



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**"IDENTIFICACION DEL VIRUS PARAINFLUENZA
CANINA TIPO 2, POR MEDIO DE
HEMOAGLUTINACION VIRAL E INOCULACION
EN EMBRIONES DE POLLO"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
JOSE ISABEL GARAY VALDEZ

ASESOR: MVZ. MC. HUMBERTO ALEJANDRO MARTINEZ RODRIGUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

ATN: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 29 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Identificación del Virus Bacteriódico, Causante de la Hemaglutinación Viral e Inhibición de esta acción, la cual"

que presenta el pasante: García Velasco José Joaquín
con número de cuenta: 365020-3 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario y Zootecnista.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a ___ de _____ de 199__

PRESIDENTE	<u>Dr. Jaime Keller Torres</u>	<i>[Firma]</i>
VOCAL	<u>M. C. Ricardo A. Martínez Ruiz</u>	<i>[Firma]</i>
SECRETARIO	<u>M. C. Fernando Alvarado</u>	<i>[Firma]</i>
PRIMER SUPLENTE	<u>M. C. Ricardo Curió</u>	<i>[Firma]</i>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. C. Enrique Pluma García</u>	<i>[Firma]</i>

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre y a mis hermanos, con todo el respeto les dedico este trabajo, por su apoyo que me han brindado en toda mi vida y a todos los profesores de la FES-C que gracias a sus conocimientos, dedicacion y esfuerzo desinteresado han hecho posible la adquisicion de los conocimientos profesionales que hoy poseo y principalmente a mi jurado y al profesor Humberto Alejandro Martinez Rodriguez asesor de tesis.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	20
MATERIAL Y METODOS	22
RESULTADOS	30
DISCUSION	34
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar la eficacia de los embriones de pollo y la prueba de Hemoaglutinación; para aislar e identificar al Virus Parainfluenza Canina tipo 2 (VPIC-2). Para esto se estudiaron 170 muestras de secreción nasal de perros sin tomar en cuenta su raza, sexo o edad, de albergues y centros de control canino del DF, con signos clínicos confinados al tracto respiratorio superior tal como: Descarga nasal, tos seca de leve a severa, las cuales se cultivaron en embriones de pollo de 9 a 11 días de edad, para reproducir el virus sospechoso; identificándose la presencia viral a través de la prueba de Hemoaglutinación viral. Obteniéndose del total de muestras sospechosas estudiadas solo 14 positivas, 135 negativas y 21 dudosas a esta prueba. Lo cual puede sugerir la presencia del Ag. Hemoaglutinante, siendo este resultado un acercamiento preliminar en la identificación del VPIC-2, pero no concluyente, ya que hubiera sido necesario realizar a cada muestra y a cada suero positivo de los perros que no se hizo, la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación la cual si hubiera sido concluyente.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Desde principios de los años 40 se difundió en la bibliografía la opinión de que el virus del Moquillo Canino no era el único agente causal de afecciones respiratorias infecciosas en el perro, con distintas denominaciones se intentó, en base a su limitación al tracto respiratorio y a los síntomas clínicos diferenciar el síndrome del cuadro de Moquillo Canino. Prier (1956) denominó a la afección " Kennel cough" de acuerdo con el sintoma que se advertía con mayor frecuencia en los repetidos brotes de esta enfermedad respiratoria que se producía regularmente en las grandes concentraciones de perros, a pesar de haber eliminado de ellas el Distemper Canino con las correspondientes medidas inmunoprolifáticas. En la búsqueda de la causa de la "tos de las perreras" se han evidenciado desde 1962, además de bacterias y micoplasmas, diversos agentes virales (Larski Z. 1989).

El primer aislamiento del Virus Parainfluenza Canina tipo 2 (VPIC-2) , se realizó en EUA por Bin y col en 1967, en perros de laboratorios con enfermedades respiratorias, la cepa se designó como C 958 aislada de un perro que había muerto de neumonía (Larski Z 1989). Aunque los reportes sobre este virus son escasos y recientes abarcan todo el mundo e incluyen los siguientes estudios: A finales de 1985 ocurrió un brote de enfermedad respiratoria en perros de una perrera de Tokio, los signos clínicos comunes fueron depresión, anorexia, descarga nasal, tos seca de leve a severa. No se consideró al Virus de Moquillo Canino como agente causal. Se reportaron dos virus de diferentes perros y se les identificó como Adenovirus canino tipo 2 y VPIC-2. Aunque se consideró al Adenovirus canino tipo 2 como el agente causal principal, la presencia de VPIC-2 fue evidente, siendo necesario la presencia de bacterias

oportunistas para que se apreciaran los signos clínicos (Azetaka y Konishi 1985).

En Corea se aislaron 4 cepas de VPIC-2 de hisopos nasales de perros con signos respiratorios clínicos, y en una investigación serológica de muestras de suero colectadas al azar, se encontraron positivos 329 de 515. Suponiendo una prevalencia elevada de VPIC-2 en el campo (Kim y col 1989).

En el otoño de 1988 en Escandinavia se detecto un brote de "Traqueobronquitis infecciosa canina" que parecía ser mas infecciosa de lo normal. Se colectaron muestras de suero de 52 perros con signos clínicos y los resultados revelaron un incremento de cuatro veces o mas en los titulos de anticuerpos contra el Virus de la Parainfluenza Canina en 79 % de los casos.

No se aisló *Bordetella bronchiseptica*, ni tampoco mostraron aumento en anticuerpos contra el virus de la Influenza, Reovirus o Adenovirus (Ueland K. 1987).

En la antigua Checoslovaquia se investigaron 398 muestras de sueros de perros de mas de 8 semanas de edad pertenecientes a 72 criaderos diferentes. Las muestras se inactivaron a 56 grados centígrados por 56 minutos para destruir el complemento y se examinaron por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación. Se usaron como antígenos: una cepa del virus de la Laringotraqueitis infecciosa procedente de Hungría y una cepa del VPIC-2 local, propagada en células MDCK. 51 % (204) de las muestras fueron positivas con títulos de 1:16 a 1:2048 contra la Laringotraqueitis, 29 % (115) fueron positivas contra VPIC-2 con títulos de 1:2 a 1:256. Se concluyo por extrapolación que de 21 a 37 % pueden tener anticuerpos contra VPIC-2 (Zuffa y Krobot).

INCIDENCIA DEL VIRUS PIC-2 EN ALGUNOS PAISES

PAIS	AÑO	SITIO DE OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	TIPO DE MUESTRA	EDAD DE LOS PERROS INVESTIGADOS	PRUEBA REALIZADA	RESULTADOS
Checoslovaquia Zuffa T. Krobot	1987	Ciudadinos	Suero	8 sem	Inhibición de la hemaglutinación	Pos 115 de 398 (28%)
Japón Azetaka y Konishi	1985	Perreras y craderos	Secreciones de garganta y pulmón	2.5 a 3 meses	IHA y SN	Pos 2 de 33 (6%)
Corea Kim D.H. y Col	1989	Muestras de campo	Suero	Variable	IHA	Pos 329 de 515 (63%)
Escandinavia Leland K.	1988	Albergues y perreras	Suero	Adultos	IHA	Pos 41 de 52 (78%)
Australia Gavin M.G.	1985	Albergues y Perreras	Secreción nasal	Variable	SN	Pos 63 de 192 (32%)

(Recopilado de Zuffa T. y Krobot F. 1985, Leland K. 1990, Kim D.H. y col. 1989, Azetaka y Konishi 1985, MacGavin M.G. 1985)

EL VIRUS PARAINFLUENZA CANINA TIPO 2

Pertenece a la familia Paramyxoviridae y al genero Paramixovirus. El virion mide de 100 a 300 nm. El genoma esta formado por una sola molécula lineal de sentido (-) de ARN de cadena sencilla. Los viriones son pleomórficos y filamentosos (Rhodes y Rooyen 1973).

Tiene envoltura lipidica doble con peplómeros glucoprotéicos que rodea la nucleocapside. Este virus aglutina eritrocitos del hombre del tipo O asi como de cobayo y pollo (Larski 1980).

El virus se propaga dentro de la cavidad amniótica de huevos embrionados de gallina de 9 a 12 días de edad, no observándose muertes embrionarias. Los líquidos amniótico y alantoideo ambos contienen virus. No replicándose si es inoculado dentro de la cavidad alantoidea (Timoney y col 1988, Larski Z 1980, Biberstein y Zee 1990)

También se propaga en cultivos celulares de riñones de perro, mono verde africano, mono rhesus, felinos y de embriones humano (Larski Z 1980, Timoney y col 1988).

Los cultivos celulares inoculados por VPIC-2 producen la formación de cuerpos de inclusiones y formaciones sincitiales intracitoplasmáticas. Siendo su replicación totalmente citoplasmática (Timoney y col 1988; Biberstein y Zee 1990).

Este virus es relativamente inestable a temperaturas de 37 grados centígrados, se inactiva a un pH de 3 y por disolvente de las grasas como el éter y el cloroforno (Rhodes y Rooyen 1973; Larski Z. 1980; Biberstein y Zee 1990).

Las pruebas de Seroneutralización cruzada realizada al VPIC-2 no han mostrado relación antigenica con los virus del Newcastle, Parafiditis y otros serotipos del Virus Parainfluenza pero si mostraron relación estrecha con el virus SV5 (Larski Z 1980)

EPIDEMIOLOGIA Y PATOLOGIA

El *Virus Parainfluenza Canina tipo 2* es frecuentemente aislado de epidemias de "tos de las perras" (Greene 1990). La infección es fácilmente transmitida de perros con el cuadro agudo a animales susceptibles. Esta enfermedad es importante en sitios donde los perros son introducidos dentro de un medio ambiente nuevo tal como laboratorios, centros de control canino, albergues y pensiones. En donde los animales son mantenidos en un ambiente de stress y ladridos excesivos.

Los animales susceptibles se infectan por contacto directo, de perros afectados los cuales eliminan el virus a través de pequeñas partículas de secreciones respiratorias en forma de aerosol al ladrar, toser o estornudar.

Los virus se replican en las células epiteliales del tracto respiratorio superior, causando necrosis celular y pérdida de la acción ciliar.

Las infecciones naturales son en general autolimitantes tendiendo a ser localizadas en el tracto respiratorio superior ya que el virus no ha podido ser hallado tanto en la sangre como en órganos internos (Biberstein y Zee 1990, Timoney y col 1988).

Sin embargo varios reportes describen el aislamiento de VPIC de tejidos de perro fuera del tracto respiratorio superior tal como el bazo, hígado, riñón, contenido intestinal y fluido cerebro espinal. La inoculación intracerebral de perros gnotobióticos con VPIC resulto en una encefalitis aguda con necrosis laminar cortical y aparición de antígenos virales en células ependimales y neuronas. Lesiones menos dramáticas han sido observadas en infecciones experimentales en animales de laboratorio (Baumgartner y col 1982, 86 y 89). El periodo de incubación es de 4 a 5 días, con una duración corta de 1 a 8 días (Thrusfield MV y col 1991) y

con signos clínicos ligeros, a menos que estén implicados otros microorganismos tal como; **Bordetella bronchiseptica** la cual es la bacteria más comúnmente aislada (McCandlish y col 1978; Bernis y col 1977; Fischler y Hill 1977; Tekdek y Ezeokoli 1982). Otras bacterias que pueden ser aisladas incluyen *Streptococcus* sp, *Actinomyces pyogenes*, *Bacillus* sp (Tekdek y Ezeokoli 1982), *Mycoplasmas* (Greig 1954), *Pasteurella* sp y *Coliformes* (Wilkins y Helland 1973; McCandlish y col 1978; Tekdek y Ezeokoli 1982). Sin embargo gran número de estos organismos pueden ser aislados de animales sanos. De este modo la interpretación del significado de aislamientos bacterianos puede ser difícil. No obstante la inducción experimental de "tos de las perreras" por *B. bronchiseptica* y su persistencia en animales, en contraste con el rápido espacio libre de otras bacterias, proporciona una mayor evidencia de su papel protagónico (Thrusfield MV 1992).

Entre los virus más comúnmente hallados se encuentran el Adenovirus canino tipo 1 (Wright y col 1972), Adenovirus canino tipo 2 (Bin y col 1972) y el virus del Distemper canino puede producir un cuadro clínico con signos respiratorios fuera de signos digestivos o nerviosos principalmente en perros jóvenes.

Las infecciones mixtas han sido el objeto central de controversia en torno al llamado "Kennel cough" sin embargo, las infecciones virales mixtas no son al parecer tan importantes.

La colonización asintomática con *B. bronchiseptica* puede agravar el cuadro producido por la infección de VPIC-2 (Wagener J y col 1984)

Los efectos del VPIC son directos sobre el epitelio bronquial en donde hay una reacción de hiperreactividad a la histamina (Lemen y col 1990), también causa disminución en la capacidad olfatoria de los animales afectados, la cual vuelve a la normalidad después de la desaparición de los signos clínicos (Myers y col 1988).

A la necropsia no hay lesiones excepto por unas pocas hemorragias petequiales en unos cuantos perros examinados 4 dias después de su inoculación (Timoney y col 1988).

Microscópicamente se presentan cambios inflamatorios caracterizados por infiltración de linfocitos, plasmocitos, neutrofilos e histiocitos en el tracto respiratorio alto y bajo y nódulos linfáticos regionales (Greene 1990).

Entre el primero y el octavo día posterior a la exposición del Virus Parainfluenza canina, este es aislado de muestras oronasales pero no de la sangre (Biberstein I.E y col.) Los mas altos títulos virales son hallados de muestras respiratorias colectadas entre el tercero al sexto día.

Los antigenos virales son demostrados en las células epiteliales de la mucosa nasal, traqueal, bronquial, bronquiolar y nódulos linfáticos peribronquiales 1 a 6 dias después de la exposición, con considerable reducción en la fluorescencia por sexto día. Por lo cual este virus no puede ser recuperado del tracto respiratorio mas alla del noveno día después de su exposición (Timoney JE y col. 1988).

SIGNOS CLINICOS

Las infecciones en el perro producidas solamente por el Virus Parainfluenza Canina tipo 2 son frecuentes y producen signos clinicos ligeros o bien permanecen de forma subclinica. El sintoma de presentación mas usual es la tos seca de leve a severa; otros sintomas observados con menor frecuencia pueden incluir secreción oculonasal, depresión y fiebre (Appel 1981). En general la auscultación del tórax revela ruidos pulmonares normales (Hoskins JD 1990). Sin embargo cuando la infección por el VPIC se complica con otros agentes bacterianos, viricos, higiene deficiente, stress, edad y condición física deficiente aparece la enfermedad mas grave caracterizándose por un inicio subitico de tos, la cual es frecuentemente paroxística, no productiva, rinitis que puede provocar secrecion nasal serosa o mucopurulenta y conjuntivitis (Fenner y col 1992)

Prescindiendo de las afecciones suaves de curación espontaneas los casos con sintomatología marcada se considera benigna si se adoptan oportunamente las adecuadas medidas terapéuticas y de higiene. Sin embargo, es corriente que se presenten formas de curso grave y terminación mortal, casi siempre a consecuencia de infecciones bacterianas secundarias (Beer J 1987).

La forma grave de la enfermedad es difícil de diferenciar del Moquillo canino. Los animales con esta forma de la enfermedad usualmente son menores de 6 meses. Los signos clinicos pueden incluir tos húmeda productiva, descarga nasal y/o ocular serosa a mucopurulenta, anorexia y fiebre. Alrededor del 10 al 20 % de los perros con esta forma de la enfermedad pueden morir (Barlough 1992).

INMUNIDAD

Perros infectados por el VPIC-2 por la ruta respiratoria son completamente inmunes al desafío por esta vía 3 semanas más tarde. Esto no significa que la enfermedad y el virus no sea aislado del tracto respiratorio. En contraste perros con virus dado parenteralmente desarrollan buenos títulos de anticuerpos pero no protegen completamente de un desafío por aerosol (Appel y Percy 1970). Anticuerpos neutralizantes pueden persistir por un mínimo de 3 a 4 meses (Appel y col 1970). La prueba de Suero Neutralización es ligeramente más sensible que la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación estándar (Buttle y Emery 1970; Timoney y col 1982).

DIAGNOSTICO

CLINICO

El diagnóstico clínico presuntivo de "traqueobronquitis infecciosa canina" puede hacerse sobre la base de evidencias circunstanciales, solamente en los casos de perros sanos con presentación repentina de tos seca y ronca dentro de un lapso de 5 a 10 días de haber sido expuestos a otros perros desconocidos, en un criadero o una exposición canina (Barlough JE 1992; Birchard SJ y Sherding RG 1994; Biberstein EL y Zee YC 1990; Greene CE 1990).

ASLAMIENTO.

Para un diagnóstico definitivo debe ser basado sobre procedimientos de laboratorio, como el aislamiento e identificación del VPIC-2. A partir de muestras de exudados respiratorios cultivadas tanto en cultivos celulares como embrión de pollo.

CULTIVO CELULAR.

Fundamento: Los virus se replican exclusivamente en el interior de las células vivas. Resultando esencial su cultivo in vitro para estudiar su mecanismo de replicación y su diagnóstico.

Aplicación: Muestras de campo del VPIC-2, crecen rápido y completamente en cultivos celulares alcanzando títulos de crecimiento de 10^6 , mediante la prueba de Hemoadsorción. Por consiguiente cultivos celulares es un excelente método de aislamiento e identificación de este virus (Barlough EJ 1992; Biberstein y Zee 1990; Larski Z. 1980; Timoney JE y col 1988). Existiendo diferentes tipos de cultivos celulares, que se pueden utilizar para el aislamiento de este virus:

Cultivo celular primario.

Es un cultivo de células derivadas de tejidos de órganos obtenidos generalmente a partir de fetos e inmediatamente usados para su estudio, por lo cual, poseen un número normal de cromosomas con una capacidad limitada de crecimiento in vitro a lo sumo de 5 a 10 divisiones (Fenner y col 1992, Mohanty y col 1988).

El VPIC-2 se propaga en este tipo de cultivos celulares, de riñones de perro, mono verde africano, mono rhesus, felino y de embrión humano (Timoney JE y col 1988).

La capacidad limitada de crecimiento in vitro limita su validez para el trabajo de diagnóstico de rutina, debido a su elevado costo y al inconveniente que representa tener que obtener cada vez tejidos frescos así como la homogeneidad de un lote a otro.

Por otra parte los animales donantes frecuentemente son portadores de virus latentes que pueden inducir confusiones en el diagnóstico

Cepas celulares diploides.

Este cultivo se considera una extensión del primero, siendo un cultivo mantenido a través de pasajes, en el caso de tejidos normales deben conservar el número diploide de cromosomas lo cual limita aproximadamente a unos cuantos pasajes puesto que de ahí en adelante empezaran a sufrir alteraciones morfológicas las células.

Línea celular continua.

Estas células han sido propagadas por más de 50 pasajes o son células que derivan de tejidos malignos o que durante su pasaje se vuelven malignos por desarrollar un número anormal de cromosomas. Ejemplos de estas son las células obtenidas a partir de monos (Línea celular VERO), perro (MDCK), ternero (MDBK), cerdo (PK15), gato (CFK), etc.

Ventajas: Propagarlas indefinidamente mediante subcultivos de las células a intervalos regulares, pueden almacenarse por mucho tiempo.

El reconocimiento del crecimiento de los virus sobre cultivos celulares es a través de la Hemoadsorción, Hemoaglutinación, Inmunofluorescencia, Interferencia, Efecto citopático (Fenner y col 1992)

EMBRION DE POLLO.

El embrión de pollo es una fuente de tejido vivo conveniente y fácilmente manipulable que se utiliza en la propagación, titulación e identificación de virus.

Aplicación: La propagación del VPIC-2 dentro de la cavidad amniótica de huevos embrionados de ave fue demostrada por Hemoaglutinación (Crandall y col 1968). No observándose muertes embrionarias (Timoney JE y col 1988).

Ventajas: Se pueden adquirir con facilidad, son baratos, tienen tamaño adecuado, están relativamente exentos de infecciones latentes y de contaminaciones externas y no forman anticuerpos contra los virus inyectados (con la excepción de algunos).

Factores que influyen sobre el crecimiento de virus en embriones de pollo son:

Edad del embrión, vía de inoculación, dilución, volumen del inoculo, tiempo de incubación tras la inoculación, estado fisiológico y de nutrición de las aves.

El crecimiento de un virus en el embrión puede comprobarse por varios métodos entre ellos los siguientes: Por medio de la reacción de Hemoaglutinación y mediante la Inhibición de la Hemoaglutinación (González AAJ 1988).

Entre las pruebas de laboratorio más comúnmente utilizadas para el diagnóstico del Virus Parainfluenza Canina tipo 2, se encuentran las siguientes:

PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN.

Fundamento: Con esta prueba se estima la capacidad que tiene el anticuerpo (Ac) para neutralizar la actividad biológica del antígeno cuando se mezcla con el *in vitro*.

Si bien las Pruebas de Neutralización en cultivos de tejidos son especialmente adecuadas para virus que producen Efecto Citopáticos que se identifican con facilidad o para Hemoadsorción ya que ambas reacciones pueden inhibirse por exposición previa del virus a los Ac. Pero también son adecuadas otras técnicas alternativas para evaluar la infección como son las pruebas de Inhibición metabólica y la Inhibición de la Formación de placas.

Estas pruebas son altamente específicas y muy sensibles (Olsen RG y Krakowka S 1983; Tizard I 1989). Siendo esta ligeramente más sensible que la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación estándar (Timoney JE y col. 1988).

ANTICUERPO FLUORESCENTE.

Fundamento: Esta prueba se basa en el principio de que el Ac unido a un colorante fluorescente (Isotiocianato de fluoresceína) puede ser observado microscópicamente al reaccionar con el antígeno (Ag). En la actualidad existen dos variantes de la prueba que son:

Prueba directa de Ac fluorescente.

Esta prueba se utiliza para identificar la presencia de virus que crecen en cultivos celulares o de tejidos tomados de animales afectados.

El método consiste en colocar Ac marcados con el FTTC sobre el preparado del Ag problema, se lava y examina.

Prueba indirecta de Ac fluorescente.

Con esta prueba se localizan Ac en el suero o se muestran e identifican Ag en tejidos o en cultivos de celulas. El método consiste en colocar antisuero problema sobre un preparado conocido de Ag. Se lava y después se cubre con antiglobulina marcada con FTTC se lava y se examina

Ventajas de la prueba de Ac fluorescente indirecta sobre la directa: Como cada molécula de Ac que se une también se unirá a varias moléculas de antiglobulina marcadas, la fluorescencia será considerablemente mas brillante que en la directa de modo similar, al usar sueros con antiglobulinas específicas para cada isotipo de inmunoglobulina (Olsen RG y Krakowka S 1983; Tizard I 1989).

HEMOAGLUTINACION.

Esta prueba se fundamenta en el fenómeno que demuestran varios virus de unirse simultáneamente a receptores específicos localizados en la superficie de los glóbulos rojos de las diferentes especies animales estableciendo puentes entre ellos y si la concentración vírica es lo bastante elevada, se forman puentes múltiples que dan lugar a cúmulos de gran tamaño.

Esta puede servir de prueba preliminar para la identificación de un virus, luego la inhibición de este fenómeno mediante un Ac, puede constituir un método para identificar un virus específico (Tizard I 1989).

La HA no es por tanto un indicador sensible de la presencia de un número pequeño de viriones, pero su sencillez hace de ella una prueba muy adecuada si se dispone de grandes cantidades de virus.

Factores que afectan la prueba de Hemoaglutinación

Virus: Cepa, titulación, número de pases, tipo de célula huésped, dosis utilizada para inocular el cultivo, temperatura de su incubación y si el virus fue inoculado en animales, la vía de inoculación.

Globulos rojos: Especie donadora, raza, edad, diferencias individuales de los donadores y otros factores como sexo o tiempo de almacenamiento de los GR

La prueba en si se afecta por:

Temperatura, concentración de iones de hidrogeno, presencia o ausencia de otros iones e inhibidores (Gonzál: / AAJ 1989)

INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION.

Fundamento: Se basa en la unión del Ac específico con la aglutinina del virión, la cual interfiere en la unión hemaglutinina viral y los receptores de la membrana de los GR.

Ventajas: Constituye un método de diagnóstico e investigación sencillos y útiles.

Problemas: Presencia en el suero problema de inhibidores de la HA que no sean Ac. Algunos de estos inhibidores son carbohidratos y cabe destruirlos tratando el suero problema con neurominidasa bacteriana. Otros inhibidores de este tipo son lipoproteínas, que pueden eliminarse por absorción del suero con caolin lavado, o destruirse mediante el empleo de tripsina. En general también es necesario adsorber el suero problema con eritrocitos, para suprimir hemaglutininas naturales.

Otros posibles fuentes de error son las diferentes sensibilidades de los GR de cada animal de la misma especie y de los mecanismos de reaccion, así como, la lectura de los resultados (Tizard E. 1989).

TRATAMIENTO

Dado que la "traqueobronquitis infecciosa canina" es autolimitada y en un periodo de 1 a 8 días, los perros con signos clínicos leves no requieren de un tratamiento específico.

El reposo y evitar las situaciones de stress o que precipiten accesos de tos, tal como paseos con correas, ejercicios, excitación, las corrientes de aire y las temperaturas extremas, pueden reducir la frecuencia de la tos durante el curso de la enfermedad (Barlough JE 1992).

La compleja etiología de la "tos de las perreras" propone un problema para la elección de la terapia más apropiada. Los agentes causales pueden ser identificados antes de comenzar el tratamiento, pero como tal determinación es rara en la práctica, consecuentemente un pragmático acercamiento en la terapia basado sobre pasadas experiencias es usualmente adoptado (Thrusfield M.V 1992).

El tratamiento con antibióticos específicos está indicado cuando el perro mantiene signos sistemáticos de la enfermedad, o cuando el curso de la enfermedad es prolongado o cuando se realiza el aislamiento de bacterias específicas.

Los estudios sobre *Bordetella bronchiseptica* de 27 perros con "traqueobronquitis infecciosa" han resultado susceptibles al cloranfenicol, gentamicina y a la tetraciclina.

Muchas resultaron resistentes a la cefaloridina, la nitrofurantoina, la estreptomisina y la trimetoprim-sulfadiazina y el 58% de los aislamientos fueron resistentes a la ampicilina (Bartough J.E. 1992).

Si la infección esta confinada a las vías aéreas superiores, lo cual ocurre en la mayoría de los casos de "traqueobronquitis infecciosa", las nebulizaciones con soluciones de antibióticos (gentamicina, kanamicina o polimixina B) a través de una mascarilla han probado ser beneficiosas en la reducción de los signos clínicos (Birchard S.J. y Sherding R.G. 1974; Turner T 1987).

Los corticosteroides pueden decrecer la severidad de los signos clínicos locales por su acción antiinflamatoria y puede ser demostrada su efectividad, al reducir la duración de la tos en casos naturales (Thrustfield y col 1991).

Los pacientes con evidencias radiológicas de neumonía bacteriana pueden requerir de un tratamiento intensivo.

El punto de apoyo del tratamiento de los animales con neumonía bacteriana son los antibióticos. Un tratamiento con antibióticos racional debe basarse sobre los resultados de los cultivos y antibiogramas de las muestras obtenidas por aspiración transtraqueal, lavado bronquial o aspiración pulmonar con aguja fina. Los antibióticos deben administrarse en forma continua durante un mínimo de 10 días posteriores a la resolución de los signos clínicos.

El mantenimiento de una hidratación adecuada es un componente esencial en el tratamiento de la neumonía. A medida que el contenido de agua en las secreciones traqueobronquiales disminuye, aumenta la viscosidad, dificultando la remoción por el sistema mucociliar y la expectoración. La hidratación debe mantenerse por vía oral o parenteral.

El tratamiento con aerosol puede utilizarse para eliminar las secreciones traqueobronquiales; estando los supresores de la tos contraindicados en los perros con neumonía (Barlough JE: 1992).

PREVENCIÓN

La disparidad en la eficacia de los antibióticos tanto *in vivo* como *in vitro*, y la diferencia en los efectos asociados con las diferentes rutas de administración y la habilidad de *Bordetella bronchiseptica* de transferir resistencia a múltiples drogas, ha justificado la vacunación como el más apropiado medio de controlar la "tos de las perreras", inducida por *Bordetella* (Goodnow 1980).

Algunas vacunas contienen un solo agente mientras que otras son polivalentes. Existiendo vacunas tanto de uso parenteral como para instilación nasal. La razón para el empleo de las vacunas intranasales es que dicha vacunación estimula la producción de anticuerpos locales IgA que cumplen un papel principal en la protección del tracto respiratorio superior contra los agentes patógenos.

La decisión del empleo de estas debe estar determinada por la posibilidad de exposición de cada animal en particular. Los componentes específicos de las vacunas y sus vías de aplicación han dado los siguientes resultados: Se a logrado mejor inmunidad contra *Bordetella bronchiseptica* a través de la vacunación intranasal. Una prueba realizada con una vacuna intranasal que contenía *Bordetella bronchiseptica* y VPI-C en un criadero de 5000 perros redujo la incidencia de la enfermedad en su forma clínica de 40 a 80 %. No se observaron efectos adversos, recomendándose la vacunación cada 10 a 12 meses.

La administración de una vacuna contra el VPIC por vía parenteral protegerá contra la enfermedad pero no contra la infección y por lo tanto no limita la propagación del virus entre los perros. La administración de una vacuna contra VPIC intranasal protege contra la infección y la enfermedad a la vez y es efectiva en la etapa de inmunidad pasiva materna. Se recomienda la revacunación anual con el producto intranasal (Barlough J.B. 1992).

El Virus Parainfluenza canina es frecuentemente combinado con los virus del Distemper canino y Adenovirus canino en rutinas vacunaciones y también puede ser administrado durante el brote.

La eficacia de B. bronchiseptica y del VPIC en combinación con vacunas VDC y AVC han sido demostrados en el campo de la UK (Thrusfield y col 1989)

En México se considera baja la incidencia de "traqueobronquitis infecciosa", a menos que las condiciones climatológicas raramente se presenta para brotes epidémicos. Por esta razón la inmunización generalmente es ignorada y no considerada en los programas rutinarios de vacunación. Sin embargo, en la práctica se ha observado que la afección es endémica y que las pérdidas en camadas valiosas llegan a ser significativas.

En México se encuentran disponibles gran variedad de vacunas contra el VPIC de diferentes laboratorios (Solvay animal health, Pitman moore y Smith kline beecham). Pero todas estas vacunas son polivalentes, las cuales no han dado muy buenos resultados ya que en estudios que se han hecho provocan inmunosupresión (Phillips TR y col 1988). No así las vacunas individuales las cuales confieren una buena protección.

OBJETIVOS

GENERAL: Identificación del Virus Parainfluenza Canina tipo 2, por medio de Hemoaglutinación viral e inoculación en embriones de pollo.

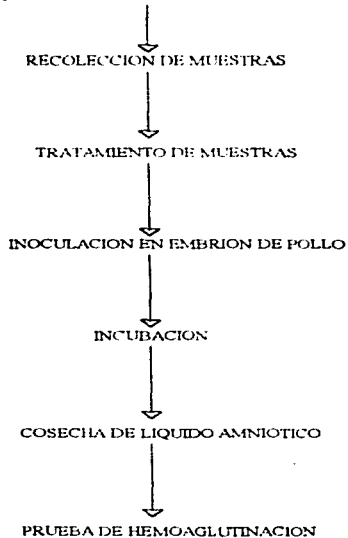
PARTICULAR:

1) Aislamiento del VPIC-2 a partir de muestras de secreción nasal de perros presumiblemente enfermos de "Traqueobronquitis infecciosa canina," por medio del cultivo en embrión de pollo.

2) Identificación del VPIC-2 por medio de Hemoaglutinación

DIAGRAMA DE FLUJO

PENSIONES, ALBERGUES Y CENTROS DE CONTROL CANINO



MATERIAL Y METODOS

MEDIOS DE TRANSPORTE

Previamente se prepararon las soluciones, de la siguiente manera:

SOLUCION DE HANKS' AL 10%

SOLUCION A.

Na Cl	8 gr
KCl	0.4 gr
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1 gr
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.1 gr
CaCl ₂	0.4 gr
Glucosa	1.0 gr
H ₂ O	80 ml

SOLUCION B

Na ₂ HPO ₄	0.06 gr
KH ₂ PO ₄	0.06 gr
H ₂ O	20 ml

100 ml

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se pesó cada una de las sales de acuerdo al orden de la lista.
- 2.- Se esterilizó en autoclave la solución A y B separadamente a 115 °C y 15 libras de presión durante 15 minutos.
- 3.- Al enfriarse se mezclaron las soluciones A y B.
- 4.- En matraz de 500 ml estéril y con tapón se depositaron los 100 ml.
- 5.- Se almaceno el medio en el refrigerador a una temperatura de 4 °C.

SOLUCION SALINA BALANCEADA DE HANKS:

Agua desmineralizada estéril	89 ml
Solución de Hanks al 10%	100 ml
Na HCO ₃ (7.5%)	7 ml
Rojo de tenol (0.5%)	4 ml
Penicilina 200 000 UI/ml	(1 ml)
Estreptomocina 500 000 µg/ml	(0.4 ml)

PROCEDIMIENTO:

- Se mezcló cada una de las soluciones de acuerdo al orden de la lista, para finalmente tener un pH de 7 a 7.2
- Se mezcló bien y se depositó en recipientes estériles y bien sellados de 1000 ml.
- Almacenando el medio en refrigeración a +4 °C.

SUSPENSION DE GLOBULOS ROJOS AL 2%

Los eritrocitos que se utilizaron en la prueba de Hemoaglutinacion, se obtuvieron de la vena radial de una gallina joven y sana, con jeringa de 3 ml y aguja de calibre 22, agregando 0.4 ml de nitrato de Na al 3.8% como anticoagulante, obteniéndose 3 ml de sangre en una forma aséptica, la cual se deposito en un tubo de ensaye. Esta sangre fue centrifugada a 2500 RPM durante 7 minutos. El sobrenadante se desecho, el paquete celular es diluido con SSF 1:20 y volviendo a centrifugar y retirar el sobrenadante repitiéndose este proceso unas tres o cinco veces hasta que el sobrenadante fue de color claro.

Del paquete celular se tomaron 0.2 ml de eritrocitos, llevándose a 100 ml de SSF para que la suspension quedara al 2%.

HUEVOS EMBRIONADOS DE GALLINA.

Huevos embrionados de aves de 9 a 11 dias de edad se obtuvieron en la granja avícola Veracruz UNAM.

Localizada en Km 21.5 antigua carretera México Tulyehualco (Hoy av. Tlahuac)

Calle Salvador Díaz Mirón s/n, Tlahuac DF.

Variedad: Babcock B 300

Postura: Primera.

Numero de aves reproductoras: 750

Promedio de fertilidad: 75%

Vacunación: Newcastle a los 2 meses de postura por aspersión.

Enfermedades mas comunes: Colibacilosis.

Antibióticos utilizados: Nitrofuranos.

Alimentación: A base de una dieta balanceada preparada en la misma granja.

CANINOS

Los perros que se utilizaron para obtener muestras de secreción nasal con signos sospechosos de "traqueobronquitis infecciosa canina" se obtuvieron de los siguientes lugares:

a) Asociación protectora de animales.

Lago Zaima número 78 colonia Tacuba, el cual tenía una población de 150 perros de diferentes edades, sexo y raza. Estos perros son animales que la gente ya no puede tener en su casa por mucho razones y entonces son llevados a este lugar.

Los animales son alojados en jaulas de 3 x 5 m, con techo de lamina de asbestos, en grupos de 10 individuos por jaula.

Los animales que presentaron signos clinicos compatibles con esta enfermedad fueron aquellos que eran nuevos en el albergue.

b) Asociación humanitaria Mexicana, refugio franciscano.

Localizado en el kilometro 17.5 carretera México Toluca, Cuajimalpa México DF.

Población canina de 1500 animales, los cuales son alojados en jaulas de 2 x 4 m, en grupos de 6 individuos, la gran mayoría se aloja en pasillos y en un patio central. Los animales nuevos se alojan en jaulas pequeñas antes de ser alojadas con todo el grupo.

Las hembras y los machos son esterilizados antes de entrar a las instalaciones.

La alimentación se prepara a base de arroz cocido y desperdicios de pollerías y restaurantes, dándoles una comida al día en comederos colectivos.

Los animales que se encontraron con signos clinicos de "traqueobronquitis infecciosa canina", son aquellos individuos nuevos que llegan aquí, que son sometidos a condiciones desfavorables y tienen que luchar por falta de espacio vital, alimentación y dominación jerárquica.

Otros animales que se encontraron son aquellos que con el tiempo, después de hambre, peleas y enfermedades, presentaron signos clínicos similares a esta enfermedad. Estos animales son aislados en la enfermería del albergue y es de aquí de donde se les tomo las muestras de secreción nasal.

c) Centro de control canino de San Francisco Culhuacan.

Localizado en la calle de la salud número 5 casi esquina tasqueña.

Con una población canina de 100 animales, los cuales son alojados en jaulas individuales. Estos perros provienen de redadas que se hacen periódicamente en la delegación y aquellos que son llevados por considerarse sospechosos de padecer rabia.

Al cabo de 15 días de observación estos animales si no son reclamados, son sacrificados con pistola de embolo oculto, de estos últimos animales es de donde se obtuvo las muestras de secreción nasal.

OBTENCION DE MUESTRAS SOSPECHOSAS.

Solamente en el refugio franciscano los perros enfermos son aislados en locales con jaulas individuales, mas confortables y separadas del resto de los animales, no aplicándose ningún tratamiento medico , en el otro refugio los animales enfermos conviven con los demás animales sanos. De los perros con sintomas clínicos de " traqueobronquitis infecciosa canina", con secreción nasal clara y fluida fue de donde con hisopos estériles, previa limpieza de los orificios nasales con gasa y solución salina fisiológica para evitar contaminaciones innecesarias.

Se obtuvieron las muestras de secreción nasal de la parte posterior de la cavidad nasal, para en seguida ser depositado el hisopo impregnado con moco en el tubo de ensaye el cual contenía 3 ml del medio de transporte (Solución salina balanceada de Hanks) siendo transportada en refrigeración de 2 a 4 grados centígrados (en caja de unicel con hielo) directamente al laboratorio de virología de la FESC-4 UNAM para su procesamiento.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras sospechosas obtenidas de casos clínico fueron llevados directamente al laboratorio de virología de la FES-C UNAM, en donde el hisopo con moco fue agitado y exprimido para liberar la mayor cantidad de líquidos sospechosos. Enseguida se centrifugaron a 2500 RPM durante 7 minutos y así obtener del sobrenadante un volumen de 1 ml de líquido libre de partículas y microorganismos mas pesados que los virus, este volumen fue depositado en viales de 3 ml estériles y sellados; todo este proceso se realizo en un medio estéril.

Después fueron almacenados a una temperatura de menos 4 grados centígrados para inocularlo en embrión de pollo

INOCULACION DE MUESTRAS SOSPECHOSAS EN EMBRION DE POLLO

Para la propagacion e identificación del virus Parainfluenza canina tipo 2, fueron utilizados huevos embrionados de pollo de 9 a 11 días de edad en los cuales se inocularon las muestras sospechosas para poder realizar la prueba de Hemoaglutinación.

Para llevar a cabo la inoculación de las muestras sospechosas en la cavidad amniótica del huevo embrionado se utilizo el ovoscopio para localizar y delimitar con lápiz el embrión y la cámara de aire.

Se desinfecto el área delimitada como la cámara de aire con la solución yodada al 2% para posteriormente perforar el cascaron a mitad de este con aguja del numero 20, se coloco el huevo en el ovoscopio, para introducir la aguja y dirigirla suavemente hacia el embrión, el movimiento subitito del embrión indico la penetración del saco amniótico, después se saco un poco la aguja y se inyecto 0.2 ml del inoculo

Finalmente se sello el orificio donde fueron inoculados los embriones con una gota de parafina liquida.

INCUBACION DE HUEVOS EMBRIONADOS INOCULADOS CON MUESTRAS SOSPECHOSA.

Los huevos embrionados inoculados se colocan en la incubadora con una atmósfera húmeda y una temperatura de 37 grados centígrados. Durante 72 horas, durante todo este tiempo fueron revisados diario en el ovoscopio para determinar su estado de salud, los embriones que estuvieron muertos se eliminaron. De 50 huevos embrionados que se inocularon e incubaron 8 murieron, sacándose de esta.

Tres dias después de estar incubando se sacaron, para ser llevados al refrigerador a una temperatura de 4 grados centígrados durante 24 hrs, antes de realizar su cosecha, esto con la finalidad de evitar hemorragias que pudiera sufrir el embrión de pollo al realizar la cosecha de liquido amniótico.

COSECHA DE LIQUIDO AMNIOTICO.

Esta se realizo en una área estéril, se coloco el huevo en una caja de petri estéril en posición vertical con un extremo hacia arriba, desinfectándose con solución yodada al 2% el cascaron que cubre la cámara de aire. Se quito el casquete que cubre la cámara de aire y las membranas del cascaron y corioalantoideo, que forman la base de la misma.

Se levanto ligeramente el saco amniótico con pinzas y se aspiró el líquido con una jeringa con aguja del número 20. Este líquido fue colocado en tubos de ensaye estériles. Para posteriormente ser centrifugados a 2500 RPM durante 7 minutos, para obtener del sobrenadante unos 2 ml los cuales fueron depositados en viales estériles. Siendo este líquido sospechoso el que se utilizo para realizar la prueba de Hemoaglutinación.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION.

La propagación del VPIC-2 en la cavidad amniótica de huevos embrionados de gallina es demostrada por la prueba de Hemoaglutinacion, aprovechando esta característica del virus de aglutinar eritrocitos. En una micro placa de 96 pozos con fondo en U se coloco solución salina fisiológica (SSF) en todos los pozos con una micropipeta estandarizada de 100 µl, después se agrego en el primer pozo 100 µl de liquido amniótico cosechado sospechoso al cual se le realizaron diluciones dobles hasta una dilucion 1:4096, finalmente con la micropipeta se agrego a cada pozo eritrocitos de ave al 2%. A los controles se les agrego 100 µl de glóbulos rojos de ave al 2% y al otro pozo control se le agrego liquido cosechado sospechoso y eritrocitos de ave al 2% agitando y dejando incubar a temperatura del laboratorio. La lectura se hizo a la media hora, y 2 horas después de realizada la prueba.

RESULTADOS

Del total de animales (n= 170) sospechosos que se estudiaron tanto machos (n=119), como hembras (n=51). 68 fueron jóvenes (de 2 meses a un año) y 102 adultos (mayores de un año), todos de raza criolla. Los resultados de la prueba de Hemoaglutinación que se les practico a cada una de las muestras sospechosas arrojó las siguientes conclusiones: Solo 14 (8.24%) positivas a esta prueba, 21 (12.35%) dudosos y 135 (79.41%) negativos ver gráfica No 1.

De las muestras que dieron positivo a la prueba de Hemoaglutinación 14 en total, 10 eran machos y 4 hembras, 6 jóvenes y 8 adultos, todos de raza criolla, ver grafica No 2.

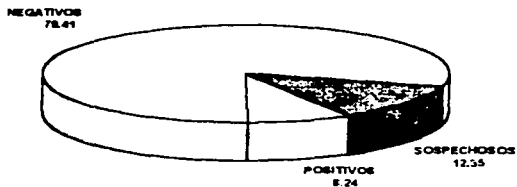
Así mismo los títulos de la prueba de Hemoaglutinación en los casos positivos fueron los siguientes:

1:2 (n=2), 1:4 (n=3), 1:8(n=2), 1:16 (n=1), 1:32 (n=1), 1:64 (n=3), 1:128 (n=1), 1:512 (n=1) ver gráfica No 3.

Las muestras control fueron 50, de diferentes animales aparentemente sanos, de los cuales 40 eran machos y 10 hembras, 15 jóvenes y 35 adultos, todos de raza criolla.

A cada una de las muestras control se les realizo la prueba de Hemoaglutinación, resultando en todos los casos negativo a dicha prueba.

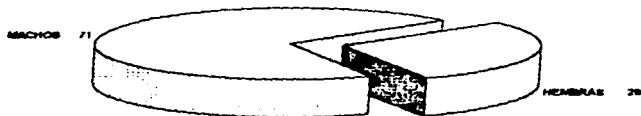
PORCENTAJE DE PERROS POSITIVOS A HEMAGLUTINACION



GRAFICA No. 1

**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION DE LAS
MUESTRAS SOSPECHOSAS EN PORCENTAJE.**

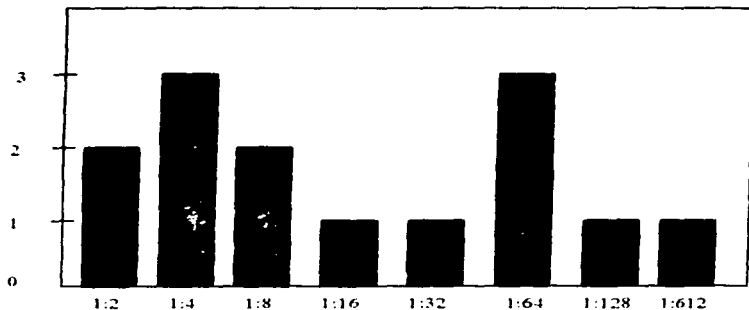
PORCENTAJE DE PERROS SEGUN SEXO



GRAFICA No. 2

**DE LOS PERROS QUE SALIERON POSITIVOS A LA PRUEBA DE
HEMOAGLUTINACION PORCENTAJE SEGUN EL SEXO.**

TITULO DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION.



GRAFICA No - 3

TITULOS DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION DE CADA MUESTRA
POSITIVA

DISCUSION

En el presente trabajo se analizaron 170 muestras, presumiblemente sospechosas del VPIC-2 las cuales solo 14 (8.24%) resultaron positivas a la pba de HA.

En estudios hechos por otros autores los resultados positivos han sido bastante elevados con promedios del 53 %, estudiadas con las mismas características que las que manejamos nosotros como fueron la edad, sexo y el sitio donde se obtuvieron las muestras, la única diferencia fue que nosotros obtuvimos las muestras de secreción nasal con hisopos y los demás autores fue con suero sanguíneo. En los cuales se detectaron anticuerpos y no antígenos, además estos perros no habían sido vacunados contra el Virus Parainfluenza canina, para que no interfiriera con la prueba.

Un estudio que se hizo en Japón, es el que tuvo mas semejanza con el presente estudio, ya que también en este estudio se hizo a partir de muestras de secreción nasal, encontrando resultados muy bajos (6%), aunque el número de muestras no fue muy alto (33) (Azetaka ; Konishi S 1989).

Hacer reproducir el virus a partir de secreciones nasales es muy difícil ya que los perros infectados por el VPIC, solamente eliminan este por un periodo de tiempo muy corto 9 días postinfección y los mas altos titulos virales solo son hallados del tercero al sexto día (Timoney JE y Col 1988). Por eso si las muestras son obtenidas después de estos días la cantidad de virus es casi nula y como los animales de donde se obtuvieron las muestras son de animales abandonados por sus dueños en estos sitios (Albergues y centros de control canino), en donde no es llevado un registro e historia clínica de los animales infectados para saber la etapa del curso de la enfermedad ya que si la muestra es tomada después de este tiempo ya no

se encontraran virus, y ademas que en la transportación de las muestras de secreción nasal al laboratorio los titulos virales declinan mucho (Thrusfield MV 1992), todos estos factores hacen que aislar el virus de muestras nasales sea muy difícil. En cambio en suero sanguíneo los anticuerpos neutralizantes pueden persistir por lo minimo de 3 a 4 meses (Appel y Col 1970). Si bien el aislamiento viral es difícil también es el mas exacto y definitivo, ya que aunque los Ac neutralizantes pueden persistir en la sangre por lo minimo de 3 a 4 meses, también es difícil saber si es de vacunaciones o infecciones previas, ya que para hacer el diagnostico de esta a partir del suero es con evaluacion de sueros pareados realizados con un intervalo de 2 a 3 semanas para checar el incremento de Ac y esto es de poco valor durante el brote de la enfermedad (Bartough EJ 1992; Thrusfield MV 1992; Timoney JF 1988) . Ademas que las pruebas serologicas pueden producir resultados erróneos por que la inmunoglobulina mas importante producida durante la infección del VPIC-2 es de tipo IgA secretoria, la cual no es fácil localizar en suero, ya que es un Ac local de vias respiratorias superiores, siendo poca la cantidad que puede pasar al suero sanguíneo (Greene CE 1990; Tizard I 1989).

La prueba de Hemoaglutinacion realizada para la identificación del Virus Parainfluenza canina tipo 2 es solo una prueba preliminar para la identificación de este virus, ya que no es concluyente, ya que existen otros virus como el del Adenovirus canino tipo 1y 2, que también presentan esta característica de aglutinar glóbulos rojos y pueden también estar presentes en el síndrome clinico de la "Traqueobronquitis infecciosa canina". Pero en base además al cuadro clinico de tipo benigno y a la localización de la enfermedad al tracto respiratorio superior, y a la historia clinica de los animales como es el hecho de haber sido expuestos a otros animales, el hacinamiento, stress, ladridos excesivos, destete de cachorros, la falta de la vacuna del VPIC, además que las infecciones virales mixtas no son tan importantes y a que el AVC-1 y

AVC-2 no se propagan en el embrión de pollo y a que el VDC no presenta la característica de hemoaglutinar eritrocitos de pollo. Se puede concluir que el virus Parainfluenza canina tipo 2 estuvo presente en las muestras sospechosas de perros con síntomas clínicos de la "traqueobronquitis infecciosa canina" que salieron positivas a la prueba de Hemoaglutinación. Aunque para afirmar dicha conclusión se tendría que realizar a cada muestra positiva y a todos los sueros sanguíneos de los perros que no se hizo, la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación la cual si sería concluyente.

CONCLUSIONES

1) De 170 muestras de perros con signos clínicos de "Traqueobronquitis infecciosa canina" que se estudiaron, solo 14 resultaron positivos a la prueba de Hemoaglutinación.

2) Esto sugiere que si se identifico un microorganismo que provoca HA como puede ser el VPIC-2.

3) No se pudo identificar concluyentemente al VPIC-2 del aislamiento en embrón de pollo ya que no fue posible contar con el VPIC-2 puro o suero neutralización tipificado.

REFERENCIAS

Aubert A, Gueguen S and Plancon D. Protection conferée par un vaccin canin multivalent canigen RC11A2 PP1. LR Vis du complexe infectieux "toux des chenils". Revue Med Vet 142: 131-138 (1991)

Azetsuka M and Konishi S. Kennel cough complex confirmation and analysis of the outbreak in Japan. Jpn J Vet Sci 50: 851- 858 (1988)

Barlough J.E. Manual de las enfermedades infecciosas en pequeños animales. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires Argentina (1992)

Baumgartner W And Krakowka S. Fixation procedures for retention of cellular morphologic features and for preservation of immunoreactivity of canine paramyxovirus antigens. Am J Vet Res 49:4: 477-481 (1988)

Baumgartner W, Krakowka S and Durchfeld B. In vitro cytopathogenicity and In vivo virulence of two strains of Canine Paramfluenza Virus. Vet Pathol 28: 324-331 (1991)

Beer J. Enfermedades infecciosas de los animales domesticos, Acribia, Zaragoza España (1991)

Birchard S J and Sherding R G. Saunders Manual of small animal practice. WB Saunders Company USA (1994)

Biberstein E.L. and Zee Y.C.: Review of Veterinary Microbiology, Blackwell Scientific publication inc, USA (1991)

Council Report, Canine and feline immunization guidelines, J Am Vet Med Ass 195: 314-317 (1989)

Fenner F, Bachmann P.A., Murphy F.A., Gibbs E.P.J., Studdert M.J. and White D.O., Veterinary Virology, Academic Press inc USA (1987)

González A.A.J. Manual ilustrado de practicas de virologia, Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM, Cuautitlan Izealli Estado de Mex. (1988)

Greene C.E., Infectious disease of the dog and cat, WB Saunders company, USA (1990)

Hoskins J.D. Pediatría veterinaria de perros y gatos, Interamericana Mc-Graw-Hill, primera edición México DF (1993)

Hoskins J.M. Virological procedures, Butterworth inc London England (1967)

Hsiung G.D. Diagnostic Virology, Yale University Press, (1963)

Kim D.H., Lyoo Y.S., An S.H., Kim H.S. and Cho S. Studies on Canine Parainfluenza Virus infection, Res Report-of-the-Rur-Develop-Adm-Vet 31:2-1-7 (1989)

Larski Z: *Larski Virología para veterinarios*; 2a edición, Ediciones Científicas la Prensa Médica Mexicana SA, México (1989)

McGavin D R, Mellows A J, Choice I: Evidence for Australia-Wide Canine Parainfluenza Infection, *Aust Vet J* 66:221 (1989)

Manual de virología, FAO, Argentina (1988)

Mohanty S B and Dutta S K: *Virología Veterinaria, Interamericana*, 1a edición Mexico DF (1988)

Myers L, Nusbaum K, Swango L, and Sartin E: Dysfunction of sense of smell caused by Canine Parainfluenza Virus infection in dog, *Am J Vet Res*, 49:2:188-190 (1988)

Olsen R G y Krakowka S: *Inmunología e inmunopatología de animales domésticos*. Editorial Manual moderno, Mexico DF (1983)

Phillips T R, Jensen J L, Kubino M J, Yang W C and Schultz R D: Effects of vaccines on the canine immune system, *Can J Vet Res* 53: 154-160 (1989)

Rhodes A J and Rooyen V: *Tratado de virología*, Toray SA, Barcelona España, 1a edición (1973)

Thrusfield M V, Aitken C G G and Muirhead R H: A field investigation of Kennel cough: Efficacy of vaccination, *J Small Anim Pract* 30: 550-560 (1989)

Thrusfield M V, Aitken C.G.G. and Muirhead R.H. A field investigation of kennel cough: Incubation period and clinical signs, *J Small Anim Pract*, 32: 215-220 (1991)

Thrusfield M V. The veterinary annual 32, 1a edición, Blackwell scientific publications. Oxford, England (1992)

Timoney J F, Gillespie J H, Scott F W and Barlough J E. *Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals*, 8 th edición Comstock Publishing Associates, USA (1988)

Tizard I R. *Inmunología veterinaria*, 3a edición, Interamericana Mc-Graw Hill, Mexico DF. (1989)

Turner T: Intratracheal treatment for kennel cough, *Vet Rec* 22: 182 (1987)

Ueland K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious Tracheobronchitis in Norway, *Vet Rec* 126: 481-483 (1990)

Wagener J, Sobonya R, Minnich L and Taussig L: Role of Canine Parainfluenza Virus and *Bordetella bronchiseptica* in Kennel cough, *Am J Vet Res* 45: 91862-1866 (1984)

Zuffa T and Krobot F. Demonstration of antibodies to infectious Laryngotracheitis virus and Parainfluenza 2 Virus in dogs in Czechoslovakia, *Vet Med* 32: 689-694 (1985)