20% (4/20) presentaron lesiones agudas. Estas lesiones se caracterizaron por vacuolización focal en las laminillas cerebelosas y en la zona periventricular, acompañadas por un número reducido de cuerpos de inclusión, localizados principalmente en la zona periventricular y la piamadre. Además, se registraron congestión vascular y edema en sustancia blanca (**Figura 10C**)

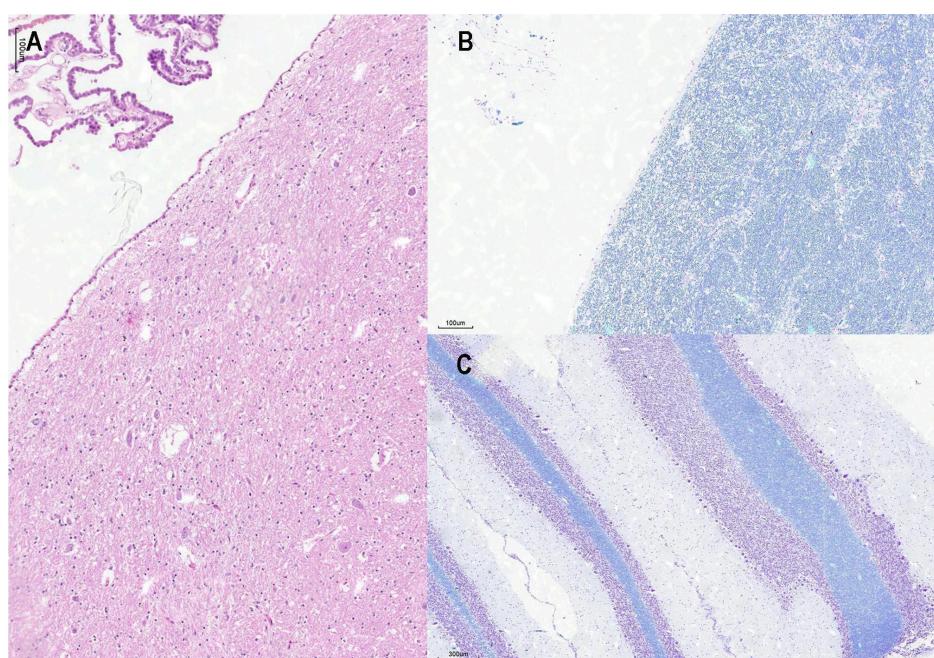


Figura 9. Imágenes histológicas de cortes de cerebelo en un canino del grupo control. A) Sustancia blanca periventricular sin cambios observables. H&E. B) Sustancia blanca periventricular sin evidencia de desmielinización. LFB. C) Laminillas cerebelosas sin alteraciones ni desmielinización. LFB. Escala = 100 μ m.

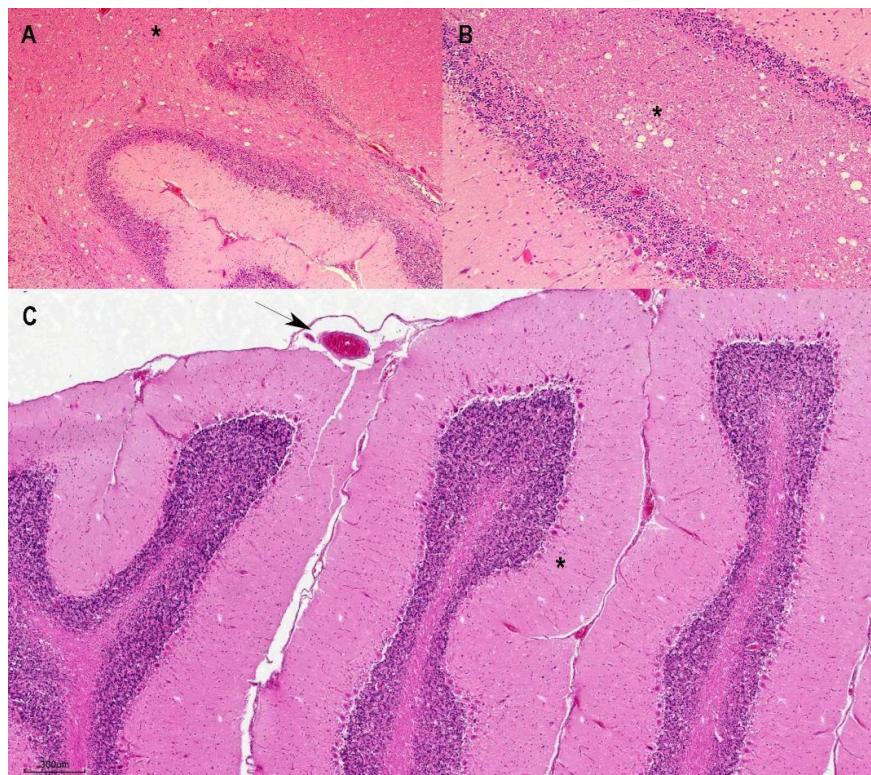


Figura 10. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo de canino teñidas con H&E. A y B) Canino con lesión aguda en laminillas del cerebelo caracterizada por vacuolización focal (asterisco) en la sustancia blanca. C) Congestión vascular (flecha) y edema en sustancia blanca (asterisco). Escala = 1000 μ m.

El grupo con lesiones subagudas correspondió al 65% (13/20) de los casos y se caracterizó por una marcada desmielinización (**Figura 11**), cuerpos de inclusión de CDV (**Figura 12**), gliosis extensa y manguitos perivasculares compuestos por 2 a 3 capas de células inflamatorias mononucleares.

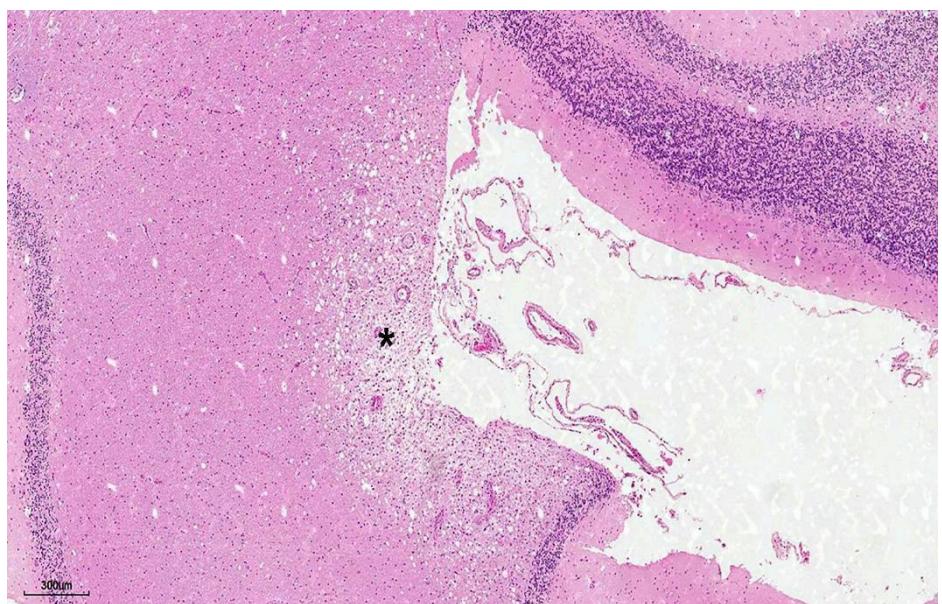


Figura 11. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. A) Se observa lesión subaguda, donde se evidencia una región periventricular con desmielinización, evidenciada por áreas claras indicando la pérdida de mielina en el tejido nervioso (asterisco). Escala = 40 μ m.

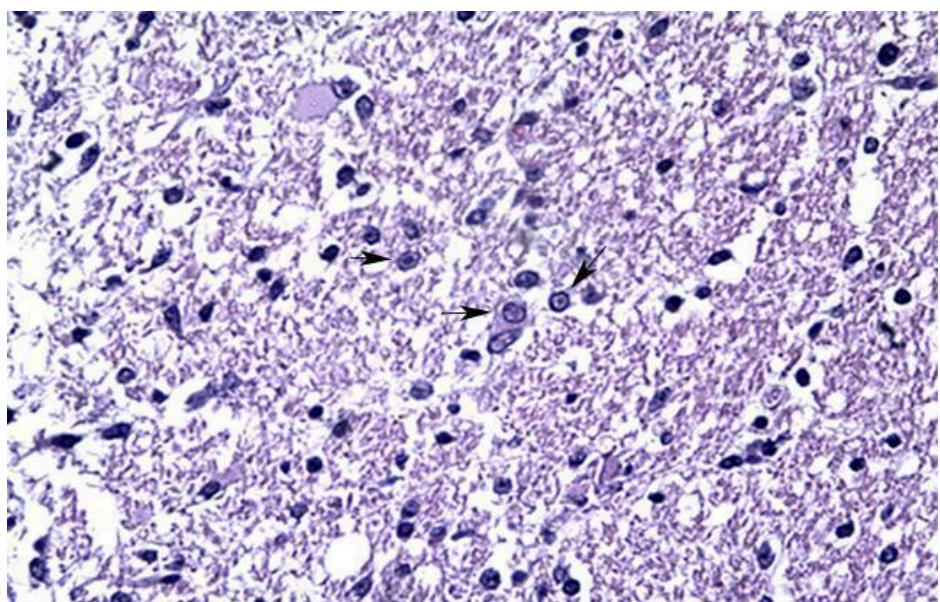


Figura 12. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. Cuerpo de inclusión intranuclear (flecha) en parénquima cerebeloso. H&E, Escala = 100 μ m.

En base a este resultado, y teniendo en cuenta que la mayoría de las muestras presentaban daños subagudos, tomamos como referencia lo descrito en Verdes, Larrañaga, Godiño et al., 2024 y subdividimos los cambios subagudos en función del grado de desmielinización determinado por la tinción LFB para homogeneizar los grupos.

El uso de la tinción de LFB permitió evidenciar el grado de desmielinización en las áreas periventriculares y en la sustancia blanca del cerebelo. Dentro de este grupo, el 25% (5/20) de los casos correspondieron al subgrupo subagudo 1, el 15% (3/20) al subgrupo subagudo 2, y el restante 25% (5/20) al subgrupo subagudo 3.

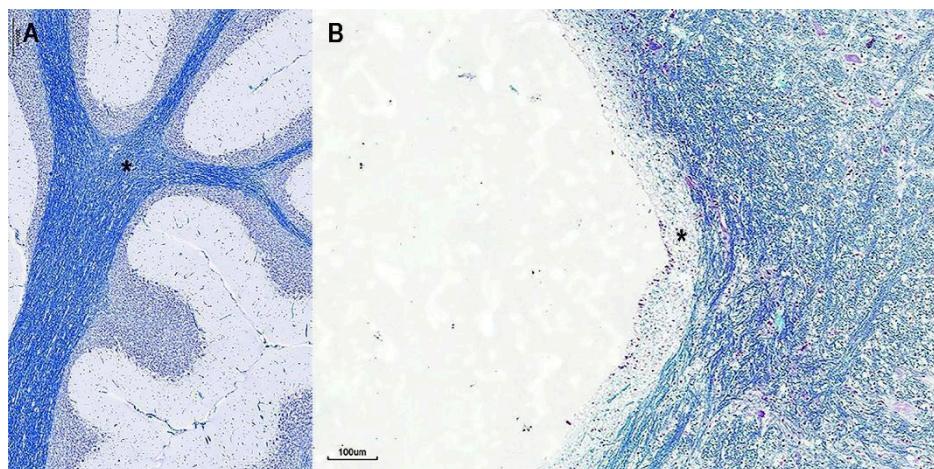


Figura 13. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 1 con leve desmielinización sustancia blanca (asterisco), escala = 40 μ m. B) Obsérvese la desmielinización periventricular en sustancia blanca, caracterizada por una menor intensidad de la tinción azul (asterisco), escala = 100 μ m.

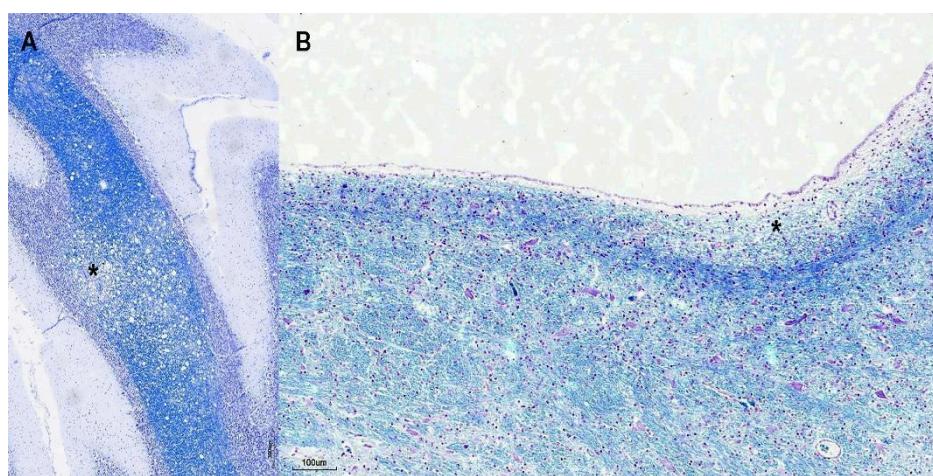


Figura 14. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 2 con foco de desmielinización en sustancia blanca del cerebelo (asterisco), escala = 40 μ m. B) Presencia de desmielinización en zona periventricular evidenciada por la pérdida de coloración azulada característica de la mielina (asterisco), escala = 100 μ m.

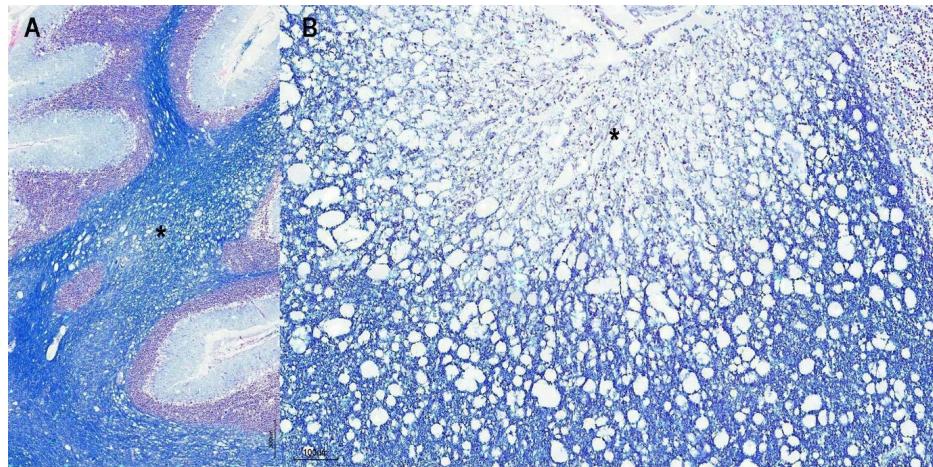


Figura 15. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con LFB. A) Corte de cerebelo de canino perteneciente al grupo subagudo 3 con una extensa desmielinización en sustancia blanca del cerebelo (asterisco) escala = 40 μ m. B) Desmielinización severa en la región periventricular, caracterizada por una marcada pérdida de la coloración azulada representativa de la mielina (asterisco), escala = 100 μ m.

El 15 % de los casos (3/20) fueron clasificados como crónicos, ya que presentaban lesiones similares a las del grupo subagudo, pero con mayor severidad. Se observó necrosis parenquimatosa (**Figura 16**), predominantemente leucoencefalomalacia y, en menor medida, polioencefalomalacia, junto con un grado más avanzado de desmielinización (y un mayor número de neuronas necróticas. Además, en el parénquima cerebeloso se identificaron manguitos perivasculares con al menos tres capas de células linfoplasmocitarias (**Figura 17C**).

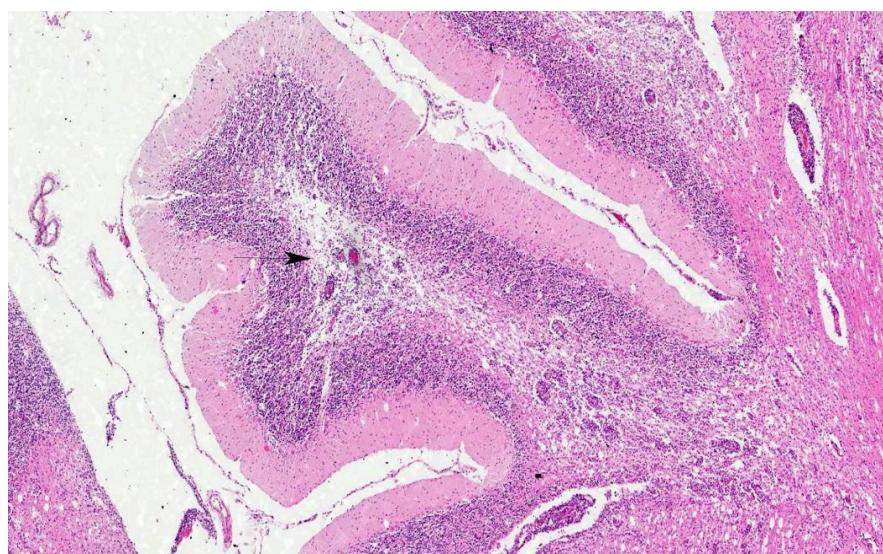


Figura 16. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo teñidas con H&E. Animal del grupo crónico con necrosis en sustancia blanca (flecha) acompañado de manguitos perivasculares. escala = 40 μ m.

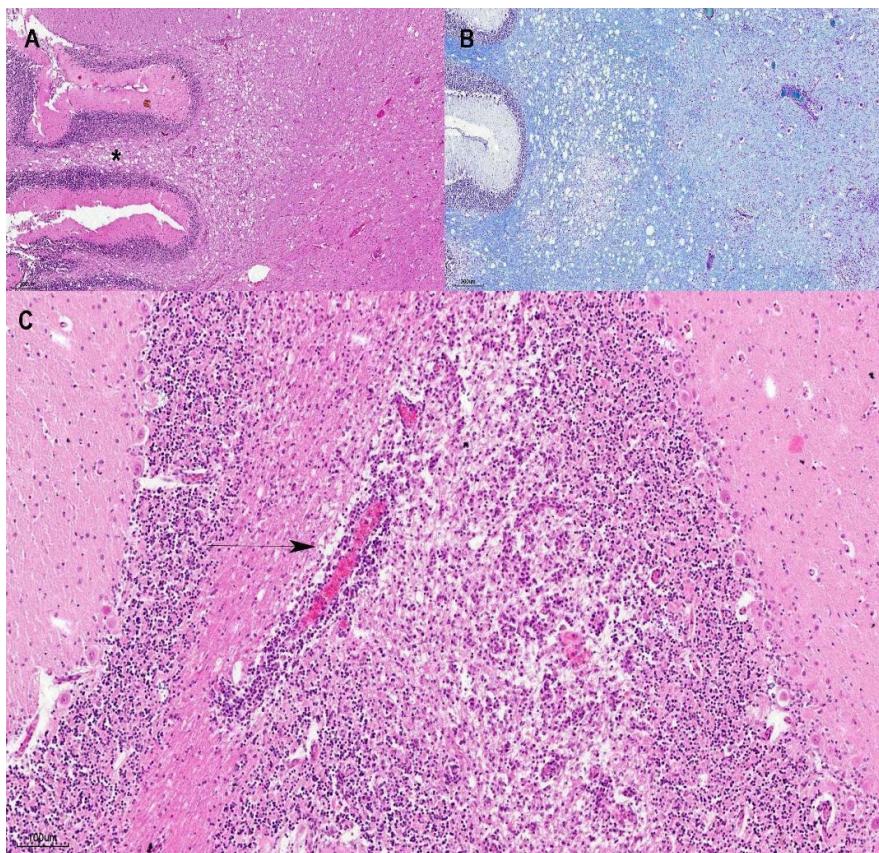


Figura 17. Imágenes de preparados histológicos de cortes de cerebelo. A) Desmielinización entre las laminillas del cerebelo en sustancia blanca (asterisco). H&E. escala = 40 μ m. B) La desmielinización se identifica por la pérdida de coloración azulada característica de la mielina. LFB, escala = 40 μ m. C) Se observa manguito perivascular en el parénquima cerebral (flecha). H&E, escala = 100 μ m.

8.5. Análisis de resultados

8.5.1 Relación entre las lesiones histopatológicas con la edad, raza y el sexo

No se identificó una asociación significativa entre la presencia de lesiones histopatológicas y la edad de los perros analizados. Por ejemplo, el canino número 18, con apenas 3 meses de edad, presentó signos de desmielinización junto con lesiones histológicas características de la etapa crónica según la clasificación histopatológica, lo que evidencia la ausencia de asociación entre la etapa de la enfermedad y la edad.

De manera similar, no se encontró relación entre el sexo de los caninos y la severidad o distribución de las lesiones, ya que la distribución de los individuos según el sexo era equitativa.

Por último, tampoco se encontró una asociación con la raza, dado que la mayoría de los caninos incluidos eran mestizos, y no se identificó una predisposición hacia una raza en particular.

Estos análisis se basaron en la observación directa de los datos, sin aplicación de pruebas estadísticas formales.

8.5.2 Comparación de la clasificación histopatológica con la carga viral

Se llevó a cabo una comparación entre la clasificación histopatológica y los valores de carga viral obtenidos mediante ddPCR, revelando una notable heterogeneidad en los promedios de carga viral.

Tabla 3. Hallazgos histopatológicos, carga viral mediante ddPCR y cuadro clínico en casos de CDV

Nº	Reseña		Histopatología ddPCR			Promedio carga viral (copias/ 20 μL) individual	CV carga individual	Cuadro clínico antemortem
	Canino	Edad	Raza	Sexo	HE/LFB			
1	6 años	Mestizo	Macho	Agudo		Baja	1,30	Digestivo, Respiratorio y Nervioso. Secreción ocular.
2	2 años	Mestizo	Macho	Agudo		Alta	0,14	Respiratorio, neurológico (mioclonía).
3	1 año	Mestizo	Macho	Agudo		Baja	0,32	Neurológico.
4	3 años	Caniche	Hembra	Agudo		Alta	0,37	Digestivo (anorexia, vómitos y diarrea), Neurológico (paraparesia).
5	30 días	Mestizo	Macho	Subagudo 1		Baja	0,11	Sin datos.
6	3 años	Mestizo	Hembra	Subagudo 1		Baja	1,09	Respiratorio, neurológico (ataxia y mioclonías).
7	3 años	Mestizo	Hembra	Subagudo 1		Baja	0,92	Respiratorio y digestivo.
8	Sin datos	Sin datos	Macho	Subagudo 1		Alta	0,68	Sin datos.
9	1 año	Mestizo	Macho	Subagudo 1		Alta	0,38	Neurológico (cuadriplejia y mioclonías).
10	3 meses	Sin datos	Macho	Subagudo 2		Alta	0,99	Sin datos.
11	3 meses	Mestizo	Hembra	Subagudo 2		Baja	0,36	Digestivo y neurológico.
12	2 meses	Mestizo	Hembra	Subagudo 2		Alta	0,90	Neurológico (vocalizaciones)
13	7 meses	Mestizo	Macho	Subagudo 3		Alta	0,044	Respiratorio y digestivo (Ictericia).
14	3 años	Sin datos	Hembra	Subagudo 3		Alta	0,020	Neurológico.
15	3 meses	Mestizo	Macho	Subagudo 3		Alta	0,49	Respiratorio, digestivo y

16	3 años	Mestizo	Hembra	Subagudo 3	Alta	0,05	neurológico. Neurológico (mioclonías).
17	1 año	Mestizo	Hembra	Subagudo 3	Alta	0,31	Secreción ocular, Neurológico (convulsiones y mioclonías), digestivo (anorexia).
18	3 meses	Sin datos	Hembra	Crónico	Alta	0,11	Sin datos
19	8 años	Pitbull	Hembra	Crónico	Alta	0,50	Respiratorio (secreción nasal purulenta), neurológico (mioclonias).
20	4 años	Mestizo	Macho	Crónico	Alta	0,46	Secreción ocular, fiebre, digestivo (hiporexia), neurológico (ataxia, paraplejia y mioclonías), dermatológico (hiperqueratosis nasal)
-	6 años		Hembra	Control	-	-	-
-	3 meses		Macho	Control	-	-	-
-	45 días		Hembra	Control	-	-	-
-	1 año		Hembra	Control	-	-	-
-	3 años		Macho	Control	-	-	-
-	9 años		Macho	Control	-	-	-

El análisis estadístico realizado tuvo como objetivo comparar la carga viral en el cerebelo con las lesiones histopatológicas, evaluando la relación entre ambas variables con el estadio de lesión histopatológica (Agudo, Subagudo 1, Subagudo 2, Subagudo 3 y Crónico). Utilizando la prueba de Kruskal-Wallis obtuvimos que no existieron diferencias significativas, lo que indica que las desviaciones estándar no difieren significativamente entre los grupos. Adicionalmente se realizó un análisis de correlación entre la carga viral (promedio) y la escala de daño utilizando el coeficiente de correlación de *Spearman*. Los resultados obtenidos fueron un valor *S* de 949.47 y un valor *p* de 0.02966. Dado que *p* < 0.05, se puede concluir que existe una correlación estadísticamente significativa entre la carga viral y la escala de daño. El coeficiente de correlación de *Spearman* (*rho*) fue de 0.542, lo que indica una correlación moderada y positiva. Esto sugiere que a medida que aumenta la carga viral, también tiende a incrementarse el daño en el cerebelo, que oscila entre 1 y 5 (donde 1 es agudo; 2 subagudo 1; 3 subagudo 2; 4 subagudo 3 y 5 daño crónico)

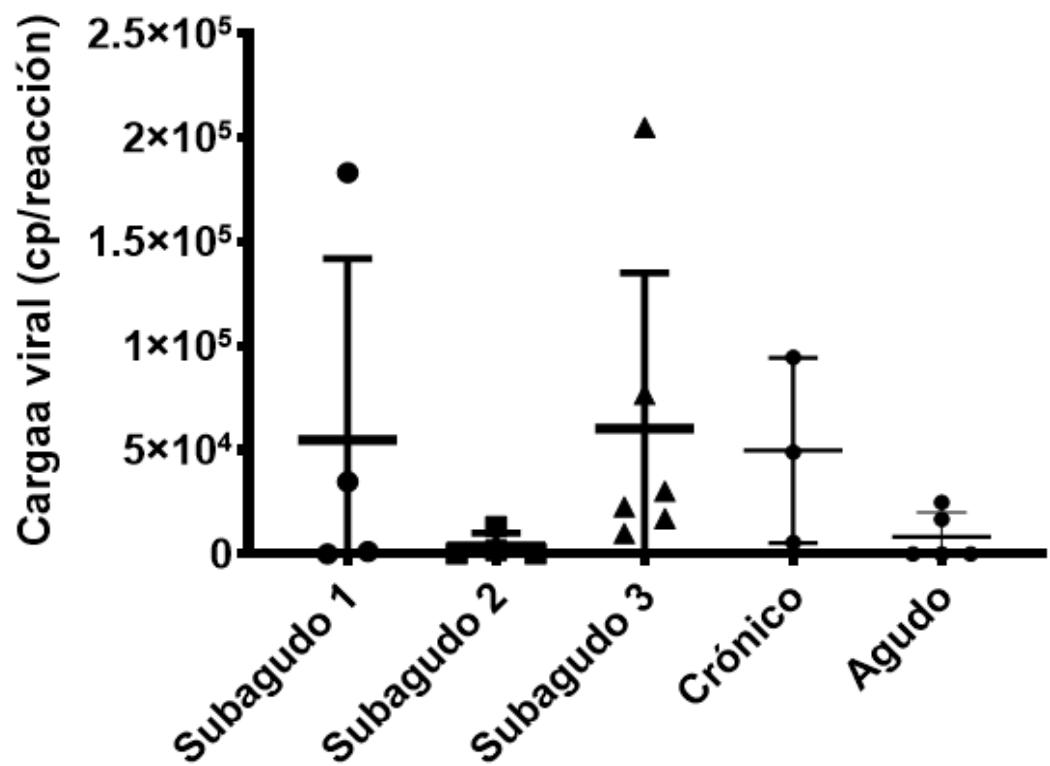


Figura 18. Gráfico de carga viral (copias/ reacción) para los niveles de clasificación histopatológica. En el eje X se representan las categorías de la clasificación histopatológica (Subagudo 1, Subagudo 2, Subagudo 3, Crónico y Agudo), mientras que en el eje Y se muestra la carga viral expresada en copias por reacción.

9. DISCUSIÓN

En este estudio, enfocado en la infección natural producida por CDV, se analizaron 20 casos, con una distribución equitativa entre sexos (10 machos y 10 hembras). En cuanto a la raza, el 65 % (14/20) correspondió a caninos mestizos, un resultado que coincide con lo reportado por Vicente et al., 2010, quienes observaron una mayor incidencia de esta enfermedad en caninos mestizos, probablemente debido a su predominancia en poblaciones no controladas o con acceso limitado a medidas de prevención, como la vacunación.

La población analizada presentó una distribución de edad amplia, desde cachorros de 30 días hasta caninos de 8 años, siendo el 30 % (6/20) menores de seis meses. Según Summers et al., 1984, la edad es un factor que puede influir en la gravedad de la enfermedad, ya que los cachorros cuentan inicialmente con inmunidad pasiva transferida por la madre, la cual disminuye progresivamente, aumentando su susceptibilidad a la infección (dos Santos et al., 2016). En este contexto, Sonne et al., 2009 subraya que los caninos domésticos de entre dos y seis meses son especialmente propensos a contraer el CDV.

Otro hallazgo relevante fue que los caninos incluidos en el presente estudio no contaban con un esquema de vacunación vigente, lo que explica en gran parte la gravedad de los casos que culminaron en muerte espontánea o eutanasia. La eficacia de la vacunación para prevenir la infección por CDV ha sido ampliamente documentada (Martella et al., 2008; Loots et al., 2017), y Tipold et al., 1992 enfatizan que los caninos no vacunados presentan un riesgo significativamente mayor de desarrollar la enfermedad. En Uruguay, estudios epidemiológicos realizados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (Lariccia & Kramer, 2018) confirman que el CDV mantiene un carácter endémico, lo que sugiere una mayor exposición viral en el entorno y un impacto negativo en animales domésticos no vacunados.

En relación con los signos clínicos, todos los animales evaluados presentaron uno o más signos multisistémicos asociados a la enfermedad causada por el CDV. Adicionalmente, se registraron signos neurológicos, que aparecieron tanto de manera aislada como en combinación con otros signos clínicos. Sin embargo, la metodología de este estudio no permitió determinar si los signos neurológicos se manifestaron antes, después o de forma simultánea con los signos multisistémicos, ya que los datos fueron obtenidos al ingreso de los cadáveres al servicio diagnóstico de patología. Este enfoque contrasta con el trabajo de Feijóo, 2020, quien realizó un seguimiento prospectivo de 48 caninos con signos clínicos compatibles con CDV, logrando documentar la progresión de los signos clínicos. En su estudio, 20 animales sobrevivieron durante el periodo de observación, mientras que 28 fallecieron o fueron eutanasiados debido a cuadros clínicos graves.

En nuestro análisis, el signo neurológico más frecuente fue la presencia de mioclonias, lo cual coincide tanto con lo reportado por Feijóo, 2020 como con lo descrito por otros autores (Koutinas et al., 2002; Silva et al., 2007), reafirmando su relevancia como uno de los hallazgos clínicos característicos de la infección por CDV.

Nuestro estudio se centró en evaluar las lesiones microscópicas producidas por el CDV en el cerebelo dado que es el lugar del SNC que se ve mayormente afectado y las lesiones son más severas (Summers et al. 1979; Vandevelde et al. 1981; Silva et al. 2009; Feijóo, 2020; Feijóo et al., 2021). De igual manera se reporta que el CDV genera lesiones multifocales en el SNC (Summers et al. 1979; Vandevelde et al. 1981; Silva et al. 2009). Amude et al., 2011 menciona una presentación atípica donde se observa mayor afectación en el cerebro.

El análisis histopatológico de los veinte casos estudiados se realizó según lo establecido por Vandevelde et al., 1981 y como resultado obtuvimos 4 casos agudos, 13 casos subagudos y 3 casos crónicos. Nuestros resultados coinciden con los resultados obtenidos por Kabakci et al., 2004 y Headley et al., 2001, quienes, trabajando también en caninos domésticos infectados naturalmente, observaron resultados similares a los que obtuvimos nosotros. Sin embargo, nuestros resultados difieren con lo obtenido por Feijóo, 2020 donde no se clasificó ningún animal en la etapa aguda. En base a la metodología empleada por Feijóo, 2020, las diferencias con nuestros resultados podrían deberse a varios factores. Feijóo estudió 39 caninos infectados naturalmente con CDV, de los cuales 17 estaban vacunados, lo que podría haber influido en la respuesta inmunológica de parte de los animales, disminuyendo la aparición de la etapa aguda. Además, el rango de edad (de 2 meses a 8 años) incluye animales con sistemas inmunes diferentes, lo que también podría haber afectado la presentación clínica de la enfermedad. Además, las cepas de CDV pueden variar en virulencia, lo que afectaría la presentación clínica de la enfermedad (Summers et al., 1984).

Siguiendo con la misma línea, encontramos que la gran mayoría de nuestros casos estaban clasificados con lesiones subagudas y esto generaba una heterogeneidad entre los grupos, por eso decidimos tomar como referencia lo publicado en Verdes, Larrañaga, Godíño et al., 2024 para poder lograr una distribución homogénea entre los grupos dado que ellos dividieron la clasificación en base a la desmielinización. Finalmente obtuvimos que estudiados el 25% (4/20) presentaron lesiones agudas, el 65% (13/20) presentaba lesiones subagudas y dentro de este grupo, el 25% (5/20) de los casos correspondieron al subgrupo subagudo 1, el 15% (3/20) al subgrupo subagudo 2, y el restante 25% (5/20) al subgrupo subagudo 3 y finalmente el 15% (3/20) de los casos fueron clasificados como crónicos. Esta nueva clasificación resultó más precisa para la clasificación de los casos subagudos que la clasificación anterior.

El análisis histopatológico de los grupos estudiados permitió identificar cambios característicos asociados a la progresión del DC, destacando como hallazgos principales la vacuolización en las fases agudas de la enfermedad y la desmielinización multifocal en las etapas subagudas y crónicas. En particular, la desmielinización en el parénquima periventricular mostró una progresión evidente en cuanto a severidad y extensión, pasando de un compromiso moderado en las etapas subagudas a una afectación más extensa y severa en la fase crónica, donde se observaron áreas de desmielinización multifocal que alcanzaban incluso la corteza de las laminillas cerebelosas.

La desmielinización constituye uno de los cambios histopatológicos más representativos de esta enfermedad, siendo ampliamente caracterizada por diversos autores (Vandevelde et al., 1981; Alldinger et al., 2000; Moro et al., 2003; Kabakci et

al., 2004; Amude et al., 2007; Seehusen et al., 2007; Pan et al., 2013; Galán et al., 2014; Feijóo, 2020; Feijóo et al., 2021).

La literatura describe un proceso bifásico en la desmielinización asociada al CDV (Beineke et al., 2009). Durante las etapas iniciales, el daño a la mielina es predominantemente resultado de la acción directa del virus, mientras que, en fases posteriores, la contribución de factores inmunopatológicos desempeña un papel central en la progresión del daño (Vandervelde et al., 1981; Amude et al., 2007).

El genoma de ARN del CDV codifica seis proteínas estructurales: fusión (F), hemaglutinina (H), matriz (M), nucleocápside (N), polimerasa grande (L) y fosfoproteína (P). Entre ellas, el gen N que codifica para la proteína de la nucleocápside, se destaca por ser altamente conservado y se expresa de manera eficiente, lo que lo convierte en un blanco ideal para el diagnóstico y la investigación. Basándonos en esta característica, utilizamos RT-PCR convencional para la confirmación diagnóstica, amplificando un fragmento de 287 pb del gen N previamente descritos por Frisk et al., 1999. La técnica demostró ser altamente sensible y específica, permitiendo detectar el virus en todas las muestras estudiadas. Nuestros resultados coinciden con anteriores reportes (Gebara et al., 2004; Amude et al., 2006), por tanto, reafirmaron su eficacia en el diagnóstico *postmortem* del CDV.

Para cuantificar la carga viral, implementamos la ddPCR, una técnica innovadora que permite la medición absoluta y precisa de ácidos nucleicos. A diferencia de la qPCR, la ddPCR fragmenta la muestra en miles de sub-reacciones independientes generadas en nanogotas de emulsión en aceite, lo que elimina la necesidad de curvas estándar y aumenta la precisión de los resultados (Kalinina et al., 1997; Sykes et al., 1992; Kuypers et al., 2017; Quan et al., 2018). La utilidad de la ddPCR ha sido ampliamente demostrada en medicina humana (Strain et al., 2013; Kinugasa et al., 2015; Jeannot et al., 2016; Caviglia et al., 2018; Suo et al., 2019; Shuai et al., 2024) y veterinaria (Pinheiro-de-Oliveira et al., 2018; De Brun et al., 2022; Franco, 2022; Iribarnegaray et al., 2024)

Siguiendo la estandarización de Iribarnegaray et al., 2024, se implementó con éxito la metodología para detección y cuantificación del CDV en cerebelo, una región frecuentemente afectada por su afinidad por el SNC (Summers et al., 1979; Vandervelde et al., 1981; Summers et al., 1984; Silva et al., 2009; Rendón-Marín et al., 2019; Feijóo, 2020; Feijóo et al., 2021). La cuantificación mediante ddPCR mostró una alta variabilidad entre muestras, lo que sugiere que la carga viral podría influir en la gravedad de la infección.

El trabajo de Elia et al., 2006 subrayó la importancia de la RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico y cuantificación del CDV, destacando su superioridad sobre la RT-PCR convencional al lograr mayor sensibilidad y especificidad. Aunque ellos identifican el lóbulo frontal como un área con alta carga viral, nuestra investigación con ddPCR introduce una ventaja significativa al proporcionar una cuantificación absoluta y precisa sin necesidad de curvas estándar, lo que podría incrementar la precisión de los resultados. Cabe aclarar que el trabajo de ellos se centró en estudiar el cerebro y nosotros más allá que utilizamos otra tecnología, estudiamos el cerebelo.

De forma similar a los hallazgos de Elia et al., 2006 quienes reportaron altos niveles de ARN viral en tejidos linfoides y órganos internos, nuestros resultados refuerzan la comprensión de la propagación del virus en el SNC, destacando al cerebelo como una región clave con alta carga viral. La ddPCR, al igual que la RT-PCR en tiempo real, se presenta como una herramienta poderosa para profundizar en la patogénesis del CDV, proporcionando datos críticos para el avance de la investigación sobre la patogénesis, diagnóstico y tratamiento de la infección.

La carga viral fue determinada mediante digital PCR (ddPCR), mientras que la severidad de las lesiones histopatológicas se evaluó a partir del análisis de muestras cerebelosas, clasificadas en diferentes estadios de progresión: agudo, subagudo y crónico. Dado que los datos no presentaron una distribución normal, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar posibles diferencias en la carga viral entre los distintos grupos. Los resultados obtenidos no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual podría atribuirse a varias limitaciones presentes en este estudio. Con el objetivo de profundizar en la relación entre ambas variables y explorar una posible asociación continua entre la carga viral y la severidad de las lesiones histológicas, se empleó posteriormente el coeficiente de correlación de *Spearman*. Este análisis reveló una correlación positiva moderada y estadísticamente significativa ($p = 0.02966$) entre la carga viral y la puntuación de las lesiones histopatológicas en el cerebelo, lo que indica que a mayor carga viral se asocia un mayor grado de daño en cerebelo, especialmente en los casos clasificados como crónicos.

Entre las principales limitaciones del presente trabajo, cabe destacar que el número total de muestras analizadas ($n = 20$) fue relativamente bajo, lo que pudo haber restringido la potencia estadística del análisis para detectar diferencias significativas entre grupos. A su vez, los subgrupos establecidos en función de los estadios histopatológicos estuvieron compuestos por pocos casos, lo que limita aún más la precisión de las comparaciones realizadas.

Asimismo, este hallazgo también puede explicarse a partir de diversos factores que influyen en la patogénesis del virus y en la respuesta del huésped. Uno de los aspectos clave es la heterogeneidad de la población analizada. Se incluyeron caninos con un amplio rango de edad, desde cachorros de 30 días hasta caninos de 8 años, lo que implica diferencias en el desarrollo inmunológico y en la capacidad de respuesta ante la infección. Los caninos jóvenes, especialmente aquellos menores de tres meses, pueden presentar una inmunidad inmadura y ser más susceptibles a la infección del CDV mientras que los adultos podrían desarrollar respuestas inmunológicas más eficientes que modulen la progresión de la enfermedad, sin necesariamente reflejarse en una mayor carga viral en el tejido nervioso. Asimismo, el hecho de que el 65% de los casos corresponde a animales mestizos y que solo un pequeño porcentaje perteneciera a razas definidas podría influir en la susceptibilidad individual al CDV. Otro factor importante es la ausencia de un plan de vacunación vigente en todos los casos analizados. La vacunación es un factor clave en la prevención contra el CDV, ya que permite una respuesta inmune más rápida y eficiente ante la exposición. En individuos no vacunados, la respuesta inmune puede ser altamente variable y estar influenciada por diversos factores, como el estado nutricional, estrés y el hacinamiento, entre otros. Esto podría explicar por qué algunos animales presentan altas cargas virales sin una correlación clara con la severidad del daño histopatológico.

Alldinger et al., 1993 postulan que la cantidad de antígeno viral detectable en el SNC de los caninos con encefalitis por CDV disminuye a medida que avanza la enfermedad, mostrando una correlación inversa con el grado de inflamación. Este hallazgo sugiere que la respuesta inflamatoria juega un papel fundamental en la regulación de la expresión de las proteínas virales. En primer lugar, la inflamación asociada a las lesiones influye directamente en la expresión de las proteínas virales, en las áreas con inflamación severa, la inmunorreactividad de los antígenos virales se reduce significativamente o incluso desaparece. Además, otro mecanismo relevante es la modulación antigénica mediada por anticuerpos anti-CDV, los cuales pueden neutralizar el virus en el espacio extracelular y limitar su propagación entre las células, este proceso podría explicar la disminución de la expresión de proteínas virales en regiones cerebrales como el cerebelo a medida que la enfermedad progresá.

La presencia de signos neurológicos en la mayoría de los casos es consistente con el neurotropismo del CDV, sin embargo, el hecho de que algunos individuos presenten signos clínicos predominantemente digestivos o respiratorios indica que el virus tiene un comportamiento multi-sistémico, lo que podría influir en la distribución de la carga viral en distintos tejidos y en la forma en que se desarrollan las lesiones histológicas. Además, podría decirse que la gravedad de las lesiones histopatológicas no necesariamente refleja la cantidad de virus presente en el tejido, dado que la patogénesis del CDV es compleja y está determinada por la virulencia de la cepa, la edad del animal y su estado inmunológico (Ludlow et al., 2014; Martella et al., 2008; Miele et al., 1983).

Summers et al., 1984 demostraron que la progresión de la infección por CDV está influenciada por la cepa viral, con diferencias significativas entre cepas como Snyder Hill, A75-17 y R252. La cepa Snyder Hill se asocia con una enfermedad más aguda y letal, caracterizada por una rápida afectación de la sustancia gris y la aparición de convulsiones terminales. En contraste, las cepas A75-17 y R252 producen una evolución más lenta, con lesiones predominantemente en la sustancia blanca y un curso clínico más prolongado, permitiendo la persistencia del virus en el SNC. Estos hallazgos sugieren que la cepa viral podría estar directamente relacionada con el daño tisular, independientemente de la carga viral, lo que indicaría que factores como la virulencia del virus y la respuesta inmune del huésped juegan un papel más determinante en la severidad de las lesiones histopatológicas.

Es importante considerar que la información disponible en algunos casos era limitada, lo que pudo haber afectado la interpretación de la evaluación entre la progresión de la enfermedad y los hallazgos histopatológicos. La ausencia de registros detallados en ciertos individuos impide establecer un panorama completo de la evolución clínica de cada caso, lo que podría influir en la identificación de patrones entre la carga viral y el daño tisular observado.

El estudio de Jeannot et al., 2016 utilizó la misma tecnología de PCR digital para detectar y cuantificar el ADN circulante del virus del papiloma humano (c-HPV) en pacientes con cáncer invasivo asociado a HPV16 y HPV18. Su estudio incluyó 70 muestras de suero de pacientes con cáncer de cuello uterino (47 casos), cáncer anal (15 casos) y cáncer de cabeza y cuello (8 casos), además de 18 controles negativos

con neoplasia intra-epitelial cervical de alto grado (CIN3). A diferencia de nuestro estudio sobre infección natural inducida por el CDV, en este caso sí se encontró una correlación significativa entre la carga viral y la progresión de la enfermedad. Los niveles de ADN del virus se incrementaron notablemente a medida que avanzaba el estadio clínico del tumor, especialmente entre los estadios I y II. Además, Jeannot et al., 2016 contaron con un número de muestras ($n = 70$) más grande que nuestro estudio, lo que pudo haberles permitido detectar asociaciones más claras. En nuestro caso, el número reducido de muestras, junto con la subdivisión en estadios histopatológicos, pudo haber limitado la capacidad de identificar una clasificación estadísticamente significativa entre la carga viral y las lesiones histopatológicas.

Por otro lado, el estudio realizado por Ruedas-Torres et al., 2024 analizó la patogénesis de diferentes coronavirus entéricos porcinos en 24 lechones destetados de 3 semanas de edad, distribuidos en cuatro grupos experimentales. Mediante el uso de RT-qPCR se cuantificó la carga viral en heces, mientras que el análisis inmunohistoquímico permitió evaluar la expresión de antígenos virales y la respuesta inmune en las secciones intestinales. Se encontró una correlación positiva significativa entre la carga viral y el ancho de las vellosidades en duodeno, yeyuno e íleon, mientras que la altura de las vellosidades y la relación vellosidad/cripta mostraron una correlación negativa significativa con la carga viral en heces.

Los resultados obtenidos mostraron una correlación positiva moderada y estadísticamente significativa ($p = 0.49$; $p = 0.02966$), lo que indica que a mayor carga viral, se asocia un mayor grado de daño tisular, particularmente en los casos clasificados como crónicos. Este hallazgo sugiere que, a pesar de la ausencia de diferencias significativas entre grupos en el análisis de Kruskal-Wallis, puede existir una relación continua entre la replicación viral y la progresión del daño histopatológico, lo que refuerza la necesidad de complementar los análisis comparativos con estudios de correlación para captar mejor la dinámica de la infección.

En comparación con nuestro estudio, aunque ambos utilizaron RT-qPCR para cuantificación viral e inmunohistoquímica para la evaluación de la expresión de marcadores, existen diferencias claves. Mientras que el estudio de Ruedas-Torres et al., 2024 se centró en una infección experimental con un mayor número de animales ($n=24$), nuestro estudio evaluó una infección natural, pero con un número de muestras ($n=20$). Además, en su estudio, la correlación entre la carga viral y el daño tisular fue clara y significativa, lo que podría deberse a la estandarización de la infección experimental y al mayor número de muestras analizadas en cada subgrupo. En nuestro caso, la variabilidad propia de una infección natural, junto con el reducido tamaño de los subgrupos histopatológicos, pudo haber influido en la falta de una correlación estadísticamente significativa.

Estos estudios sugieren que podría existir una posible relación entre la carga viral y las lesiones microscópicas, aunque la magnitud de esta asociación parece estar influenciada por varios factores. Específicamente, dicha relación podría variar considerablemente según el modelo experimental utilizado y el tipo de patógeno que se esté investigando. La naturaleza del virus, su capacidad para replicarse, así como la respuesta inmune del organismo hospedador, son elementos clave que pueden determinar la extensión del daño en los tejidos.

Para futuras investigaciones es fundamental aumentar el número de muestras para mejorar la representatividad de los datos y permitir conclusiones más claras y que resulten coherentes con la hipótesis planteada originalmente, o que nos permitieran dilucidar la interacción entre los diferentes factores que influyen en la patogenia de esta infección. Además, homogeneizar factores como la edad, el sexo, la raza y los signos clínicos entre los caninos seleccionados podría contribuir a reducir sesgos y aumentar la precisión de los resultados. Por otro lado, un análisis más detallado de las cepas virales involucradas y su interacción con el organismo podría ayudar a comprender mejor la severidad de las lesiones microscópicas a nivel del SNC, lo cual podría abrir nuevas vías para el control y prevención de la infección natural producida por el CDV.

10. CONCLUSIÓN

La presente investigación permitió caracterizar la infección natural por CDV en una población de 20 caninos domésticos, analizando las lesiones producidas a nivel microscópico en el SNC y su relación con la carga viral mediante ddPCR. Los resultados obtenidos refuerzan la importancia del CDV como agente de alta mortalidad en poblaciones caninas sin vacunación vigente.

El análisis microscópico evidenció que la mayoría de los casos presentaron lesiones subagudas, con una progresión caracterizada por vacuolización en la etapa aguda y desmielinización multifocal en etapas subagudas y crónicas. La aplicación de una clasificación más detallada basada en los niveles de desmielinización permitió una evaluación más precisa de la evolución de la enfermedad.

Desde el punto de vista molecular, la detección del CDV mediante RT-PCR convencional fue altamente sensible y permitió la confirmación diagnóstica en todos los casos. Asimismo, la implementación de la ddPCR proporcionó una cuantificación precisa de la carga viral, consolidando su utilidad como herramienta innovadora en el estudio del CDV. Sin embargo, los análisis estadísticos no evidenciaron una correlación significativa entre la carga viral y la severidad de las lesiones histopatológicas, lo que sugiere que múltiples factores, como la respuesta inmune del huésped, la edad, el estado nutricional y la variabilidad en la virulencia de las cepas virales, podrían influir en la progresión de la enfermedad.

Este estudio aporta información relevante sobre la patogénesis del CDV en caninos domésticos y reafirma la importancia del cerebro como sitio clave en la infección. La combinación de técnicas histopatológicas con herramientas de biología molecular permitió una caracterización más integral.

La implementación de la ddPCR se presenta como una alternativa sólida para estudios futuros, facilitando un análisis más preciso en la detección y cuantificación viral.

Finalmente, estos hallazgos subrayan la necesidad de reforzar estrategias de prevención y control del CDV, especialmente a través de la vacunación, para reducir el impacto de esta enfermedad en la población de caninos domésticos.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, K. A., McNutt, J. W., Briggs, M. B., Standers, P. E., Funston, P., Hemson, G., Keet, D., & van Vuuren, M. (2010). Multi-host pathogens and carnivore management in southern Africa. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 33(3), 249–265. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.10.005>
- Alldinger S, Fonfara S, Kremmer E, Baumgärtner W. Up-regulation of the hyaluronate receptor CD44 in canine distemper demyelinated plaques. *Acta Neuropathol*. 2000 Feb;99(2):138-46. doi: 10.1007/pl00007417
- Amude, A.M., Alfieri, A.A., & Alfieri, A.F. (2006). Antemortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in dogs with distemper and neurological deficit without the typical clinical presentation. *Veterinary research communications*, 30, 679-687.
- Amude, A.M., Alfieri, A.A., & Alfieri, A.F. (2007). Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presenting without characteristic signs of the disease. *Veterinary Science Research*, 82 (3), 416-422.
- Amude, A. M., Headley, S. A., Alfieri, A. A., Beloni, S. N. E., & Alfieri, A. F. (2011). Atypical necrotizing encephalitis associated with systemic canine distemper virus infection in pups. *Journal of veterinary science*, 12(4), 409-411.
- Amundson, T.E., & Yuill, T.M. (1981). Prevalence of selected microbial pathogens in red foxes (*Vulpes fulva*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) in southwestern Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases*, 17 (1), 17-22.
- An, D.J., Kim, T.Y., Song, D.S., Kang, B.K., & Park, B.K. (2008). An immunochromatographic assay for rapid ante-mortem diagnosis of dogs suspected of having canine distemper. *Journal of virological methods*, 147 (2), 244-249.
- Anis, E., Holford, A.L., Galyon, G.D., & Wilkes, R.P. (2018). Antigenic analysis of genetic variants of canine distemper virus. *Veterinary Microbiology*, 219, 154-160.
- Appel, M., & Robson, D. S. (1973). A microneutralization test for canine distemper virus. *American journal of veterinary research*, 34(11), 1459–1463.
- Appel, M. J., Reggiardo, C., Summers, B. A., Pearce-Kelling, S., Maré, C. J., Noon, T. H., Reed, R. E., Shively, J. N., & Orvell, C. (1991). Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Archives of virology*, 119(1-2), 147–152. <https://doi.org/10.1007/BF01314331>
- Appel, M. J., Yates, R. A., Foley, G. L., Bernstein, J. J., Santinelli, S., Spelman, L. H., Miller, L. D., Arp, L. H., Anderson, M., & Barr, M. (1994). Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticicians, Inc*, 6(3), 277–288. <https://doi.org/10.1177/104063879400600301>
- Appel, M. J., & Summers, B. A. (1995). Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary microbiology*, 44(2-4), 187–191. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00011-x](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00011-x)
- Axthelm, M.K., & Krakowka, S. (1987). Canine distemper virus: early damage to the blood-brain barrier. *Acta neuropathologica*, 75 (1), 27-33.
- Baltimore, D. (1970). Viral RNA-dependent DNA polymerase: RNA-dependent DNA polymerase in RNA tumor virus virions. *Nature*, 226(5252), 1209-1211.
- Barrett, T. (1999). Morbillivirus infections, with special emphasis on carnivore morbilliviruses. *Veterinary Microbiology*, 69 (1-2), 3-13.

- Baumgärtner, W., Örvell, C., & Reinacher, M. (1989). Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathologica*, 78 (5), 504-512.
- Beineke, A., Puff, C., Seehusen, F., & Baumgärtner, W. (2009). Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 127 (1-2), 1-18.
- Bispo da Silva, A., Cerqueira Coelho, P. L., Alves Oliveira Amparo, J., Alves de Almeida Carneiro, M. M., Pereira Borges, J. M., Dos Santos Souza, C., Dias Costa, M. F., Mecha, M., Guaza Rodriguez, C., Amaral da Silva, V. D., & Lima Costa, S. (2017). The flavonoid rutin modulates microglial/macrophage activation to a CD150/CD206 M2 phenotype. *Chemico-biological interactions*, 274, 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2017.07.004>
- Blixenkrone-Møller, M., Svansson, V., Have, P., Bøtner, A., & Nielsen, J. (1989). Studies of infection in mink with seal-derived morbillivirus. *Archives of Virology*, 106, 165-170.
- Budaszewski, R.daF., Pinto, L. D., Weber, M. N., Caldart, E. T., Alves, C. D., Martella, V., Ikuta, N., Lunge, V. R., & Canal, C. W. (2014). Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus research*, 180, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.024>
- Caswell, J. L., & Williams, K. J. (2007). Respiratory System In: Maxie MG, editor. *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th ed Philadelphia: Elsevier Ltd, 591-593.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi A., Billeter, M.A., & Cattaneo, R. (1998). A matrix-less meal virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *The EMBO journal*.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Bacsko, K., & Billeter, M.A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell*, 56(5), 759-764.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A., & Cattaneo, R. (1998). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *The EMBO journal*, 17(14), 3899–3908. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.14.3899>
- da Fontoura Budaszewski, R., & von Messling, V. (2016). Morbillivirus Experimental Animal Models: Measles Virus Pathogenesis Insights from Canine Distemper Virus. *Viruses*, 8(10), 274. <https://doi.org/10.3390/v810027>
- De Brun, M. L., Cosme, B., Petersen, M., Alvarez, I., Folgueras-Flatschart, A., Flatschart, R., Panei, C. J., & Puentes, R. (2022). Development of a droplet digital PCR assay for quantification of the proviral load of bovine leukemia virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticicians, Inc*, 34(3), 439–447. <https://doi.org/10.1177/10406387221085581>
- dos Santos, M.H., Cabral, L.A.R., Martins, P.L., & Costa, P.P.C. (2016). Morte de cão imunossuprimido por cinomose: relato de caso. *Revista Brasileira de Higiene e Saúde Animal*, 10 (1), 117-133.
- Decaro, N., Camero, M., Greco, G., Zizzo, N., Tinelli, A., Campolo, M., Pratelli, A., & Buonavoglia, C. (2004). Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *The new microbiologica*, 27(2), 177–181.
- Deem, S. L., Spelman, L. H., Yates, R. A., & Montali, R. J. (2000). Canine distemper in terrestrial carnivores: a review. *Journal of zoo and wildlife medicine : official*

- publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 31(4), 441–451. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0441:CDITCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0441:CDITCA]2.0.CO;2)
- Demeter, Z., Lakatos, B., Palade, E. A., Kozma, T., Forgách, P., & Rusvai, M. (2007). Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Veterinary microbiology*, 122(3-4), 258–269. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.001>
- Diallo A. (1990). Morbillivirus group: genome organisation and proteins. *Veterinary microbiology*, 23(1-4), 155–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90145-I](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90145-I)
- Dube, S., Qin, J., & Ramakrishnan, R. (2008). Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS one*, 3(8), e2876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002876>
- Elia, G., Decaro, N., Martella, V., Cirone, F., Lucente, M. S., Lorusso, E., Di Trani, L., & Buonavoglia, C. (2006). Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of virological methods*, 136(1-2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.05.004>
- Feijóo, G., Yamasaki, K., & Verdes, J. M. (2019). Lung lesions of non-vaccinated puppies affected by canine distemper virus. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 12(3), 83–87. <https://doi.org/10.24070/bjvp.1983-0246.v12i3p83-87>
- Feijóo Chácharo, G. (2020). *Distemper canino: seguimiento desde la presentación clínica hasta sus hallazgos histopatológicos e inmunohistoquímicos*. [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/28621>
- Feijóo, G., Yamasaki, K., Delucchi, L., & Verdes, J. M. (2021). Central nervous system lesions caused by canine distemper virus in 4 vaccinated dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticicians, Inc*, 33(4), 640–647. <https://doi.org/10.1177/10406387211009210>
- Feng, N., Yu, Y., Wang, T., Wilker, P., Wang, J., Li, Y., ... & Xia, X. (2016). Fatal canine distemper virus infection of giant pandas in China. *Scientific reports*, 6(1), 27518.
- Flacke, G., Becker, P., Cooper, D., Szykman Gunther, M., Robertson, I., Holyoake, C., Donaldson, R., Warren, K., An Infectious Disease and Mortality Survey in a Population of Free-Ranging African Wild Dogs and Sympatric Domestic Dogs, *International Journal of Biodiversity*, 2013, 497623, 9 pages, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/497623>
- Franco Moreno, G. (2022.). *Efecto de la ozonoterapia in-vitro y en caninos infectados naturalmente con protoparvovirus carnívoro 1 (CPPV -1)*. [Tesis de maestría, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Colibri. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/39771>
- Frisk, A. L., König, M., Moritz, A., & Baumgärtner, W. (1999). Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. *Journal of clinical microbiology*, 37(11), 3634–3643. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3634-3643.1999>
- Galán, A., Gamito, A., Carletti, B. E., Guisado, A., de las Mulas, J. M., Pérez, J., & Martín, E. M. (2014). Uncommon acute neurologic presentation of canine distemper in 4 adult dogs. *The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire canadienne*, 55(4), 373–378.
- Gebara, C. M. S., Wosiacki, S. R., Negrão, F. J., Alfieri, A. A., & Alfieri, A. F. (2004). Lesões histológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. *Arquivo*

- Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(2), 168–174. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000200005>.
- Griot, C., Vandevelde, M., Schobesberger, M., & Zurbriggen, A. (2003). Canine distemper, a re-emerging morbillivirus with complex neuropathogenic mechanisms. *Animal health research reviews*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1079/ahrr20047>
- Haig, D. A. (1953). Canine Distemper: Immunisation with Avianised Virus. *University of Pretoria* (South Africa).
- Hall, W. W., Lamb, R. A., & Choppin, P. W. (1980). The polypeptides of canine distemper virus: synthesis in infected cells and relatedness to the polypeptides of other morbilliviruses. *Virology*, 100(2), 433–449. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90534-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90534-6)
- Hartley W. J. (1974). A post-vaccinal inclusion body encephalitis in dogs. *Veterinary pathology*, 11(4), 301–312. <https://doi.org/10.1177/030098587401100403>
- Headley, S. A., Soares, I. C., & Graça, D. L. (2001). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. *Journal of comparative pathology*, 125(2-3), 90–97. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0483>
- Headley, S. A., Amude, A. M., Alfieri, A. F., Bracarense, A. P., Alfieri, A. A., & Summers, B. A. (2009). Molecular detection of Canine distemper virus and the immunohistochemical characterization of the neurologic lesions in naturally occurring old dog encephalitis. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticicians, Inc*, 21(5), 588–597. <https://doi.org/10.1177/104063870902100502>
- Higgins, R. J., Krakowka, S. G., Metzler, A. E., & Koestner, A. (1982). Primary demyelination in experimental canine distemper virus induced encephalomyelitis in gnotobiotic dogs. Sequential immunologic and morphologic findings. *Acta neuropathologica*, 58(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00692691>
- Iribarnegaray, V., Godiño, G., Larrañaga, C., Yamasaki, K., Verdes, J. M., & Puentes, R. (2024). Droplet Digital PCR Enhances Sensitivity of Canine Distemper Virus Detection. *Viruses*, 16(11), 1720. <https://doi.org/10.3390/v16111720>
- Jeannot, E., Becette, V., Campitelli, M., Calméjane, M. A., Lappartient, E., Ruff, E., Saada, S., Holmes, A., Bellet, D., & Sastre-Garau, X. (2016). Circulating human papillomavirus DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *The journal of pathology. Clinical research*, 2(4), 201–209. <https://doi.org/10.1002/cjp2.47>
- Kabakci, N., Yarim, M., Karahan, S., Guvenc, T., Yagci, B. B., & Gurcan, I. S. (2004). Immunohistochemical investigation of cerebellum in dogs infected with canine distemper virus. *Acta veterinaria Hungarica*, 52(3), 327–337. <https://doi.org/10.1556/AVet.52.2004.3.8>
- Kalinina, O., Lebedeva, I., Brown, J., & Silver, J. (1997). Nanoliter scale PCR with TaqMan detection. *Nucleic acids research*, 25(10), 1999–2004. <https://doi.org/10.1093/nar/25.10.1999>
- Karki, M., Rajak, K. K., & Singh, R. P. (2022). Canine morbillivirus (CDV): a review on current status, emergence and the diagnostics. *Virus disease*, 33(3), 309–321. <https://doi.org/10.1007/s13337-022-00779-7>

- Kim, YH, Cho, KW, Youn, HY, Yoo, HS, & Han, HR (2001). Detection of canine distemper virus (CDV) by single-step RT-PCR combined with nested PCR. *Journal of Veterinary Science*, 2 (1), 59-63.
- Kim, D., Jeoung, S. Y., Ahn, S. J., Lee, J. H., Pak, S. I., & Kwon, H. M. (2006). Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 68(8), 877–879. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.877>
- Kinugasa, H., Nouso, K., Tanaka, T., Miyahara, K., Morimoto, Y., Dohi, C., Matsubara, T., Okada, H., & Yamamoto, K. (2015). Droplet digital PCR measurement of HER2 in patients with gastric cancer. *British journal of cancer*, 112(10), 1652–1655. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.129>
- Kolakofsky D. (2016). Paramyxovirus RNA synthesis, mRNA editing, and genome hexamer phase: A review. *Virology*, 498, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.08.018>
- Koutinas, A. F., Polizopoulou, Z. S., Baumgaertner, W., Lekkas, S., & Kontos, V. (2002). Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis. *Journal of comparative pathology*, 126(1), 47–56. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0521>
- Krakowka, S., Cork, L. C., Winkelstein, J. A., & Axthelm, M. K. (1987). Establishment of central nervous system infection by canine distemper virus: breach of the blood-brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Veterinary immunology and immunopathology*, 17(1-4), 471–482. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(87\)90163-2](https://doi.org/10.1016/0165-2427(87)90163-2)
- Kuypers, J., & Jerome, K. R. (2017). Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology. *Journal of clinical microbiology*, 55(6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>.
- Laksono, B. M., Tran, D. N., Kondova, I., van Engelen, H. G. H., Michels, S., Nambulli, S., de Vries, R. D., Duprex, W. P., Verjans, G. M. G. M., & de Swart, R. L. (2021). Comparable Infection Level and Tropism of Measles Virus and Canine Distemper Virus in Organotypic Brain Slice Cultures Obtained from Natural Host Species. *Viruses*, 13(8), 1582. <https://doi.org/10.3390/v13081582>
- 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. *Veterinary microbiology*, 115(1-3), 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.01.010>
- Lariccia Gómez, L. E., & Kramer Aldecosea, F. (2018). *Distemper Canino: Estudio epidemiológico retrospectivo en el Hospital de Facultad de Veterinaria (2006-2016)*. [Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, UDELAR]. Colibri. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/25174>
- Lempp, C., Spitzbarth, I., Puff, C., Cana, A., Kegler, K., Techangamsuwan, S., Baumgärtner, W., & Seehusen, F. (2014). New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 6(7), 2571–2601. <https://doi.org/10.3390/v6072571>
- Loots, A. K., Mitchell, E., Dalton, D. L., Kotzé, A., & Venter, E. H. (2017). Advances in canine distemper virus pathogenesis research: a wildlife perspective. *The Journal of general virology*, 98(3), 311–321. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000666>
- Ludlow, M., Rennick, L. J., Nambulli, S., de Swart, R. L., & Duprex, W. P. (2014). Using the ferret model to study morbillivirus entry, spread, transmission and cross-species infection. *Current opinion in virology*, 4, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.11.001>

- Maeda, H., Ozaki, K., Takagi, Y., Sawashima, K., & Narama, I. (1994). Distemper skin lesions in a dog. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe A*, 41(3), 247–250. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1994.tb00091.x>
- Maes, P., Amarasinghe, G. K., Ayllón, M. A., Basler, C. F., Bavari, S., Blasdell, K. R., Briese, T., Brown, P. A., Bukreyev, A., Balkema-Buschmann, A., Buchholz, U. J., Chandran, K., Crozier, I., de Swart, R. L., Dietzgen, R. G., Dolnik, O., Domier, L. L., Drexler, J. F., Dürrwald, R., Dundon, W. G., ... Kuhn, J. H. (2019). Taxonomy of the order Mononegavirales: second update 2018. *Archives of virology*, 164(4), 1233–1244. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-04126-4>
- Martella, V., Elia, G., & Buonavoglia, C. (2008). Canine distemper virus. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 38(4), 787–viii. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.02.007>
- McCarthy, A. J., Shaw, M. A., & Goodman, S. J. (2007). Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *Proceedings. Biological sciences*, 274(1629), 3165–3174. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0884>
- Miele, J. A., & Krakowka, S. (1983). Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infection and immunity*, 41(2), 869–871. <https://doi.org/10.1128/iai.41.2.869-871.1983>
- Moro, L., Martins, A. S., Alves, C. M., Santos, F. G., Del Puerto, H. L., & Vasconcelos, A. C. (2003). Apoptosis in the cerebellum of dogs with distemper. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 50(5), 221–225. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00657.x>
- Moss, W. J., & Griffin, D. E. (2006). Global measles elimination. *Nature reviews. Microbiology*, 4(12), 900–908. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1550>
- Mühlebach, M. D., Mateo, M., Sinn, P. L., Prüfer, S., Uhlig, K. M., Leonard, V. H., Navaratnarajah, C. K., Frenzke, M., Wong, X. X., Sawatsky, B., Ramachandran, S., McCray, P. B., Jr, Cichutek, K., von Messling, V., Lopez, M., & Cattaneo, R. (2011). Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*, 480(7378), 530–533. <https://doi.org/10.1038/nature10639>
- Mutinelli, F., Vandevelde, M., Griot, C., & Richard, A. (1989). Astrocytic infection in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta neuropathologica*, 77(3), 333–335. <https://doi.org/10.1007/BF00687587>
- Nesseler, A., Baumgärtner, W., Zurbriggen, A., & Orvell, C. (1999). Restricted virus protein translation in canine distemper virus inclusion body polioencephalitis. *Veterinary microbiology*, 69(1-2), 23–28. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(99\)00083-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(99)00083-8)
- Noon, T. H., Heffelfinger, J. R., Olding, R. J., Wesche, S. L., & Reggiardo, C. (2003). Serologic survey for antibodies to canine distemper virus in collared peccary (*Tayassu tajacu*) populations in Arizona. *Journal of wildlife diseases*, 39(1), 221–223. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.1.221>
- Noyce, R. S., Delpéut, S., & Richardson, C. D. (2013). Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. *Virology*, 436(1), 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.11.011>
- Okita, M., Yanai, T., Ochikubo, F., Gemma, T., Mori, T., Maseki, T., Yamanouchi, K., Mikami, T., & Kai, C. (1997). Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *Journal of comparative pathology*, 116(4), 403–408. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(97\)80057-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(97)80057-6)
- Osterhaus, A. D., de Swart, R. L., Vos, H. W., Ross, P. S., Kenter, M. J., & Barrett, T. (1995). Morbillivirus infections of aquatic mammals: newly identified members of

- the genus. *Veterinary microbiology*, 44(2-4), 219–227. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00015-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00015-3)
- Pan, Y., Liu, X., Meng, L., Zhu, G., Xia, Y., Chen, J., & Yoshikawa, T. (2013). Pathogenesis of demyelinating encephalopathy in dogs with spontaneous acute canine distemper. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(2), 334–343. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60233-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60233-6)
- Pardo, M. C., Bauman, J. E., & Mackowiak, M. (1997). Protection of dogs against canine distemper by vaccination with a canarypox virus recombinant expressing canine distemper virus fusion and hemagglutinin glycoproteins. *American journal of veterinary research*, 58(8), 833–836.
- Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Experimental methods that allow the study of macromolecules of life: History, foundations and perspectives. *Chemical Education*, 24(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6)
- Pinheiro-de-Oliveira, T. F., Fonseca, A. A., Jr, Camargos, M. F., Laguardia-Nascimento, M., de Oliveira, A. M., Cottorello, A. C. P., Goes-Neto, A., & Barbosa-Stacioli, E. F. (2018). Development of a droplet digital RT-PCR for the quantification of foot-and-mouth virus RNA. *Journal of virological methods*, 259, 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.06.015>
- Pratakiriya, W., Seki, F., Otsuki, N., Sakai, K., Fukuhara, H., Katamoto, H., Hirai, T., Maenaka, K., Techangamsuwan, S., Lan, N. T., Takeda, M., & Yamaguchi, R. (2012). Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in neurovirulence. *Journal of virology*, 86(18), 10207–10210. <https://doi.org/10.1128/JVI.00824-12>
- Plattet, P., Alves, L., Herren, M., & Aguilar, H. C. (2016). Measles Virus Fusion Protein: Structure, Function and Inhibition. *Viruses*, 8(4), 112. <https://doi.org/10.3390/v8040112>
- Quan, P. L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(4), 1271. <https://doi.org/10.3390/s18041271>
- Rendon-Marin, S., da Fontoura Budaszewski, R., Canal, C. W., & Ruiz-Saenz, J. (2019). Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. *Virology journal*, 16(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6>
- Richards, T. R., Whelan, N. C., Pinard, C. L., Alcala, F. C., & Wolfe, K. C. (2011). Optic neuritis caused by canine distemper virus in a Jack Russell terrier. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 52(4), 398–402.
- Riley, M. C., & Wilkes, R. P. (2015). Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Virology journal*, 12, 219. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0445-7>
- ROCKBORN G. (1959). An attenuated strain of canine distemper virus in tissue culture. *Nature*, 184(Suppl 11), 822. <https://doi.org/10.1038/184822a0>
- Roelke-Parker, M. E., Munson, L., Packer, C., Kock, R., Cleaveland, S., Carpenter, M., O'Brien, S. J., Pospischil, A., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mwamengele, G. L., Mgasa, M. N., Machange, G. A., Summers, B. A., & Appel, M. J. (1996). A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, 379(6564), 441–445. <https://doi.org/10.1038/379441a0>
- Rudd, P. A., Cattaneo, R., & von Messling, V. (2006). Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Journal of virology*, 80(19), 9361–9370. <https://doi.org/10.1128/JVI.01034-0>

- Ruedas-Torres, I., Puente, H., Fristikova, K., Argüello, H., Salguero, F. J., Carvajal, A., & Gómez-Laguna, J. (2024). Pathological and immunohistochemical assessment of the impact of three different strains of swine enteric coronaviruses in the intestinal barrier. *Veterinary microbiology*, 290, 109956. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109956>
- Saito, T. B., Alfieri, A. A., Wosiacki, S. R., Negrão, F. J., Morais, H. S., & Alfieri, A. F. (2006). Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in veterinary science*, 80(1), 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.03.002>
- Sarute, N., Delgado, M. V., Carrau, L., Benech, A., Francia, L., Pérez, R., & Panzera, Y. (2014). First genome sequence of a canine distemper virus strain from South America. *Genome announcements*, 2(5), e01009-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01009-14>
- Schwab, S., Herden, C., Seeliger, F., Papaioannou, N., Psalla, D., Polizopoulou, Z., & Baumgärtner, W. (2007). Non-suppurative meningoencephalitis of unknown origin in cats and dogs: an immunohistochemical study. *Journal of comparative pathology*, 136(2-3), 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2006.11.006>
- Schobesberger, M., Summerfield, A., Doherr, M. G., Zurbriggen, A., & Griot, C. (2005). Canine distemper virus-induced depletion of uninfected lymphocytes is associated with apoptosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 104(1-2), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.09.032>
- Seehusen, F., Orlando, E. A., Wewetzer, K., & Baumgärtner, W. (2007). Vimentin-positive astrocytes in canine distemper: a target for canine distemper virus especially in chronic demyelinating lesions?. *Acta neuropathologica*, 114(6), 597–608. <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0307-5>
- Seki, F., Ono, N., Yamaguchi, R., & Yanagi, Y. (2003). Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. *Journal of virology*, 77(18), 9943–9950. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.18.9943-9950.2003>
- Shen, D. T., Gorham, J. R., & Pedersen, V. (1981). Viruria in dogs infected with canine distemper. *Veterinary medicine, small animal clinician : VM, SAC*, 76(8), 1175–1177..
- Silva, M. C., Fighera, R. A., Juliana S, B., Graça, D. L., Kommers, G. D., Irigoyen, L. F., & Barros, C. S. (2007). Aspectos clinicopatológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães: Clinicopathological features in 620 neurological cases of canine distemper. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 27, 215-220.
- Silva, M. C., Fighera, R. A., Mazzanti, A., Brum, J. S., Pierezan, F., & Barros, C. S. (2009). Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 643-652.
- Sonne, L., Oliveira, E. C., Pescador, C. A., Santos, A. S., Pavarini, S. P., Carissimi, A. S., & Driemeier, D. (2009). Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 143-149.
- Spitzbarth, I., Lempp, C., Kegler, K., Ulrich, R., Kalkuhl, A., Deschl, U., Baumgärtner, W., & Seehusen, F. (2016). Immunohistochemical and transcriptome analyses indicate complex breakdown of axonal transport mechanisms in canine distemper leukoencephalitis. *Brain and behavior*, 6(7), e00472. <https://doi.org/10.1002/brb3.472>

- Strain, M. C., Lada, S. M., Luong, T., Rought, S. E., Gianella, S., Terry, V. H., Spina, C. A., Woelk, C. H., & Richman, D. D. (2013). Highly precise measurement of HIV DNA by droplet digital PCR. *PLoS one*, 8(4), e55943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055943>
- Summers, B. A., Greisen, H. A., & Appel, M. J. (1979). Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta neuropathologica*, 46(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF00684797>
- Summers, B. A., Greisen, H. A., & Appel, M. J. (1984). Canine distemper encephalomyelitis: variation with virus strain. *Journal of comparative pathology*, 94(1), 65–75. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(84\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0021-9975(84)90009-4)
- Summers, B. A., & Appel, M. J. (1994). Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and applied neurobiology*, 20(6), 525–534. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1994.tb01006.x>
- Suo, T., Liu, X., Feng, J., Guo, M., Hu, W., Guo, D., Ullah, H., Yang, Y., Zhang, Q., Wang, X., Sajid, M., Huang, Z., Deng, L., Chen, T., Liu, F., Xu, K., Liu, Y., Zhang, Q., Liu, Y., Xiong, Y., ... Chen, Y. (2020). ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1259–1268. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1772678>
- Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., & Morley, A. A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*, 13(3), 444–449.
- Shuai, J., Chen, K., Han, X., Zeng, R., Song, H., Fu, L., & Zhang, X. (2024). Development and validation of a droplet digital PCR assay for Nipah virus quantitation. *BMC veterinary research*, 20(1), 440. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04245-y>.
- Vandervelde, M., Fankhauser, R., Kristensen, F., & Kristensen, B. (1981). Immunoglobulins in demyelinating lesions in canine distemper encephalitis. An immunohistological study. *Acta neuropathologica*, 54(1), 31–41. <https://doi.org/10.1007/BF00691330>
- Vandervelde, M., & Zurbriggen, A. (1995). The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*, 44(2-4), 271–280. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00021-2](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00021-2)
- Vandervelde, M., & Zurbriggen, A. (2005). Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, 109, 56–68.
- Verdes, J. M., Larrañaga, C., Varela, B., Iribarnegaray, V., Yozzi, V., Feijoo, G., & Yamasaki, K. (2024a). Histopathological Analysis of Brains from Dogs Infected with Canine Distemper Virus. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2808, 177–195. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3870-5_14
- Verdes, J. M., Larrañaga, C., Godíñ, G., Varela, B., Yozzi, V., Iribarnegaray, V., Delucchi, L., & Yamasaki, K. (2024b). Pathological Study of Demyelination with Cellular Reactions in the Cerebellum of Dogs Infected with Canine Distemper Virus. *Viruses*, 16(11), 1719. <https://doi.org/10.3390/v16111719>
- Vicente, A. F., de Abreu, A. P. M., & dos Passos, A. A. M. S. (2010). Perfil hematológico em cães infectados naturalmente por cinomose com presença de corpúsculo de Sinegaglia Lentz, em Vassouras-RJ. *Revista de Saúde*, 1(1), 49–54.
- von Messling, V., Svitek, N., & Cattaneo, R. (2006). Receptor (SLAM [CD150]) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. *Journal of virology*, 80(12), 6084–6092. <https://doi.org/10.1128/JVI.00357-06>

- Uhl, E. W., Kelderhouse, C., Buikstra, J., Blick, J. P., Bolon, B., & Hogan, R. J. (2019). New world origin of canine distemper: Interdisciplinary insights. *International journal of paleopathology*, 24, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2018.12.007>
- Tatsuo, H., Ono, N., & Yanagi, Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *Journal of virology*, 75(13), 5842–5850. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.5842-5850.2001>
- Tipold, A., Vandervelde, M. and Jaggy, A. (1992). Neurological manifestations of canine distemper virus infection. *Journal of Small Animal Practice*, 33: 466-470. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1992.tb01024.x>
- Tipold, A., Vandervelde, M., Wittek, R., Moore, P., Summerfield, A., & Zurbriggen, A. (2001). Partial protection and intrathecal invasion of CD8(+) T cells in acute canine distemper virus infection. *Veterinary microbiology*, 83(3), 189–203. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00422-9](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00422-9)
- Whelan, S. P., Barr, J. N., & Wertz, G. W. (2004). Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Current topics in microbiology and immunology*, 283, 61–119. https://doi.org/10.1007/978-3-662-06099-5_3
- Woma, T. Y., van Vuuren, M., Bosman, A. M., Quan, M., & Oosthuizen, M. (2010). Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper viruses from South Africa: lineage Africa. *Veterinary microbiology*, 143(2-4), 126–132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.11.013>
- Wright, N. G., Cornwell, H. J., Thompson, H., & Lauder, I. M. (1974). Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *The Veterinary record*, 94(5), 86–92. <https://doi.org/10.1136/vr.94.5.86>
- Zurbriggen, A., Schmid, I., Gruber, H. U., & Vandervelde, M. (1998). Oligodendroglial pathology in canine distemper. *Acta neuropathologica*, 95(1), 71–77. <https://doi.org/10.1007/s004010050767>