

DISTEMPER CANINO

**PINOTTI, M.¹; GOLLAN, A.¹; DELGADO, A.²; PASSEGGI, C.¹;
OCCHI, H.¹; BLAINQ, L.¹ & CANAVESIO, M.¹**

RESUMEN

El Distemper canino (DC) es causado por un Morbillivirus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae* estrechamente relacionado al virus Sarampión, y es considerada la enfermedad viral más importante de los perros. Los hospedadores naturales son predominantemente familias del orden *Carnívora*. Es un virus envuelto con RNA de cadena de polaridad negativa. Se considera un solo serotipo con cepas que varían en su tropismo y virulencia, aunque estudios de secuencia de genes de la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y de la proteína de fusión (F) sugieren diferencias en genotipos a ser tenidas en cuenta para la elaboración futura de inmunógenos. Produce una infección sistémica severa en diferentes tipos de células incluyendo epiteliales, mesenquimatosas, neuroendocrinas y hematopoyéticas en varios órganos y tejidos, lo que podría conducir a persistencia viral en el sistema nervioso central (SNC) y en tejidos linfoides. Los anticuerpos séricos son protectores contra la diseminación viral y su nivel al momento de la infección es crítico para su evolución. Las principales manifestaciones clínicas incluyen signos respiratorios, gastroentéricos, cutáneos, inmunosupresión y leucoencefalitis desmielinizante (LD). La falla en la función inmune está asociada con la depleción de órganos linfoides y viremia asociada a pérdida de linfocitos, especialmente células T CD4+ debido a apoptosis en la fase temprana. La fase temprana de la LD es una secuela de un daño mediado por virus e infiltración de células T citotóxicas CD8+ con liberación de citocinas pro inflamatorias y pérdida de respuesta de citocinas inmunomoduladoras, lo que contribuye a un aumento de placas de desmielinización mediado inmunológicamente, en la fase crónica. Además, parece jugar un rol central un balance alterado entre las metaloproteinasas de matriz y sus inhibidores.

SUMMARY

Canine Distemper

The canine Distemper disease caused by a Morbillivirus closely related to Measles virus in humans, is the most important viral disease in dogs. The natural hosts are mainly families related to the Carnivorous order. It's a RNA (ribonucleic acid) virus, enveloped and a negative chain.

It's recognized or considered a single serotype with strains which vary in its tropism and virulence, although studies about the sequences of the gens of H,N y F suggest differences in genotypes

1.- Cátedra de Virología e Inmunología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Kreder 2805. Esperanza, provincia de Santa Fe. Email: mpinotti@fcv.unl.edu.ar

2.- Cátedra de Bacteriología y Micología. Facultad de Ciencias Veterinarias (UNL).

Manuscrito recibido el 1º de octubre de 2009 y aceptado para su publicación el 24 de octubre de 2009.

to bear in mind for the future manufacturing of immunogens. The virus produces a severe systemic infection in different types of cells including the epithelial ones, mesenchymatic, neuroendocrine and haematopoietic in several organs and tissues, which can lead to a viral persistence in the nervous central system (CNS) and in the lymphoid tissues. The serum antibodies are protective against the viral spreading and its level at the time of the infection is critical for its evolution.

The main clinical manifestations include respiratory, gastroenteric, cutaneous, immunosuppression and demyelinating leucoencephalitis (DL) signs. The fault in the immune function is associated with depletion of the lymphoid organs and viremia associated to the lymphocytes lost specially TCD 4 + cells due to the apoptosis in the early phase. The early phase of the DL is a consequence of a damage produced by virus and cytotoxic T cells CD 8 + infiltration with liberation of inflammatory cytokines and loss of the immunomodulating cytokines response, which contribute to an increase of demyelination plates in the chronic phase, immunologically mediated. Moreover, an altered balance between the metalloproteinases of matrix and its inhibitors, seems to play a central and crucial role.

INTRODUCCIÓN

El Distemper canino (DC) es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, causada por un Morbillivirus de la familia *Paramyxoviridae*. Fue descrita por Edward Jenner en 1809 y su etiología viral la demostró Carré en 1906. El espectro de hospedadores naturales comprende miembros de las familias *Canidae*, *Felidae*, *Procyonidae* y *Mustelidae*, afectando a un rango importante de órganos incluyendo tejidos linfoides, piel, tracto intestinal, respiratorio y encéfalo. Sus manifestaciones patológicas más severas son la inmunosupresión y la leucoencefalitis desmielinizante (LD) (Krakowka *et al.*, 1985). Epidemias recientes de DC han sido observadas en Francia, Alemania, USA, Japón y Finlandia demostrando la importancia de la vacunación regular como una herramienta protectora altamente eficiente (Beineke *et al.*, 2009). Además, brotes ocasionales de enfermedad pueden ser observados en cohortes vacunadas, posiblemente debido a la introducción o circulación de cepas genéticamente diferentes (Mori *et al.*, 1994; Scagliarini *et al.*, 2003; Gallo Calderón *et al.*, 2007).

CARACTERÍSTICAS DEL AGENTE

El virus del Distemper Canino (VDC) pertenece a la Familia *Paramyxoviridae*, género Morbillivirus que también comprende los virus Sarampión, de la Peste de los rumiantes (Rinderpest), Morbillivirus de delfines y marsopas y virus de Distemper de focas (Pringue, 1999; Lamb & Kolakosky, 2001).

Es un virus envuelto, que contiene: la nucleocápside de simetría helicoidal que consiste en una cadena única de RNA de sentido negativo y 15882 nucleótidos y proteínas asociadas: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y proteína polimerasa mayor (L). Además conforman la partícula viral la proteína de membrana (M), la hema-glutinina/neuraminidasa (HN) y la proteína de fusión (F). (Örvell, 1980; Diallo, 1990). La envoltura lipídica contiene las dos glicoproteínas de superficie F y HN, las cuales median la entrada y salida viral de la célula hospedadora. El core contiene las proteínas N, P y L que inician la replicación intracelular. La proteína viral M conecta las glicoproteínas de superficie y la nucleocápside durante la maduración viral (Lamb &

Kolakofsky, 2001).

La replicación tiene lugar en el citoplasma a las 14 a 24 horas pos infección. Comienza con la adhesión de la proteína HN del virus a receptores celulares tales como sialoglicoproteínas o glicolípidos. La proteína F interviene en la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática a un pH fisiológico. El genoma ARN de cadena simple y polaridad negativa debe transcribirse a un intermediario autorreplicativo antes de generar los ARNm. Para que esto ocurra son necesarias las nucleocápsides libres e intactas con sus tres proteínas asociadas (N, P y L). Una vez que la nucleocápside es liberada en el citoplasma, la polimerasa ARN dependiente inicia la transcripción desde el extremo 3' hacia el final del genoma, sintetizándose una cadena de polaridad positiva. A partir de ella se generan los ARNm correspondientes a cada gen. Los genes en el ARN viral se hallan separados mediante secuencias cortas intergénicas de residuos uracílicos, y son capaces de generar una cola larga de poli A en cada ARNm por un proceso reiterativo de copiado, interrupción y reinicio de la transcripción. Cada ARNm se cliva y las enzimas continúan transcribiendo el siguiente gen.

El ensamble y maduración de los viriones involucra la incorporación de glicoproteínas virales en la membrana plasmática de la célula hospedadora, la asociación de la proteína M y de otra proteína no glicosilada con la membrana celular modificada y el alineamiento de la nucleocápside con la proteína M. La liberación es por gemación de los viriones maduros que se cubren de una envoltura que contiene lípidos de origen celular y glicoproteínas virales. El ARN neoformado se asocia a proteínas de la nucleocápside, que se producen en exceso y se acumulan en el citoplasma, dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión característicos (Lamb

& Kolakofsky, 2001).

Se inactiva rápidamente a 37°C, en pocas horas a temperatura ambiente y es muy sensible a desinfectantes comunes.

Mundialmente se reconoce un solo sero-tipo. No obstante, cocirculan varios genotipo-pos de distinta virulencia y tropismo celular. Algunas cepas están asociadas con Polioen-cefalitis (PE), ej.: cepa Snyder Hill, mientras otras inducen LD, ej.: cepas R252 y A75-17 (Krakowka & Koestner, 1977; Orlando *et al.*, 2008). Aunque los análisis de secuencia de aislamientos de campo revelan varios clusters de cepas de VDC, en brotes recientes se ha observado una considerable estabilidad genética (Haas *et al.*, 1997; Frisk *et al.*, 1999). Estudios posteriores de análisis de secuencia completa de genes de HN y F y parcial de P realizados en Estados Unidos, sugirieron en dos cepas una relación evolutiva similar a la del Distemper de focas. Ubicadas en el árbol de cepas de VDC se demostró diferencia genética con cepas vacunales y las previamente reportadas en Norte América (Pardo *et al.*, 2005). La cepa 007Lm, aislada en Japón de un canino vacunado enfermo, ha sido comunicada dentro de un cluster lejano de las cepas vacunales en los árboles filogenéticos de genes de HN y P (Lan *et al.*, 2005). Por otra parte, otro estudio de caracterización genética con análisis filogenético de secuencias parciales de aminoácidos de HN realizado en Argentina, mostró un cluster estrecho para las cepas locales, claramente distinto del de las cepas vacunales de otro origen. Una de las cepas locales, Arg 23 muestra diferencias que sugieren que dos diferentes genotipos patogénicos de VDC circulan corrientemente en el país, uno de ellos claramente predominante (Gallo Calderon, *et al.*, 2007).

HOSPEDADORES

El rango natural de hospedadores comprende familias del orden *Carnívora* como *Canidae* (perros, dingos, zorros), *Procyonidae* (mapaches, panda menor), *Mustelidae* (hurones, visones, tejones), *Mephitidae*, *Hyaenidae*, *Ailuridae*, *Viverridae* y *Felidae*. En los últimos años han sido observadas enfermedades distemper-like en grandes félidos en el Parque Nacional Serengeti en Tanzania (Roelke-Parker *et al.*, 1996) y en zoológicos de Norteamérica (Appel *et al.*, 1994), pecaríes de collar (*Tayassu tajacu*) en Arizona (Appel *et al.*, 1991) y en primates no humanos (*Macaca fuscata*) en Japón (Yoshikawa *et al.*, 1989). Las focas, además de tener un virus de distemper específico, pueden llegar a infectarse con el virus del DC (McCullough *et al.*, 1991). El hurón es utilizado ampliamente como modelo para estudios de virulencia e inmunosupresión (Messling *et al.*, 2003).

En laboratorio, el virus replica en cultivos primarios o en líneas celulares establecidas, entre las que destacan de riñón canino (MDCK) y, en segundo lugar células de mono (VERO). En ellas produce formación de sincicios, vacuolización, lisis celular y formación de inclusiones acidófilas intracitoplasmáticas e intranucleares. Este virus no es cultivado con facilidad y requiere una adaptación por pasajes y la adición de tripsina al medio para clivar la proteína F (Reutemann *et al.*, 2006).

INFECCIÓN Y DISEMINACIÓN VIRAL

El virus es liberado en gran escala por vía oro-nasal, aunque cualquier descarga y secreción puede contenerlo. La infección se produce primariamente por contacto directo,

inhalación de virus transportado por el aire o por gotitas (Krakowka *et al.*, 1980), seguido por replicación en tejidos linfoides del tracto respiratorio. Los macrófagos y monocitos localizados en tonsilas y epitelio respiratorio representan el primer tipo de célula en replicar y propagar virus (Appel, 1970). Siguiendo a este punto local de replicación ocurre la diseminación vía sanguínea y linfática a tejidos hematopoyéticos distantes durante la primer fase de viremia que conduce a una infección generalizada de todos los tejidos linfoides incluyendo bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea, tejidos linfoides asociados a mucosa (MALT) y macrófagos en la lámina propia del tracto gastrointestinal, así como células de Kupffer (Appel, 1970). La viremia ocurre por diseminación viral libre de células, así como por leucocitos y trombocitos asociados a virus. La segunda viremia tiene lugar varios días más tarde y conduce a la infección de células de tejidos parenquimatosos de todo el organismo (Appel, 1969; Okita *et al.*, 1997). Así, el VDC puede ser hallado en células de los tractos respiratorio, gastrointestinal y urinario, sistema endocrino, tejidos linfoides, sistema nervioso central (SNC) y vasos, incluyendo queratinocitos, fibroblastos, trombocitos y diferentes células linfoides así como bronquiales, endoteliales, epiteliales y neuroectodermo (Baumgärtner *et al.*, 1989; Gröne *et al.*, 2004; Koutinas *et al.*, 2004). El VDC atraviesa sin dificultad la placenta en hembras preñadas carentes de anticuerpos, y el período neonatal constituye el momento de más alta susceptibilidad al virus. Puede ocasionar abortos debidos a severos efectos sistémicos de la infección de la madre, sin demostración de virus en placenta o feto, o invadir este último con alta probabilidad de encefalitis fatal o muerte temprana en el período neonatal por infección secundaria asociada a inmunosupresión (Krakowka *et*

al., 1977).

La neuroinvasión del VDC ocurre predominantemente por vía hematológica (Krakowka, 1989). La viremia asociada a leucocitos se cree que representa la mayor fuente de infectividad hematológica. El antígeno viral es detectado primero en los endotelios capilares y de vénulas del SNC a los 5-6 días pos inoculación y/o en linfocitos perivasculares a los 8 días (Summers *et al.*, 1979). Puede ser observada a los 10 días pos inoculación una infección productiva del epitelio del plexo coroideo, con liberación de virus progenie en el líquido cefalorraquídeo (LCR), seguida por infección ependimal y diseminación del virus a la sustancia blanca subependimal (Vandeveldel *et al.*, 1985). Los estudios para seguir la ruta del VDC dentro del cerebro mostraron infección de la sustancia blanca ependimal y subependimal, lo que indica difusión en el SNC vía LCR (Vandeveldel *et al.*, 1985). Además, hay diseminación directa desde células meníngeas de la piamadre. (Baumgärtner *et al.*, 1989). Cuando el virus es eliminado de la sangre periférica y de algunos órganos puede, en algunos casos, persistir en ciertos tejidos incluyendo úvea, SNC, órganos linfoides y almohadillas (Appel, 1970; Zurbriggen *et al.*, 1995; Greene & Appel, 1998; Gröne *et al.*, 2004).

PATOGÉNESIS

Immunosupresión:

Al igual que otros Morbillivirus tales como los virus del Sarampión y Rinderpest, el VDC es un agente infeccioso linfotrópico y altamente inmunosupresor. La infección establecida, causa una larga y profunda inhibición de las funciones inmunes celular y humoral caracterizadas por inmunosupresión, pérdida de linfocitos y leucopenia, lo

que transforma al enfermo en altamente susceptible a infecciones oportunistas (Krakowka *et al.*, 1975). Las células T son más afectadas que las células B y los linfocitos CD4+ son rápidamente deplecionados por varias semanas, mientras que las células CD8+ son afectadas menos severamente y se recobran relativamente rápido (Vandeveldel, 2004). Durante la fase aguda de DC, la linfopenia se caracteriza por una depleción transitoria de células T helper CD4+, células T citotóxicas y células B CD21+ en la sangre periférica. El reducido número de células inmune circulantes puede considerarse una secuela de un daño celular en la producción de órganos linfoides primarios y secundarios, así como apoptosis de leucocitos de sangre periférica. La muerte celular programada puede ser detectada en un considerable número de linfocitos no infectados, indicando la existencia adicional de mecanismos de apoptosis independientes del virus. Por consiguiente, deben ser considerados otros mecanismos además de la acción directa del virus para inducir apoptosis, tales como una sobreactivación del sistema inmune innato (Moro *et al.*, 2003). Se han realizado estudios apuntando al tropismo del VDC por los linfocitos (Appel *et al.*, 1982). Investigaciones *in Vitro* demostraron que el linfotropismo del VDC se basa presumiblemente en la unión de CD150 (molécula de señal de activación de linfocitos – SLAM -) con la proteína viral HN, seguido por la entrada del agente a la célula. SLAM es constitutivamente expresada en una variedad de órganos en caninos sanos. Sin embargo, en la infección por VDC, SLAM es marcadamente acentuada en células linfoides, indicando una posible estrategia para incrementar la diseminación del virus en el hospedador (Wenzlow *et al.*, 2007). La presentación del antígeno también es afectada, dado que SLAM es expresada en células dendríticas maduras y monocitos

activados (Tatsuo & Yanagi, 2002). CD9, una proteína de transmembrana, es asociada con inducción por VDC de fusiones célula-célula y formación de sincicios celulares, pero no se observan fusiones virus-célula. Sin embargo, desde que la unión no directa de esta proteína de transmembrana con el virus ha sido demostrada, CD9 es considerado un cofactor para la infección viral, posiblemente como una parte del receptor complejo para VDC o debido a señales intracelulares, que incrementan la expresión o actividad de un receptor molecular (Löffler *et al.*, 1997).

Distemper nervioso:

La aparición de lesiones en el SNC depende de la cepa del virus, la edad y el status inmune del animal afectado y puede ser clasificada en diferentes subtipos. En general, puede distinguirse una polio y una leucoencefalitis, caracterizadas por diferentes patrones de distribución de las lesiones y patogénesis. La LD es la secuela más común y es un proceso bifásico (Baumgärtner & Alldinger, 2005). El inicio se debe a una acción directa del virus, donde hay una expresión intralesional prominente de proteínas virales y mRNA. Las lesiones tempranas son acompañadas por la presencia de pocos linfocitos CD8+ y escasas células CD4+ y una expresión incrementada de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (CMH II). En esta fase, hay inducción de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), CD44, un receptor de hialuronato y las metaloproteínas de matriz (MMPs), así como sus inhibidores (TIMPs). Como segunda fase, el progreso de las placas parece ser un proceso inmunopatológico. La fuerte reducción o ausencia de proteínas virales y expresión de mRNA es asociada a una respuesta inmune vigorosa. Los linfocitos CD8+ dominan en las lesiones, mientras

los linfocitos CD4+ y células B se hallan principalmente perivascularmente. Simultáneamente hay una fuerte expresión de moléculas del CMH II y de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α . Las citocinas antiinflamatorias IL-10 y el factor transformante del crecimiento beta (GTF β) no son influenciados por la infección. CD44, TIMPs y MMPs están fuertemente disminuidos. En suma, en la LD inducida por CDV, la génesis de la placa es un proceso bifásico con varios factores asociados con el inicio de la lesión o su progresión (Beineke *et al.*, 2009). Estudios detallados de diseminación de virus dentro del SNC indican que puede ser observada una fase poco común y breve de enfermedad en la materia gris previo al desarrollo de LD (Summers *et al.*, 1984). Basado en esta observación, ha sido propuesto que alguna infección de VDC puede pasar a través de una secuencia de entrada en el SNC afectando la materia gris y más tarde la materia blanca. Esto es soportado por hallazgos de lesiones subpiales en el cerebelo y la presencia de células positivas al antígeno VDC en la piamadre y la materia gris subyacente en la fase temprana de la infección. El punto final es mayormente determinado por la cepa del virus (Summers *et al.*, 1984).

La persistencia viral parece ser un importante factor para la inducción de mecanismos inmunes mediados en la fase crónica de la LD (Gaedke *et al.*, 1999). Al respecto, los factores que favorecen la persistencia incluyen una infección no citolítica y escasa liberación de progenie viral, limitando la exposición del antígeno a las células de inmunidad local (Zurbriggen *et al.*, 1995).

En el SNC, pueden ser infectados astrocitos, microglia, oligodendrocitos, neuronas, células ependimales y células del plexo coroideo. Los astrocitos son la principal población celular infectada en placas tem-

pranas (Orlando *et al.*, 2008). Las células de la microglia son los principales elementos efectores con que el cerebro responde a eventos patológicos. Su posible rol en la desmielinización inicial no inflamatoria en la infección por VDC es abonada por la clara asociación entre su activación y la desmielinización. Esto sugiere fuertemente que la microglia contribuye a la desmielinización aguda en el distemper (Stein *et al.*, 2004). La expresión de antígeno VDC y mRNA en neuronas, lo cual puede ocurrir en algún tipo de distemper nervioso durante la fase temprana, y más prominentemente en la polioencefalitis, está asociada con una cantidad desproporcionadamente baja de proteína viral comparada con el mRNA (Nessler *et al.*, 1999). La polioencefalitis, incluyendo la encefalitis de los perros viejos y la encefalitis pos vacunal es una rara manifestación de la infección de VDC y es predominantemente localizada en áreas corticales y núcleo del tronco cerebral. Las neuronas y los astrocitos protoplasmáticos representan las poblaciones celulares mayormente afectadas. En contraste, la LD representa la manifestación más común del DC (Nessler *et al.*, 1999).

La migración inicial de células T está sospechada de ser mediada por citocinas derivadas de la microglia, tales como IL-8. Una acumulación de células inmunes en el SNC durante los estados tempranos de la enfermedad puede facilitar el desarrollo tardío de una respuesta inmune intratecal y complicaciones inmunopatológicas asociadas (Tipold *et al.*, 1999). El incremento de la expresión de moléculas del CMH II durante la progresión de lesiones de la LD, y una reducción simultánea de la expresión de proteínas virales en el SNC, indican una participación de antígenos no virales como gatillo de procesos inmunomediados en la fase crónica de desmielinización (Alldinger

et al., 1996). Aunque la pérdida de mielina en lesiones tempranas ha sido atribuida a procesos mediados directa o indirectamente por virus, la desmielinización en lesiones crónicas ocurre como daño colateral. La desmielinización crónica inflamatoria puede ser debida al llamado “mecanismo espectador”, término utilizado para describir el efecto dañino sobre la mielina de enzimas proteolíticas liberadas por macrófagos/microglia estimulados en ausencia de infección detectable de oligodendrocitos (Cammer *et al.*, 1978). La activación de esas células caracterizada por el incremento en la expresión de CMH II y de moléculas de adhesión, produce la liberación de factores tóxicos, una actividad fagocítica incrementada y producción de radicales de oxígeno (Bürge *et al.*, 1989). Además, una respuesta inmune humoral antiviral puede conducir a la destrucción de oligodendrocitos como “espectadores inocentes”. El incremento en la producción de anticuerpos intratecales debido a la presencia de células B intracerebrales es sospechada de acelerar la destrucción de mielina en la LD crónica. Una citotoxicidad humoral dependiente de anticuerpos y mediada por complemento es discutida como posible mecanismo de desmielinización (Vandeveldt *et al.*, 1986). Los macrófagos residentes en el SNC, la microglia, así como la invasión de monocitos asociada con la reacción inflamatoria puede jugar un rol central en los procesos de desmielinización (Stein *et al.*, 2008). En el estado crónico, las células dendríticas sirven como células primarias del hospedador para el virus. El cambio de tropismo celular se presume una consecuencia de la respuesta inmune y puede representar un mecanismo de persistencia viral, tal como se describe para las neuronas y oligodendrocitos (Wünschmann *et al.*, 2000).

Las células T autorreactivas pueden ser responsables de la inducción observada de

inmunidad celular específica anti mielina, vía epitopes diseminados secundariamente al daño de la mielina en el SNC (Wünschmann *et al.*, 2000). Sin embargo, el rol preciso de esta respuesta inmune contra sí mismo y autoanticuerpos en la patogénesis de la desmielinización del SNC permanece indeterminada. El hallazgo simultáneo de alto número de linfocitos CD8+ intralesionales y perivasculares es sugestivo de una citotoxicidad mediada por células T dependientes de anticuerpos (Wünschmann *et al.*, 1999).

Además, los cambios inmunofenotípicos son indicativos de una reacción de hipersensibilidad de tipo retardada en lesiones avanzadas (Wünschmann *et al.*, 1999). El hallazgo de IFN- γ en el LCR de perros con infección del SNC con VDC lo señala como un marcador válido para determinar la persistencia de VDC en el SNC (Tsai *et al.*, 1982). La producción inicial de TNF- α por astrocitos puede conducir a un círculo vicioso de atracción de células inflamatorias en las lesiones del SNC, conduciendo a la síntesis de más citocinas y al desarrollo del estado crónico de LD. La producción de IL-12 en las lesiones de desmielinización de cerebros infectados por VDC se supone promueve una respuesta inmune Th-1 parcial (Gröne *et al.*, 2000).

Por otra parte, la disrupción de la barrera sangre-cerebro por enzimas proteolíticas es considerado un factor central para la afluencia de células inflamatorias y la progresión de las lesiones en enfermedades desmielinizantes. Los astrocitos representan la principal célula blanco del VDC, forman la barrera sangre-cerebro y son una fuente mayor de las proteínas de la matriz extracelular y células mediadoras. Juegan un rol esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del SNC (Montgomery, 1994).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Presenta grandes variaciones en cuanto a duración, severidad y presentación clínica. El período de incubación puede variar entre 1 y 4 semanas y depende de la cepa viral, la edad del animal y el estatus in-munitario. La manifestación de la enfermedad varía desde virtualmente ausencia de signos detectables a una severidad con 50% de mortalidad aproximada (Appel, 1970).

Los primeros signos clínicos se caracterizan por letargia, deshidratación, anorexia y pérdida de peso seguida por una más pronunciada manifestación clínica dependiendo predominantemente del órgano afectado. El desarrollo de una fiebre bifásica representa otro hallazgo clínico característico (Wright *et al.*, 1974). Entre los 3 a 6 días p. i. puede observarse una fiebre transitoria y el comienzo de una linfopenia en coincidencia con la primer viremia (Krakowka *et al.*, 1980). La fase aguda se caracteriza por varios signos clínicos incluyendo rashes cutáneos, descarga serosa o mucosa nasal y ocular, conjuntivitis y anorexia, seguidos por signos gastrointestinales y respiratorios, los cuales a menudo se complican por infecciones bacterianas secundarias y disturbios neurológicos (Krakowka *et al.*, 1985). Las manifestaciones respiratorias consisten en rinitis serosa o mucopurulenta, neumonía intersticial y bronquiolitis necrotizante, la cual se complica a menudo con una bronconeumonía supurativa debido a una infección bacteriana secundaria (Caswell & Williams, 2007). La infección entérica conduce a enteritis catarral con depleción de las Placas de Peyer (Krakowka *et al.*, 1985; Greene & Appel, 1998). En caninos naturalmente infectados, puede ser hallada una dermatitis pustular, también llamada Exantema por Distemper, localizada en muslos, abdomen ventral y en las superficies internas del pa-

bellón auricular. La almohadilla dura representa una manifestación cutánea no común del DC y se caracteriza por hiperqueratosis de las almohadillas plantares y epitelio nasal (Moritz *et al.*, 2000). Durante el desarrollo de la dentadura permanente el VDC también infecta los dientes en desarrollo y los ameloblastos, causando hipoplasia del esmalte (Dubielzig *et al.*, 1981). Una persistencia de la esponjosa primaria en la metafisis de los huesos largos, también llamada osteoesclerosis metafísea o crecimiento retardado en reja ha sido descrito en caninos jóvenes que sufrieron la forma sistémica del DC (Baumgärtner *et al.*, 1996). Además, una depleción generalizada de órganos linfoides y una inmunosu-presión asociada representan manifestaciones comunes e importantes.

Los signos nerviosos son diversos y progresivos e incluyen mioclonías, nistagmo, ataxia, déficit postural y tetraparesis o parálisis (Greene & Appel, 1998; Vandeveldel & Zurbriggen, 2005). En algunos casos, una mejoría en la respuesta inmune especialmente por incremento de anticuerpos neutralizantes puede promover la recuperación del animal. Otros muestran una progresión retardada de la enfermedad y una respuesta inmune moderada con signos clínicos tempranos discretos. Mas tarde como consecuencia de la persistencia viral en el SNC pueden ser observados disturbios manifiestos, expresión de la forma nerviosa del DC. Estos caninos usualmente mueren, pero algunos se recobran y pueden mostrar signos residuales de por vida, tales como una mioclonía persistente.

En ocasiones, puede presentarse una encefalomiелitis crónica por distemper inicialmente silenciosa, sin las manifestaciones extraneurales características, apareciendo signos cerebelosos o vestibulares que progresan a tetraparesia/plegia (Amude *et al.*, 2006)

LESIONES

La infección sistémica por el VDC causa grandes cambios en los tejidos linfoides, tales como nódulos linfáticos aumentados, depleción del MALT y reducción del tamaño del timo. En la fase aguda, las lesiones son caracterizadas microscópicamente por una generalizada depleción de células T y B en los compartimientos del bazo, nódulos linfáticos, MALT y tonsilas, así como hiperplasia de células reticulares en la región medular de los nódulos linfáticos. La atrofia tímica se asocia con un decrecimiento de la razón cortico-medular, demarcación indistinta entre corteza y médula así como una reducción de corpúsculos de Hassall (Krakowka *et al.*, 1980). Además, se observa la formación de sincicios y muerte celular de células inmunes predominantemente en folículos linfoides, conduciendo a una pérdida completa de folículos secundarios en caninos que padecen la forma aguda de la infección. Además, pueden observarse cuerpos de inclusión eosinofílicos citoplasmáticos característicos en células reticulares y linfocitos en caninos afectados (Iwatsuki *et al.*, 1995).

Las lesiones del tracto respiratorio anterior incluyen rinitis e inflamación del árbol traqueobronquial. En los pulmones hay neumonía intersticial difusa, caracterizada por adelgazamiento del tabique alveolar y proliferación del epitelio de los alvéolos con contenido de células epiteliales descamadas y macrófagos, lo que puede transformarse en una bronconeumonía. En la vejiga hay edema en el epitelio de transición. Los cachorros infectados en el momento de reposición dentaria presentan defectos en el esmalte de los dientes y necrosis y degeneración quística del epitelio ameloblástico (Greene & Appel, 1998).

La infección por VDC induce desmielini-

zación multifocal en el SNC. La patogénesis de este proceso no es clara. Se ha identificado la presencia de células apoptóticas en las sustancias blanca y gris del cerebelo de animales infectados naturalmente por el VDC. Se observan placas de desmielinización agudas y crónicas son observadas en la sustancia blanca, mientras la apoptosis ocurre particularmente en la capa granular de la sustancia gris. La apoptosis demuestra jugar un importante rol en la patogénesis de la desmielinización por distemper (Moro *et al.*, 2003). Las lesiones agudas consisten en una vacuolización focal de la materia blanca a la que da un aspecto esponjoso, gliosis leve con pocos astrocitos activados y macró-fagos/microglia. Las lesiones de LD son halladas en el cerebelo y menos frecuentemente en la materia blanca del cerebro y en la médula espinal (Baumgärtner *et al.*, 1989). Los cambios están presentes mas frecuentemente en tractos nerviosos en estrecha proximidad a los ventrículos, dentro del velo cerebeloso, pedúnculos cerebelares y tracto óptico (Summers & Appel, 1994). Las vacuolas crecen en número y tamaño para formar una placa desmielinizada con micro y astrogliosis y formación de células gigantes multinucleadas. Los infiltrados mononu-clears son raros en la fase inicial. La remielinización de los axones desnudos es un raro evento en lesiones desmielinizantes viejas (Raine, 1976). Coincidiendo con la recuperación del sistema inmune, aproximadamente 7 semanas p. i., son halladas en lesiones cerebrales infiltrados de células mononu-clears perivasculares (Vandevelde & Zur-briggen, 2005).

La almohadilla dura representa una manifestación cutánea no común del DC, caracterizada por hiperqueratosis de las almohadillas plantares y del epitelio nasal. Se han hallado más figuras mitóticas y un número significativamente abundante de

queratino-citos en la capa basal. Estos hallazgos sugieren que la presencia de partículas del VDC se asocian con la proliferación de queratino-citos. A pesar que la patogénesis permanece indeterminada, está demostrado que el VDC causa un disturbio en la diferenciación de los queratinocitos y se ha especulado con que una infección epidérmal es también una consecuencia de una infección viral restrictiva (Gröne *et al.*, 2004).

INMUNIDAD PROTECTORA

La inmunidad tanto humoral como mediada por células es crucial para la eliminación del VDC. Los anticuerpos IgM aparecen dentro de las dos semanas post infección (Vandevelde & Zurbriggen, 2005) y su magnitud se correlaciona con las consecuencias de la enfermedad. En general, la inmunidad humoral protectora se debe a la producción de anticuerpos anti nucleoproteína viral, seguidos por la aparición de una respuesta inmune humoral dirigida a las proteínas de envoltura (Miele & Krakowka, 1983). La carencia de una respuesta inmune humoral efectiva conduce a un curso clínico agudo, a menudo fatal. La eliminación de los virus depende de inmunoglobulinas específicas para reconocer proteínas de la envoltura viral, especialmente anti proteína HN, las cuales previenen el desarrollo de lesiones en el SNC (Rima *et al.*, 1991). Sin embargo, una pérdida temporaria de anticuerpos contra la proteína viral M así como una respuesta de anticuerpos fijadores del complemento retardada o disminuida a las proteínas de envoltura viral, resultan en una enfermedad neurológica persistente (Miele & Krakowka, 1983). Además, los anticuerpos neutralizantes y la citotoxicidad humoral mediada por complemento representan factores críticos para la eliminación de partículas virales libres

y para la predicción del resultado clínico (Ho & Babiuk, 1980; Appel *et al.*, 1982, 1984 a). Los anticuerpos neutralizantes previenen la diseminación viral intracelular y extracelular. Sin embargo, la prolongada exposición a los anticuerpos resulta en una internalización de los antígenos virales de superficie en la membrana celular y subsecuentemente su desaparición de la membrana de las células infectadas. Así, a pesar de una reducción de la diseminación viral, la modulación de la expresión de antígeno viral mediada por anticuerpos puede representar un factor que contribuya a la persistencia de la infección, debido posiblemente a la disminución del reconocimiento de antígenos e inadecuada citotoxicidad humoral mediada por complemento (Ho & Babiuk, 1979, 1980; Alldinger *et al.*, 1993). Siguiendo a la infección por el VDC puede detectarse una respuesta inmune humoral específica de por vida, mientras la respuesta inmune celular se detecta solamente por un corto período de tiempo (Appel *et al.*, 1982). Sin embargo, la importancia de la respuesta inmune celular en distemper canino es destacada por la demostración de una inmunidad celular protectora en ausencia de respuesta inmune humoral detectable (Gerber & Marron, 1976).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico suele limitarse a la sospecha clínica. No obstante, aunque la enfermedad multisistémica es fácil de reconocer, no siempre es esta la presentación, existiendo incluso manifestaciones neurológicas no clásicas, que dificultan el diagnóstico. Los cambios clínico patológicos pueden complementarse con otros recursos, que incluyen la detección de la presencia de eritrocitos y monocitos en el LCR, la presencia de anticuerpos anti VDC en el LCR que evidencia

de manera definitiva encefalitis, pues los anticuerpos se producen en forma local, y esto no ocurre en perros vacunados o en enfermos en forma sistémica sin enfermedad neurológica (Greene & Appel, 1998). Además, la radiografía de tórax revela una neumonitis viral con evidencia de infección bacteriana secundaria y los hallazgos hematológicos muestran linfopenia absoluta, resultado de la depleción linfoide, seguida por leucocitosis en la etapa crónica.

Los métodos específicos incluyen la Inmunofluorescencia directa (IFD) utilizada para detectar virus a partir de hisopados de conjuntiva, mucosa genital, tejidos, sangre, LCR u orina. Es imprescindible realizarla en la etapa aguda, que dura una semana y tiene signos epiteliales. Esta prueba no es sensible como un Enzaimmunoensayo (ELISA) o una Transcripción Reversa - Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR), un resultado negativo no descarta la enfermedad y pueden aparecer falsos positivos a causa de fluorescencia no específica. Para la detección de anticuerpos se utilizan las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA, que son muy sensibles y detectan anticuerpos séricos IgM e IgG. También se ha desarrollado una prueba de Inmunocromatografía empleando dos anticuerpos monoclonales anti-VDC, la cual permite un diagnóstico ante mortem rápido, altamente específico y sensible, equivalente a RT-PCR, pero de menor complejidad técnica. Las muestras consisten en fluidos nasales, hisopados conjuntivales o linfocitos, siendo los hisopados conjuntivales de elección (Dong-Jung *et al.*, 2007). Para estudios más especializados, pueden utilizarse pruebas de hibridación de ácidos nucleicos virales con sondas marcadas, dirigidas hacia los segmentos genómicos de mayor interés. La RT-PCR como prueba diagnóstica es capaz de amplificar fragmentos del ácido nucleico

en forma exponencial, aun habiendo en la muestra una sola molécula, indetectable por otros métodos, y puede determinar infección al segundo día de ocurrida. Generalmente se amplifican fragmentos del gen de la NP, región conservada dentro del genoma viral. Además puede aplicarse al estudio de variaciones genéticas del virus, mediante caracterización molecular de secuencias relevantes del genoma (Gallo Calderón *et al.*, 2007).

TRATAMIENTO

Pese a los grandes avances en la investigación del DC, se continúa recomendando la terapéutica tradicional, basada en tratamientos de sostén y el empleo de antibióticos de amplio espectro. Los signos nerviosos por lo general no son reversibles y a menudo son progresivos y conducen a la muerte, la eutanasia, o al establecimiento de secuelas permanentes. Merece una evaluación rigurosa el beneficio de la utilización de inmunomoduladores o análogos de bases purínicas tales como Azatioprina. El agente antiviral Riba-virina ha sido probado *in vitro* sobre mono-capas de células VERO infectadas por el VDC y se reveló como una herramienta promisoriosa para la terapia del DC (Elia *et al.*, 2008).

PROFILAXIS

Los caninos poseen placentación endoteliocorial, recibiendo anticuerpos de la madre entre el 1 y el 5% por vía placentaria y entre el 40 y el 50% vía calostro. El nivel de estos anticuerpos equivale al 77% del título sérico de la madre (Greene & Appel, 2006). Este hecho, de vital importancia para la protección de los cachorros durante las

primeras semanas de vida, puede conspirar contra la eficacia de la primera dosis de vacuna administrada. En general, el nivel de anticuerpos va disminuyendo por degradación de las inmunoglobulinas y llega a niveles de no interferencia entre los 42 y 90 días de edad.

El primer intento de enfrentar el problema consistió en el empleo de una vacuna elaborada con virus Sarampión, un *Morbillivirus* con parentesco antigénico estrecho con el VDC como primer dosis, con el objetivo de inducir inmunidad cruzada (Appel *et al.*, 1984 b)

Las vacunas empleadas corrientemente son a virus atenuado, en asociación con otros virus productores de enfermedades en caninos y a bacterinas contra leptospirosis. Las cepas más utilizadas son la Onderstepoort y la Lederle.

En carnívoros exóticos y muy susceptibles, donde el empleo de vacunas atenuadas no es seguro, se usaron con éxito vacunas inactivadas (Appel & Summers, 1995).

También se encuentra disponible una vacuna cuyo vector es el Canarypox en el cual, utilizando tecnología recombinante, se introdujeron genes que codifican para la expresión de la HN y la proteína F, los dos antígenos inmunogénicos más importantes del VDC. Se postuló su eficacia como primer dosis, aun en presencia de inmunidad pasiva (Pardo *et al.*, 2007).

Se ha desarrollado una vacuna experimental por modificación de la polimerasa viral a partir de virus de campo, lo que resulta en su atenuación, y administrada por vía intranasal provee protección significativa ante el desafío con la cepa parental virulenta. Esto aporta una herramienta más a ser utilizada como respuesta rápida ante la aparición brusca de nuevas cepas, y podría combinarse eficientemente con otras estrategias vacunales (Silin *et al.*, 2007).

BIBLIOGRAFÍA

- ALLDINGER, S.; BAUMGÄRTNER, W. & ÖRVELL, C.** 1993. Restricted expression of viral surface proteins in canine distemper encephalitis. *Acta Neuropathol.* 85, 635-645.
- ALLDINGER, S.; WÜNSCHMANN, A.; BAUMGÄRTNER, W.; VOSS, C. & KREMMER, E.** 1996. Up-regulation of major histocompatibility complex class II antigen expression in the central nervous system of dogs with spontaneous canine distemper virus encephalitis. *Acta Neuropathol.* 92, 273-280.
- AMUDE, A.; ALFIERI, A. & ALFIERI, A. F.** 2007. Clinicopathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. *Res. Vet. Sc.* 82, 416-422.
- APPEL, M.** 1969. Pathogenesis of canine distemper. *A. J. Vet. Res.* 30, 1167-1182.
- APPEL, M.** 1970. Distemper pathogenesis in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156, 1681-1684.
- APPEL, M.; SHEK, W. & SUMMERS, B.** 1982. Lymphocyte-mediated immune cytotoxicity in dogs infected with virulent canine distemper virus. *Infect. Immun.* 37, 592-600.
- APPEL, M.; MENDELSON, S. & HALL, W.** 1984. Macrophage Fc receptors control infectivity and neutralization of canine distemper virus-antibody complexes. *J. Virol.* 51, 643-649.
- APPEL, M.; SHEK, W.; SHESBERADARAN, H. & NORRBY, E.** 1984. Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch. Of Virol.* 82, 73-82.
- APPEL, M.; REGGIARDO, C.; SUMMERS, B.; PEARCE-KELLING, S.; MARÉ, C.; NOON, T.; REED, R.; SHIVELY, J. & ÖRVELL, C.** 1991. Canine distemper virus infection and encephalitis in javalinas (collared peccaries). *Arch. Virol.* 119, 147-152.
- APPEL, M.; YATES, R.; FOLEY, G.; BERNSTEIN, J.; SANTINELLI, S.; SPELMAN, L.; MILLER, L.; ARP, L.; ANDERSON, M. & BARR, M.** 1994. Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 277-288.
- APPEL, M. & SUMMERS, B.** 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet. Microbiol.* 44, 187-191.
- BAUMGÄRTNER, W.; ÖRVELL, C. & REINACHER, M.** 1989. Naturally occurring canine distemper virus encephalitis: distribution and expression of viral polypeptides in nervous tissues. *Acta Neuropathol.* 78, 504-512.
- BAUMGÄRTNER, W.; ALLDINGER, S.; GAEDKE, K. & MORITZ, A.** 1996. Metaphyseal osteosclerosis in young dogs with naturally occurring distemper. *Eur. J. Vet. Pathol.* 2, 23-32
- BAUMGÄRTNER, W. & ALLDINGER, S.** 2005. The pathogenesis of canine distemper virus induced demyelination – a biphasic process. In: Lavi, e., Constantinescu, C.S. (Eds.). *Experimental Models of Multiple Sclerosis*. Springer, New York, pp. 871-887.
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F. & BAUMGÄRTNER, W.** 2009. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Vet. Immunol. and Immunopathol.* 127, 1-18.
- BÜRGE, T.; GRIOT, C.; VANDEVELDE, M. & PETERHANS, E.** 1989. Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. *J. Virol.* 63, 2790-2797.
- CAMMER, W.; BLOOM, B.; NORTEN, W. & GORDEN, S.** 1978. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages:

- a possible mechanism of inflammatory demyelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 1554-1558.
- CASWELL, J. & WILLIAMS, K.** 2007. Respiratory system. In: Grant Maxie, M. (Ed.). *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th. Edition. Elsevier Saunders, Edinburgh. London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, pp. 635-636.
- DIALLO, A.** 1990. Morbillivirus group: genome organization and proteins. *Vet. Microbiol.* 23, 155-163.
- DONG-JUN, A.; TAE-YOUNG, K.; DAE-SUB, S.; BO-KYU, K. & BONG-KYUN, P.** 2007. An immunochromatography assay for rapid antemortem diagnosis of dogs suspected to have canine distemper. *J. Virol. Meth.* 147, 244-249.
- DUBIELZIG, R.; HIGGINS, R. & KRAKOWKA, S.** 1981. Lesions of the enamel organ of developing dog teeth following experimental inoculation of gnotobiotic puppies with canine distemper virus. *Vet. Pathol.* 18, 684-689.
- ELIA, G.; BELLONI, CH.; CIRONE, F.; LUCENTE, M.; CARUSO, M.; MARTELLA, V.; DECARO, N.; BUONAVOGLIA, C. & ORMAS, P.** 2007. In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiv. Res.* 77, 108-113.
- FRISK, A.; 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. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3634-3643.
- GAEDKE, K.; ZURBRIGGEN, A. & BAUMGÄRTNER, W.** 1999. Lack of correlation between virus nucleoprotein and mRNA expression and the inflammatory response in demyelinating distemper encephalitis indicates a biphasic disease progress. *Eur. Vet. Pathol.* 5, 9-20.
- GALLO CALDERON, M.; REMORINI, P.; PERIOLO, O.; IGLESIAS, M.; MATTON, N. & LA TORRE, J.** 2007. Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Vet. Microbiol.* 125, 341-349.
- GERBER, J. & MARRON, A.** 1976. Cell-mediated immunity and age at vaccination associated with measles inoculation and protection of dogs against canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 37, 133-138.
- GREENE, C. & APPEL, M.** 1998. Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. Pp. 9-22.
- GREENE, C. & APPEL, M.** 2006. Canine distemper. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd. Edit, C. E. Greene, Ed., Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 24-41
- GRÖNE, A.; ALLDINGER, S. & BAUMGÄRTNER, W.** 2000. Interleukin-1beta, -6-12 and tumor necrosis factor-alfa expression in brains of dogs with canine distemper virus infection. *J. Neuroimmunol.* 110, 20-30.
- GRÖNE, A.; DOHERR, M. & ZURBRIGGEN, A.** 2004. Canine distemper virus infection of canine footpad epidermis. *Vet. Dermatol.* 15, 159-167.
- HAAS, L.; MARTENS, W.; GREISER-WILKE, I.; MAMAEV, L.; BUTINA, T.; MAACK, D. & BARRET, T.** 1997. Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. *Virus Res.* 48, 165-171.
- HO, C. & BABIUK, L.** 1979. Immune mechanisms against canine distemper. II. Role of antibody in antigen modulation and prevention of intercellular and intracellular spread of canine distemper virus. *Immunology* 38, 765-772.

- HO, C. & BABIUK, L.** 1980. Immune mechanisms against canine distemper. III. Role of complement lysis in the immunity and persistent infection of canine distemper virus. *Immunology* 39, 231-237.
- IWATSUKI, K.; OKITA, M.; OCHIKUBO, F.; GEMMA, T.; SHIN, W.; MIYASHITA, N.; MIKAMI, T. & KAI, C.** 1995. Immunohistochemical analysis of the lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J. Comp. Pathol.* 113, 185-190.
- KOUTINAS, A.; BAUMGÄRTNER, W.; TON-TIS, D.; POLIZOPOULOU, Z.; SARIDOMICHELAKIS, M., LEKKAS, S.** 2004. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. *Vet. Pathol.* 41, 2-9.
- KRAKOWKA, S., COCKERELL, G., KOESTNER, A.** 1975. Effects of canine distemper virus infection on lymphoid functions in vitro and in vivo. *Infect. Immun.* 11, 1069-1078.
- KRAKOWKA, A., HOOVER, E., KOESTNER, A., KETRING, K.** 1977. Experimental and Naturally Occurring Transplacental Transmission of Canine Distemper Virus. *Am. J. Vet. Res.*, Vol. 38, nº7, 919-922.
- KRAKOWKA, S., HIGGINS, R., KOESTNER, A.** 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41, 284-292
- KRAKOWKA, S., AXTHEL, M., JOHNSON, G.** 1985. Canine distemper virus. In: Olsen, R., Krakowka, S., Blakeslee, J. R. (Eds.). *Comparative Pathobiology of Viral Diseases*. Vol. 2. CRC Press. Boca Raton. Pp. 137-164.
- KRAKOWKA, S.** 1989. Canine distemper virus infectivity of various blood fractions for central nervous system vasculature. *J. Neuroimmunol.* 21, 75-80.
- KRAKOWKA, S. & KOESTNER, A.** 1997. Comparison of canine distemper virus strains in gnotobiotic dogs: effects on lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 38, 1919-1922.
- LAMB, R. A. & KOLAKOSKY, R.** 2001. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds.). *Fields of Virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1305-1443.
- LAN, N., YAMAGUCHI, R., FURUYA, Y., INOMATA, A., NGAMKALA, S., NAGANOBU, K., KAI, K., MOCHIZUKI, M., KOBAYASHI, Y., UCHIDA, K., TATEYAMA, S.** 2005. Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain 007Lm, a new isolate in dogs. *Vet. Microbiol.* 110, 197-207.
- LÖFFLER, S., LOTTSCHEIDT, F., LANZA, F., AZORSA, D., ter MEULEN, V., SCNEIDER-SCHAULIES, J.** 1997. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J. Virol.* 71, 42-49.
- McCULLOUGH, S., McNEILLY, F., ALLAN, G., KENNEDY, S., SMYTH, S., COSBY, S., McQUAID, S., RIMA, B.** 1991. Isolation and characterization of a porpoise morbillivirus. *Arch. Virol.* 118, 247-252.
- MESSLING, V., SPRINGFELD, C., DEVAUX, P., CATTANEO, R.** 2003. A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *J. Virology*, Dec. 12579-12591.
- MIELE, J., KRKOWKA, S.** 1983. Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infect. Immun.* 41, 869-871.
- MONTGOMERY, D.** 1994. Astrocytes: form, functions, and roles in disease. *Vet. Pathol.* 31, 145-167.
- MORI, T., SHIN, Y., OKITA, M., HIRAYAMA, N., MIYASHITA, N., GEMMA, T.,**

- KAI, C., MIKAMI, T.** 1994. The biological characterization of field isolates of canine distemper virus from Japan. *J. Gen. Virol.* 75, 2403-2408.
- MORITZ, A., FRISK, A., BAUMGÄRTNER, W.** 2000. The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.* 10, 37-47.
- MORO, L., de SOUSA MARTINS, A., de MORAES ALVES, C., de ARAUJO SANTOS, F., dos SANTOS NUNES, J., CARNEIRO, R., CARVALHO, R., VASCONCELOS, A.** 2003. Apoptosis in canine distemper. *Arch. Virol.* 148, 153-164.
- NESSELER, A., BAUMGÄRTNER, W., GAED-KE, K. & ZURBRIGGEN, A.** 1999. Restriction of virus protein translation in canine distemper virus inclusion body poliomyelitis. *Vet. Microbiol.* 69, 23-28.
- 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. *J. Comp. Pathol.* 116, 403-408.
- ORLANDO, E.; IMBSCHWEILER, I.; GERHAUSER, I.; BAUMGÄRTNER, W. & WEWETZER, K.** 2008. In vitro characterization and preferential infection by canine distemper virus of glial precursors with Schwann cell characteristics from adult canine brains. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, in press.
- ÖRVELL, C.** 1980. Structural polypeptides of canine distemper virus. *Arch. Virol.* 66, 193-206
- PARDO, I.; JOHNSON, G. & KLEIBOEKER, S.** 2005. Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J. Cl. Microbiol.* Oct. 5009-5017.
- PARDO, M.; TANNER, P.; BAUMAN, K.; SILVER, K. & FISCHER, L.** 2007. Immunization of Puppies in the Presence of Maternally Derived Antibodies Against Canine Distemper Virus. *J. Comp. Path.* Vol. 137, S72-S75.
- PRINGUE, C. R.** 1999. Virus Taxonomy at the XI International Congress of Virology. Australia. *Arch. Virol.* 144, 2065-2070.
- RAINE, C.** 1976. On the development of CNS lesions in natural canine distemper encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* 30, 13-28.
- REUTEMANN, S.; GOLLÁN, A.; PINOTTI, M. & OCCHI, H.** 2006. Distemper canino: Detección por inmunofluorescencia directa (IFD) y recuperación de cepas circulantes. Encuentro de Jóvenes Investigadores Universidad Nacional del Litoral.
- RIMA, B.; DUFFY, N.; MITCHELL, W.; SU-MMERS, B. & APPEL, M.** 1991. Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Arch. Virol.* 121, 1-8.
- ROLKE-PARKER, M.; MUNSON, M.; PACKER, C.; KOCH, R.; CLEVELAND, S.; CARPENTER, M.; O'BRIEN, S.; POSPISCHIL, A.; HOFMANN-LEHMANN, R. & LUTZ, H.** 1996. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature* 379, 441-445.
- SCAGLIARINI, A.; BATTILANI, M.; CIULLUS, S.; PRÓSPERI, S. & MORGANTI, L.** 2003. Molecular analysis of the NP gene of Italian canine distemper virus isolates. *Veterinary Research Communications.* 27-Suppl. 1. 355-357.
- SILIN, D.; LYUBOMSKA, O.; LUDLOW, M.; DUPREX, W. & RIMA, B.** 2007. Development of a challenge-protective vaccine concept by modification of the viral RNA-dependent RNA polymerase of canine distemper virus. *J. Virol.* Dec. 13649-13658.
- STEIN, V.; CZUB, M.; SCHREINER, N.; MOORE, P.; VANDELDELDE, M.; ZUR-**

- BRIGGEN, A. & TIPOLD, A.** 2004. Micro-glial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J. Neuroim.* 153, 122-131.
- STEIN, V.; SCHREINER, N.; MOORE, P.; VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. & TIPOLD, A.** 2008. Immunophenotypical characterization of monocytes in canine distemper virus infection. *Vet. Microbiol.* 131, 237-246.
- SUMMERS, B.; GREISEN, H. & APPEL, M.** 1979. Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* 46, 1-10.
- SUMMERS, B.; GREISEN, H. & APPEL, M.** 1984. Canine distemper encephalomyelitis: an ultrastructural analysis. *J. Neurocytol.* 16, 871-881.
- SUMMERS, B. & APPEL, M.** 1994. Aspects of canine distemper virus and measles encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 525-534.
- TATSUO, H. & YANAGI, Y.** 2002. The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.* 46, 135-142.
- TIPOLD, A.; MOORE, P.; ZURBRIGGEN, A.; BURGNER, I.; BARBEN, G. & VANDELDELDE, M.** 1999. Early T cell response in the central nervous system in canine distemper virus infection. *Acta Neuropathol.* 97, 45-56.
- TSAI, S.; SUMMERS, B. & APPEL, M.** 1982. Interferón in cerebrospinal fluid. A marker for viral persistence of canine distemper encephalomyelitis. *Arch. Virol.* 72, 257-265.
- VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; HIGGINS, R. & PALMER, D.** 1985. Spread and distribution of viral antigen in nervous canine distemper. *Acta Neuropathol.* 67, 211-218.
- VANDELDELDE, M.; ZURBRIGGEN, A.; STECK, A. & BICHSEL, P.** 1986. Studies on the intrathecal humoral immune response in canine distemper encephalitis. *J. Neuroimmunol.* 11, 41-51.
- VANDELDELDE, M.** 2004. The pathogenesis of nervous distemper. *Vet. Sc. Tom.* 1-5
- VANDELDELDE, M. & ZURBRIGGEN, A.** 2005. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathol.* 109, 56-68.
- WENZLOW, N.; PLATTET, P.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A. & GRÖNE, A.** 2007. Immunohistochemical demonstration of the putative canine distemper virus receptor CD150 in dogs with and without distemper. *Vet. Pathol.* 44, 943-948.
- WRIGHT, N.; CORNWELL, A.; THOMPSON, H. & LAUDER, I.** 1974. Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Vet. Rec.* 94, 86-92.
- WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E. & BAUMGÄRTNER, W.** 1999. Identification of CD4+ and CD8+ cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 67, 101-116.
- WÜNSCHMANN, A.; KREMMER, E. & BAUMGÄRTNER, W.** 2000. Phenotypical characterization of T and B cells areas in lymphoid tissues of dogs with spontaneous distemper. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 73, 83-98.
- YOSHIKAWA, Y.; OCHIKUBO, F.; MATSUBARA, Y.; TSURUOKA, H.; ISHII, M.; SHIROTA, K.; NOMURA, W.; SUGIYAMA, M. & YAMANOUCHI, K.** 1989. Natural infection with canine distemper virus in a Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet. Microbiol.* 20, 193-205.
- ZURBRIGGEN, A.; GRABER, H. & VANDELDELDE, M.** 1995. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J. Virol.* 69, 1678-1686.