



229  
202

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**ESTUDIO DEL VIRUS DEL DISTEMPER (MOQUILLO  
CANINO) EN CULTIVOS CELULARES PARA  
EVALUAR SU CAPACIDAD HEMOADSORBENTE,  
HEMOAGLUTINANTE Y PRODUCCION  
DE EFECTOS CITOPATOGENICOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**SERAFIN PEREZ DELGADO**

**ASESORES:**

**MVZ. RAYMUNDO ITURBE RAMIREZ**

**MVZ. EMETERIO SALDIVAR ZUÑIGA**

**MEXICO, D. F.**

**FALLA DE ORIGEN**

**1991**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	4
MATERIAL.....	5
METODO.....	6
RESULTADOS.....	8
DISCUSION.....	12
CONCLUSIONES.....	17
LITERATURA CITADA.....	18

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento del virus del Distemper Canino (VDC) en cultivos celulares primarios y de línea, para ello se emplearon diversos VDC aislados de encéfalos provenientes de perros que murieron mostrando una sintomatología nerviosa, histológicamente estos encéfalos presentaron cuerpos de inclusión y reacción positiva por inmunofluorescencia (IF) al emplear un conjugado anti-VDC. Cada muestra se inoculó en células VERO y en Cultivo Primario de Riñón de Perro (CRP) para evaluar la capacidad de: a) producir efectos citopáticos (ECP), b) reaccionar frente a un conjugado fluorescente anti-VDC, c) hemoaglutinar glóbulos rojos de diversas especies en diferentes condiciones y d) hemoadsorber glóbulos rojos. Los resultados mostraron que: a) no hubo diferencia alguna entre emplear células VERO y CRP, observándose cambios citopáticos que permitieron diferenciar un cultivo infectado de uno no infectado, b) el 88% de las muestras conservaron su anátigenicidad, ya que resultaron positivas en la prueba de IF, observándose la mayor intensidad de fluorescencia específica a las 48 horas postinfección, c) el 58% de las muestras mostraron hemoadsorción y d) ninguna muestra incluyendo los testigos fue capaz de hemoaglutinar. No fue posible con base a los resultados obtenidos establecer diferencias entre los virus "de campo" y los vacunales.

## INTRODUCCION

El distemper (moquillo canino, enfermedad de Carré) es una enfermedad producida por un paramixovirus del genero morbíllivirus. Esta enfermedad infecciosa afecta a canidos (perros, lobos y coyotes), procionidos (mapaches) y a mustelidos (hurones y visones). 7, 8, 14, 25, 29

Los virus de la familia paramixoviridae tienen ARN de una sola cadena, son pleomórficos, su diámetro es de 100-300 nanómetros y la nucleocápside es helicoidal con envoltura. La replicación de estos virus se lleva a cabo en el citoplasma y maduran por brote a través de la membrana celular. 8, 21

El virus del distemper relacionado antigénicamente con los de la peste bovina y sarampión, contiene hemoaglutinina pero no neuraminidasa, es sensible a solventes lípidos, estable a pH de 5-10, puede permanecer activo durante 1 mes a -10°C e indefinidamente a -76°C o liofilizado. 1, 17, 25

El distemper se ha diagnosticado en todo el mundo, incluyendo México en donde se considera una enfermedad enzoótica que afecta principalmente a perros jóvenes, siendo algunas razas más susceptibles, entre ellas el pastor alemán. 10, 20

El periodo de incubación de la enfermedad es de 3-8 días y los animales presentan fiebre difásica, descarga nasal y ocular, vómito, diarrea, disnea y a veces hiperqueratinización de los cojinetes plantares. Las manifestaciones nerviosas son hiperestesia, incoordinación, convulsiones, postración para

electroforesis en geles de poliacrilamida muestran que hay diferencias en el patrón electroforético de las proteínas H y F; la primera es capaz de hemoadsorber y la segunda responsable de la fusión del virus con la célula huésped. Esto es muy importante ya que hay informes de casos de distemper en los que la evidencia sugiere que el virus vacunal fue el responsable del cuadro clínico observado. 5,6,23,24,28,30,37

### III.- HIPOTESIS

Es probable que las diferencias en las proteínas H y F se asocien con la virulencia del virus, así como con su capacidad de producir efectos citopatogénicos (ECP), hemoadsorber y hemoaglutinar globulos rojos de diferentes especies. Los virus de campo producirán ECP en cultivos celulares y tendrán una mayor capacidad hemoadsorbente y hemoaglutinante. En cambio los virus vacunales no producirán ECP y tendrán una menor capacidad hemoadsorbente y hemoaglutinante.

### IV.- OBJETIVOS

- a) intentar evaluar la capacidad del virus del distemper de producir efectos citopatogénicos en cultivos celulares primarios y de línea.
- b) Hemoaglutinar globulos rojos de diferentes especies a distintos pH y concentraciones.
- c) evaluar la capacidad hemoadsorbente en cultivos celulares infectados con el virus del distemper.

**MATERIAL**

V. - MATERIAL

- 1.- muestras congeladas de tejido nervioso provenientes de perros que mostraron una signología predominantemente nerviosa, positivos al virus del distemper por IF, con cuerpos de inclusión al examen histológico y mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- células de riñón de mono verde (VERO)<sup>a</sup>, crecidas en Medio Mínimo de Eagle (MEM), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 UI de penicilina y 100  $\mu\text{g}$  de estreptomycin por ml de medio).
- 3.- conjugado antimoquillo canino producido y elaborado de acuerdo a la técnica de Kawamura<sup>c</sup> (22)
- 4.- suero hiperinmune contra la hepatitis canina, elaborado de acuerdo a la técnica de Lennette<sup>d</sup> (26)
- 5.- virus vacunal del distemper de una vacuna comercial<sup>f</sup>, con el que se infectaron cultivos de células utilizandolas como testigo
- 6.- cultivo primario de células renales de perro (CRP), obtenido de acuerdo al procedimiento descrito por Lennette. (26) crecidas y mantenidas con MEM adicionado de SFB y antibióticos.  
a, b, c, d, -proporcionados por el departamento de inmunología y Virología de la FMVZ, UNAM.  
c. - GIBCO laboratories, 3175 Stanley Road, Grand Island, New York, 14 072, N.Y. USA.  
f. - vacuna Vanguard DA<sub>2</sub>L, Smith Kline, Lab. Norden de México

## METODO

## RESULTADOS

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA,  
REALIZADA A LAS 24, 48 Y 72 HORAS

Identificación de las            24 hrs            48 hrs            72 hrs  
muestras

	24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	++	++
4	+	++	++
5	+	++	++
6	-	-	-
7	+	++	++
8	+	++	++
9	+	++	++
10	+	++	++
11	+	++	++
12	+	++	++
13	+	++	++
14	+	++	++
15	+	++	++
16	+	++	++
17	+	++	++
testigo	+	++	++

nota: - = reacción negativa

++ = máxima intensidad

+ = reacción positiva

de fluorescencia

cuadro 2

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMOADSORCION

Identificación de            24 hrs            48 hrs            72 hrs  
las muestras

1	+	+	+
2	-	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	-	-	-
15	+	+	+
16	-	-	-
17	-	-	-
testigo	+	+	+

cuadro 3

RESULTADOS DE LA PRODUCCION DE EFECTO CITOPATICO EN  
CULTIVOS CELULARES A LAS 24, 48 Y 72 HORAS  
POSTINOCULACION

Identificación de las

muestras

24 hrs

48 hrs

72 hrs

1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	+	+	+
9	-	-	-
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	-	-	-
17	-	-	-
testigo	-	-	-

nota: - = ausencia de ECP, + = ECP

## DISCUSION

## DISCUSION

El tejido nervioso del cual se tomaron los inóculos era de animales clínicamente enfermos que presentaron un cuadro predominantemente nervioso, y que finalmente perecieron, lo cual de acuerdo a la información disponible, sugiere se trata de virus virulentos (9,24,34). Estos virus debieron producir ECP, en este estudio al inocular las muestras se observó que sólo el 76% los produjo. Metzler ( 31 ) informa que en el primer pase a cultivos celulares las probabilidades de réplica del virus del distemper están restringidas y se incrementan para el segundo pase, de tal manera que se pueden observar ECP que desaparecen para el tercero, esto puede explicar el 24% de muestras negativo obtenido en este trabajo, en el que sólo se realizaron 2 pases.

Morikawa (34) trabajando con el virus del distemper adaptado a células no neurales como las VERO encontró que si se les daba pase nuevamente a estos virus a células de la oligodendroglía, los virus recuperaban su virulencia, en cambio si los pases se efectuaban en células del neuroblastoma la reversión de su virulencia era parcial, este evento indica que los virus provenientes de tejido nervioso pasados a células no neurales ven su réplica restringida y por ende poca probabilidad de observar ECP marcados.

Otros autores mencionan que algunos virus del distemper aislados de perros que mostraron cuadros respiratorios cró-

la célula huésped, así como de la inducción de inmunoglobulinas capaces de neutralizar al virus en vivo (35,36,40). Esto cobra particular importancia si tenemos presente que las pruebas de seroneutralización que se realizan in vitro, determinan la presencia de inmunoglobulinas contra la proteína H (hemoaglutinante) que no brinda protección en vivo (32,43). Por otra parte se ha determinado que cuando la proteína F se fracciona lentamente se trata de virus de baja virulencia y si se fracciona rápidamente se trata de virus virulentos (41), en este trabajo los cambios observados a las 24,48 y 72 horas así como la severidad de ellos, no permitieron establecer diferencia alguna respecto al grado de virulencia de los mismos.

Otra situación conocida que participa en el agravamiento del cuadro clínico es que, el virus del distemper al igual que el del sarampión, produce estados de inmunodeficiencia, pues se réplica en tejido linfoide (células cooperadoras CD4 y CD8) y má crofagos, provocando además la liberación de factores inmunosupresores como las prostaglandinas (PGE2) que suprimen la actividad de linfocitos cooperadores, e inhibiendo la liberación de sustancias que estimulan a las células T como la interleucina 2, o incrementando la actividad de leucotrienos (33,38,39). Esta información permite explicar en parte, porqué a pesar de la vacunación, siempre se observan casos fatales, la información disponible en el caso del sarampión dice que el 0.1% de cada 1000 casos es fatal (39), a pesar de efectuar programas de vacuna-

ción, dichos casos se atribuyen a transmisión aérea, alta probabilidad de contacto, registros de vacunación inciertos y respuesta inmune inadecuada ya sea por la temprana edad de vacunación, bloqueo inmunológico o por el efecto inmunosupresor mencionado anteriormente (31,39).

Desafortunadamente para el caso del distemper no se encuentra información disponible al respecto, excepto que es la enfermedad de perros que más se diagnóstica después de la rabia en la FMVZ (12,13) y en otro estudio se menciona que por cada caso de rabia confirmado por laboratorio, existen 1.27 casos de distemper (20), desconociéndose por completo el porcentaje de la población canina vacunada y la frecuencia con que esto se realiza, así como las vacunas (cepas) utilizadas, por lo que resulta difícil obtener conclusión alguna al respecto del comportamiento de estos biológicos en la población canina existente en México.

En cuanto a los resultados obtenidos con la prueba de hemaglutinación debe señalarse que no se observaron resultados positivos a pesar de haber utilizado pH, tipos de sangre y temperatura diferentes, confirmando así lo mencionado por otros autores que informan que esta prueba no es constante y fiable como método de diagnóstico (5,19). Por otro lado en la prueba de hemoadsorción se observó que el 59% resultó positivo, desafortunadamente al no disponer de datos obtenidos por otros autores, es difícil hacer comparación alguna, sin embargo Baczko (3) utilizando la prueba de electroforésis en geles de poliacrilamida, in-

forma que la proteína H es detectada ocasionalmente, en comparación con la proteína N (nucleocápside) y la P (fosfoproteína) que son determinadas constatemente, lo cual puede explicar la inconsistencia de los resultados obtenidos con ambas pruebas.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo, así como la información disponible al respecto, se puede afirmar que el 76% de las muestras analizadas se comportan como virus virulentos al producir ECP, sin que sea posible establecer si el origen de estos virus es o no vacunal. Sin embargo el aislamiento del virus en tan pocos países, sugiere la posibilidad de que los causantes de la enfermedad hayan sido de origen vacunal ya que para que el virus de campo o virulento sea aislado se requiere de muchos países.

LITERATURA

- 1.- Andrewes C.: Viruses of Vertebrates, 4th ed. Bailliere Tindall. London, England, 1978.
- 2.- Axtelm M. Krakowka S. and Gorham J.: Canine distemper virus: in vivo virulence of in vitro-passaged persistent virus strains. Am J. Vet. Res., 48:227-233, 1987.
- 3.- Baczko K.: Restriction of Measles Virus Gene Expression in Measles Inclusion Body Encephalitis., J. Infect. Dis. 158:144-150, 1988.
- 4.- Belixenkron M.: Detection of intracelular canine distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine distemper virus. Am. J. Vet. Res., 50:1616-1620, 1989
- 5.- Burge T., Griot C., Vandeveld M. and Peterhans E.: Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine distemper virus. J. virol., 63:2790-2797, 1989.
- 6.- Calain Ph. and Roux L: Generation of Measles Virus Defective Interfering Particles and Their Presence in a Preparation of attenuated Live-Virus Vaccine. J. Virol., 62:2859-2866, 1988.
- 7.- Carrigan D.: Round Cell Variant of measles Virus: Mechanisms involved in the Establishment of defective Viral infection of the Central Nervous System. Virol. 155:614-624, 1986.

- 16.- Freshney R.: *Animal Cell Culture a Practical Approach*  
IRL Press Limited, Oxford England (1986).
- 17.- Giot C. Vandeveldel M. and Peterhans E.: Antibody-  
induced generation of reactive oxygen radicals by brain  
macrophages in canine distemper encephalitis: a mecha-  
nism for bystander demyelination. Acta Nrurophat.,  
78:396-403, 1989.
- 18.- Groelke J., Dixon L., Cummings C. and Baseman J.: Vi-  
rus contamination and citopatology of ferret tracheal  
epithelial cells in culture caused by vaccination with  
distemper virus. Lab. Anim. Sci.: 527-529, 1986.
- 19.- Howe C. and Lee L.: virus-erithrocyte interactions virus  
advances in research. XVII, Academic Press, New York,  
USA, 1972.
- 20.- Iturbe, R.R., Diagnóstico de moquillo canino por inmu-  
nofluorescencia directa en perros diagnosticados clínica-  
mente como rabiosos, Vet. Mex. 20:161-167, 1989.
- 21.- Johnson T., Griffin E. and Moench R.: Pathogenesis  
of measles inmunodeficiency and encephalomyelitis: para-  
lles to AIDS. Mic. Path. 4:169-174, 1988.
- 22.- Kawamura A.: Fluorescent antibody techniques and their  
aplications, Zand. University of Tokyo Press, Tokyo  
Japan (1977)
- 23.- Kimoto T.: In vitro and in vivo propiertis of the virus  
causing natural canine distemper encephalitis.

vitro propagation of canine distemper virus: Establishment of persistent infection in VERO cells. Am. J. Vet. Res., 45:2211-2214, 1984.

- 32.- Mirchamsy H., Shalfyi A., Nazarin P., Ashtiani P. and Sassani A.: Evaluation of live attenuated measles vaccine prepared in human diploid cells for reimmunization. Epidem. Inf., 101:437-443, 1988.
33. Morikawa Y., Yoshikawa Y. and Yamanouchi K.: Characterization of canine distemper viruses adapted to human neural cells. Microbiol. Immunol., 32:1211-1220, 1988.
- 34.- Morikawa Y., Yoshikawa Y. and Yamanouchi K.: Reversion of neurovirulence and in vitro phenotype of neural cell adapted canine distemper virus after passage in non-neural cells. Microbiol. Immunol., 32:1263-1268, 1988.
- 35.- Morrison T.: Structure, function, and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. Virus Res. 10:113-136, 1988.
- 36.- Olsen G. and Krakowka S.: Inmunología e Inmunopatología de los animales domésticos. El manual moderno, México, (1983).
- 37.- Povey Ch.: Distemper vaccination of dogs: factors which could cause vaccine failure. Can. Vet. J., 27:321-323, 1986.
- 38.- Rouse T. and Horohov W.: Immunosuppression in viral infections. Rev. Infec. Dis., 8:223-238, 1988.

- 39.- Rude T.: Canine Distemper Virus: infection and prevention  
Canine Pract., 14:16-24, 1987.
- 40.- Shen D., Cox N. and Swango L.: Electroforetic determination of albumin and gamma globulin concentrations in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalomyelitis attributable to canine distemper virus infection: 13 cases.  
Am. Vet. Med. Assn., 195:977-980, 1989.
- 41.- Sheshberadaran H., Norby E., Kennet C. and Orvell C.: The antigenic Relationship between measles, canine distemper and Rinderpest Viruses Studied with Monoclonal Antibodies. J. gen. virol., 67:1381-1391, 1986.
- 42.- Summers B. and Appel M: Sincytia formation: and aid in the diagnosis of canine distemper encephalomyelitis. J. comp. Path., 95:433-434, 1985.
- 43.- Rudolf. T.: Acute Measles in Patients with and Without Neurological Involment: Distribution of measles Virus Antigen and RNA. J. Infec. Dis., 158:433-442, 1988.
- 44.- Yoshikawa Y., Ochikubo F., Matsubara Y., Tsurouka H., Ishii M., Shirota K., Nomura Y., Sugiyama M and Yamanouchi K.: Natural Infection with Canine Distemper Virus in a Japanese Monkey (*Macaca fuscata*). Vet. Microbiol., 20:193-204, 1989.