



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
División de Estudios Profesionales

**IDENTIFICACIÓN DE VIRUS
RESPIRATORIOS EN PULMONES
NEUMÓNICOS DE PERROS
DOMÉSTICOS A TRÁVES DE
INMUNOHISTOQUÍMICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

MIRIAM DAMIÁN SANDOVAL

Asesores

**MVZ. Esp. Dra. Elizabeth Morales Salinas
MVZ. MSc. PhD. Francisco J. Trigo Tavera
MVZ. Gerardo Salas Garrido**

México D.F., 2004





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.

DEDICATORIAS

A mis padres, Rosa Ma. Sandoval Barragán y Sergio Damián García, por haberme brindado el privilegio de la vida y de su amor.

A ti Madre, eres una mujer valiente, tu fortaleza y sabiduría son ejemplo de vida, gracias por permitirme este logro, te amo.

A ti Padre, cómplice y amigo, porque tus bendiciones me acompañaran siempre y se que algún día volveremos a estar juntos, te extraño.

A ti Osvaldo, eres la alegría de mi vida, gracias por brindarme todo tu apoyo, te amo.

A mis hermanos: Sergio, Moisés, Francisco, Andrés y Lorena, por ser parte importante en mi vida, los quiero.

A mis sobrinos, con mucho cariño: Alan, Sergio, Rebeca, Moisés, Paquito, Monse y Diego.

A mi tía Irma, con cariño te recordare siempre; y mis primas Mimí y Lupe, las quiero.

A todos mis amigos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y del Departamento de Patología de la FMVZ, UNAM.

A mis perros y todos los animales por existir, gracias.

AGRADECIMIENTOS

Muy sinceramente a mis asesores Dra. Elizabeth Morales Salinas, Dr. Francisco J. Trigo Tavera y MVZ Gerardo Salas Garrido, así como a los sinodales, Dr. Fernando Constantino Casas, MVZ Fausto Reyes Flores, MVZ MC Beatriz Vanda Canton, MVZ Edgar Alfonseca Silva.

Dra. Liz con profundo cariño gracias por su confianza, paciencia y apoyo invaluable, ha sido una persona sumamente importante en mi desarrollo profesional. Gerardo, gracias por ser mi amigo, por tus consejos y por tu apoyo enorme en el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica. Al Departamento de Patología gracias, al Dr. Fernando Constantino Casas, jefe del Departamento, gracias por el apoyo brindado. A la Dra. Nuria de Buen de Argüero, gracias por su generosa ayuda y confianza. A Jaime Eugenio Córdova López, gracias por su colaboración en el material fotográfico y por tu amistad. A Emma Serrano Sánchez y Dr. Germán Valero Elizondo, gracias por su participación y apoyo en la impresión fotográfica. Al Sr. Aureliano García Torres, muchas gracias por su enseñanza y apoyo en necropsias. A los técnicos de histopatología Guadalupe Juárez Jiménez y Luis Antonio Morales Arreola, gracias por su ayuda en el laboratorio. A la Sra. Carmen Ramos, gracias por ser tan latosa. También deseo agradecer al MVZ Carlos Cedillo Peláez, por el testigo proporcionado de Adenovirus y al Dr. Brian Chelack, de Diagnostic Immunology de Prairie Diagnostic Services, Saskatoon, Canadá, por el testigo proporcionado de Parainfluenza. A mis amigos Xóchitl, Mario, Erika y Gisela, por las experiencias compartidas. A todos los ayudantes y miembros del Departamento de Patología.

A mí Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México, gracias.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
JUSTIFICACIÓN.....	7
OBJETIVOS.....	8
HIPÓTESIS.....	9
MATERIAL Y MÉTODOS.....	10
Criterios de inclusión.....	10
Examen Histopatológico.....	10
Estudio inmunohistoquímico.....	11
Técnica IHQ utilizada: Método CAB.....	12
Análisis de resultados.....	16
RESULTADOS.....	17
Histopatología.....	17
Inmunohistoquímica.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS.....	24
CUADROS.....	27
FIGURAS.....	36

LISTA DE CUADROS:

Página

27

Cuadro 1 Datos por caso y diagnóstico morfológico de pulmón por histopatología.

Cuadro 2 Órganos utilizados como testigos.

Cuadro 3 Número y porcentaje positivos por inmunohistoquímica (IHQ) para uno, dos y tres virus.

Cuadro 4 Número y porcentaje de inmunopositivos y negativos a virus de distemper canino (CDV), adenovirus canino (CAV) y virus de parainfluenza canina (CPiV), en pulmones neumónicos de perros domésticos.

Cuadro 5 Número y porcentaje de casos positivos para CDV, CAV y CPiV y asociaciones entre ellos.

Cuadro 6 Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 1, grado y localización del antígeno en perros de 2 semanas a 2 meses de edad.

Cuadro 7 Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 2, grado y localización del antígeno en perros de 3 meses a 1 año de edad.

Cuadro 8 Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 3, grado y localización del antígeno en perros de 1.5 a 12 años de edad.

Cuadro 9 Frecuencia de virus identificados por inmunohistoquímica (IHQ) de acuerdo a la edad.

LISTA DE FIGURAS

Página

36

Figura 1 Patogenia del distemper canino (CDV).

Figura 2 Patogenia de la parainfluenza canina (CPiV).

Figura 3 Patogenia de la adenovirus canina 2 (CAV).

Figura 4 Esquema del complejo avidina-biotina (CAB).

Figura 5 Tejido utilizado como testigo positivo a virus de distemper canino (CDV), con cuerpo de inclusión intranuclear en epitelio bronquial, H&E, 1000X.

Figura 6 Caso 23, hígado con cuerpos de inclusión intranucleares, testigo positivo de adenovirus canino (CAV), H&E, 1000 X.

Figura 7 Tejido de bovino positivo a virus de parainfluenza 3 (PI3), epitelio bronquial con cuerpo de inclusión intracitoplásmico eosinofílico, H&E, 1000X.

Figura 8 Inmunohistoquímica (IHQ) de pulmón de bovino, testigo positivo a virus de parainfluenza 3 (PI3), exhibe inmunopositividad en epitelio bronquial, DAB, 400X. Caso cortesía del Dr. Brian Chelack.

Figura 9 Tejido utilizado como testigo negativo, IHQ, 1000X.

Figura 10 Caso 7, bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa, con bronquiectasia, H&E, 100X

Figura 11 Caso 14, cuerpo de inclusión intranuclear eosinofílico en neumocito, H&E, 1000X.

Figura 12 Caso 7, cuerpo de inclusión intranuclear basofílico e intrahistiocítico, H&E, 1000X.

Figura 13 Caso 4, macrófagos alveolares exhiben en su citoplasma inmunopositividad marcada a virus de distemper canino (CDV), AEC, IHQ, 1000X.

Figura 14 Caso 20, bronquiolo presenta inmunopositividad por adenovirus canino (CAV), en el citoplasma de macrófagos, IHQ, AEC, 1000X.

- Figura 15** Caso 23, macrófago alveolar exhibe inmunopositividad intracitoplásmica e intranuclear de virus de parainfluenza canina (CPIV), IHQ, AEC, 1000X.
- Figura 16** Caso 3, bronquio muestra en su luz macrófagos espumosos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 400X.
- Figura 17** Caso 2, neumonía intersticial e hiperplasia de neumocitos tipo II con macrófagos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 100X.
- Figura 18** Caso 14, se aprecia inmunopositividad a virus de distemper canino (CDV) y edema IHQ, AEC, 100X.
- Figura 19** Caso 23, epitelio bronquiolar inmunopositivo a virus de parainfluenza canina (CPIV), IHQ, AEC, 1000X.
- Figura 20** Caso 25, macrófago perivascular exhibe inmunopositividad a adenovirus canino (CAV), IHQ, AEC, 1000X.
- Figura 21** Caso 17, sincicios y macrófagos espumosos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 1000X.
- Figura 22** Caso 17, sincicio y macrófagos exhiben inmunopositividad a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 1000X.

RESUMEN

Damián Sandoval Miriam. Identificación de virus respiratorios en pulmones neumónicos de perros domésticos a través de inmunohistoquímica. (Bajo la dirección de MVZ. Esp. Dra. Elizabeth Morales Salinas, MVZ. MSc. PhD. Francisco Trigo Tavera, MVZ. Gerardo Salas Garrido).

En este estudio, se estandarizaron técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) para la identificación de los virus de Distemper canino (CDV), Adenovirus canino (CAV) y Parainfluenza canina (CPiV). Se determinó la frecuencia de presentación, así como la asociación entre ellos, en 35 muestras de pulmones neumónicos de perros domésticos. En todos los casos, se identificó al menos un tipo de virus respiratorio. El CDV, fue el virus que se identificó con mayor frecuencia en el total de las muestras (77%). En 10 de los 35 casos (29 %) se identificaron a los tres tipos virus en forma conjunta. Se formaron tres grupos de animales de acuerdo a la edad, en donde se determinó que el CDV, fue el virus más frecuente en los tres grupos de animales. Los antígenos virales fueron identificados en macrófagos alveolares, monocitos, neumocitos, células epiteliales y sincicios. Las lesiones microscópicas encontradas fueron muy semejantes a las descritas en la literatura mundial, tales como neumonía intersticial, bronconeumonía y neumonía broncointersticial, mismas que fueron señaladas en los criterios de inclusión para éste estudio y que frecuentemente se asocian a agentes virales. Los resultados de este trabajo indican que además del CDV, el CAV y el CPiV también estuvieron involucrados en el desarrollo de neumonías. La IHQ permitió identificar antígenos virales en todas las muestras de pulmón analizadas, lo que sugiere que si se implementa como técnica de diagnóstico, resulta ser una herramienta de diagnóstico efectiva que puede ser utilizada para complementar con mayor precisión el examen histopatológico entre otros.

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones respiratorias en perros domésticos jóvenes son frecuentes, por lo que es importante su diagnóstico precoz. Algunos estudios indican que los virus comúnmente asociados con las enfermedades respiratorias caninas son el distemper canino (CDV), parainfluenza 2 (CPIV) y el adenovirus canino 2 (CAV2).¹ También el herpesvirus canino y los reovirus tipos 1, 2 y 3 se han aislado escasamente en perros con traqueobronquitis infecciosa canina (TBI).¹

Además de los agentes virales, hay una gran diversidad de agentes bacterianos y micóticos que pueden causar neumonías. Hay numerosos organismos bacterianos que se encuentran presentes en las vías de conducción del tracto respiratorio, pero son incapaces de causar infección, excepto los llamados "invasores bacterianos" o "bacterias oportunistas", como *Bordetella bronchiseptica* y otros microorganismos como los Micoplasmas, que comúnmente, están involucrados en la mayoría de las neumonías graves de los perros. En forma casi invariable estos agentes se asocian con la infección primaria por el virus de distemper y se encuentran, en general, en infecciones combinadas con *Escherichia coli*, *Pasteurella* sp. y otras bacterias.¹

Generalmente se hace un diagnóstico clínico de la enfermedad, pero no se identifican a los agentes involucrados en los problemas respiratorios. En los laboratorios de anatomopatología, se realizan diagnósticos sin identificar en la mayoría de los casos a los agentes etiológicos, con excepción del virus del distemper canino (CDV), en cuya infección, en algunos casos se pueden identificar inclusiones virales en células epiteliales de los bronquios, bronquiolos y epitelio transicional de la vejiga, entre otros.^{2,3,4,5}

Virus del distemper canino (CDV).

El virus del distemper canino (CDV), pertenece al género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae* y está estrechamente relacionado antigénicamente con virus de las enfermedades como sarampión, peste bovina, distemper porcino, distemper de los

delfines y morbilivirus de los équidos.^{1,2} Los huéspedes naturales del moquillo incluyen ciertas especies de carnívoros terrestres y algunas otras especies que se infectan en forma experimental.¹

El distemper canino es una enfermedad viral multisistémica grave, que se observa en todo el mundo, produce alta morbilidad y mortalidad en poblaciones de perros no vacunados y otros carnívoros.^{2,6} El virus del distemper canino mide 150-250 nm, tiene una cadena simple de ARN, simetría helicoidal y está envuelto por lipoproteínas que se derivan de glucoproteínas virales que se incorporan a la membrana celular.

El CDV abunda en los exudados respiratorios de animales enfermos y frecuentemente se disemina por aerosoles; sin embargo, puede aislarse de otros tejidos, tales como linfonodos retrofaríngeos y bronquiales, así como de la orina. El virus puede excretarse después de 60 a 90 días posinfección, aunque son más típicos los periodos más cortos de eliminación.¹

El virus ingresa por vía oro-nasal a través de aerosoles. A los 2 ó 4 días entra en contacto directo con el epitelio respiratorio de las vías de conducción o epitelio conjuntival. En 24 horas se replica en macrófagos tisulares y tejido linfoide (tonsilas y linfonodos bronquiales) y produce una primera viremia. Posteriormente a los 2-4 días aumenta el número de virus en tonsilas, linfonodos bronquiales y retrofaríngeos. A los 4 y 6 días hay una segunda replicación en otros órganos linfoides como bazo, timo y médula ósea, puede haber despoblación linfoide, fiebre, leucopenia por linfopenia, debido al daño que produce el virus en células T y B. Posteriormente el virus se disemina a los diferentes tejidos epiteliales y al sistema nervioso central (SNC) a través de los macrófagos.^{1,2,4,5}

Es rara la presentación sobreaguda, puede haber fiebre y muerte repentina. Es más común la enfermedad aguda, después de un periodo de incubación de 3-6 días. En perros afectados produce elevadas temperaturas difásicas arriba de 41°C.² La mortalidad puede variar de 0-100% dependiendo de la virulencia de la cepa del CDV, de la edad y

resistencia del huésped. Los signos clínicos son extremadamente variables, principalmente se caracterizan por: anorexia, depresión, conjuntivitis, rinitis y fiebre de 39.5 a 41 °C.^{6,7} Algunos perros muestran primero signos respiratorios y otros presentan signos digestivos y/o neurológicos.

La fase respiratoria se caracteriza por rinitis, laringitis y bronquitis serosa catarral, tonsilitis y tos. Posteriormente es común encontrar neumonía intersticial y bronconeumonía supurativa cuando se complica con agentes bacterianos. Al inicio de la enfermedad se pueden encontrar cuerpos de inclusión eosinófilos intracitoplasmáticos e intranucleares en los epitelios.^{2,3,4,5}

Otras lesiones asociadas al CDV son: hipoplasia del esmalte dental, hiperqueratosis de los cojinetes plantares y rodete nasal, dermatitis pustular y artritis reumatoide.^{1,6,8}

El CDV es responsable de la inmunodepresión, lo cual permite que se desarrolle la infección sistémica y puede asociarse con otros agentes virales y otros microorganismos, tales como la *Salmonella* sp., *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*.¹ También puede coexistir con otros virus, con *Bordetella bronchiseptica* y Micoplasmas, provocando la TBI o tos de las perreras.¹

Se cree que el estrés ambiental y los contaminantes juegan un papel importante en la gravedad de la enfermedad. Por ejemplo: al reducir la concentración del amonio, producido por la orina mediante un aumento en la ventilación, se ha demostrado menor incidencia de enfermedades respiratorias en criaderos, donde los perros son mantenidos en lugares cerrados, especialmente durante los meses fríos.⁹ La patogenia de CDV se resume en la figura 1.¹

Virus de parainfluenza canina (CPiV).

El virus de parainfluenza (CPiV) pertenece al género *Respirovirus* de la familia *Paramyxoviridae*, mide de 150-300 nm, está diseminado de manera extensiva en la población canina, pero se ha aislado con más frecuencia en TBI. Este virus es similar

antigénicamente, pero no idéntico al virus de parainfluenza simio (SV5), bovino, ovino, suino y felino.^{2,10,11} El virus se replica en células epiteliales de la mucosa de cavidad nasal, tráquea, bronquios, bronquiolos y linfonodos peribronquiales. El período de incubación es alrededor de una semana. Los signos clínicos se desarrollan a los 9 días posinoculación.¹ El CPiV es altamente contagioso y se disemina rápidamente, especialmente en perreras y albergues para animales.¹ Se han descrito muertes en perros infectados de manera simultánea con el CPiV y Micoplasmas.¹ Los cambios patológicos más notables causados por el CPiV son bronquitis y neumonía intersticial. La patogenia de la enfermedad respiratoria por el CPiV se resume en la figura 2.

Adenovirus canino (CAV)

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae* y género *Mastadenovirus*, son virus no envueltos, de forma hexagonal y simetría icosaédrica, miden 80-100 nm de diámetro.³ El CAV1 y el CAV2 son dos tipos distintos de adenovirus, el CAV1 se asocia a la hepatitis infecciosa canina, o enfermedad de Rubarth y el CAV2 a la TBI y neumonía, sin embargo, guardan estrecha relación antigénica.¹ Aunque el adenovirus canino 1 (CAV1) se ha aislado en brotes de enfermedades respiratorias, el adenovirus canino 2 (CAV2) se involucra más frecuentemente en éstas.⁹

El CAV2 afecta principalmente al tracto respiratorio y aunque puede replicarse en el tracto intestinal, no ha sido asociado con enfermedades entéricas.^{12,13} El CAV2 se replica primero en mucosa nasal, faringe, tonsilas y el epitelio ciliado del tracto respiratorio. En raras ocasiones se ha observado opacidad de la córnea después de la vacunación.¹

El virus puede persistir en la mucosa nasal y en pulmón por casi una semana después de la infección y puede ser recuperado en las heces. Se transmite principalmente a través de las secreciones del tracto respiratorio.¹ Se disemina en perros susceptibles en refugios para animales, en perros para investigación y en tiendas de mascotas. Es una

enfermedad de perros jóvenes, no vacunados, que rara vez se observa en animales mayores.

Los signos y lesiones son: fiebre, tonsilitis, neumonitis en casos sin complicación; cuando se complica con *Bordetella bronchiseptica*, los perros sufren una traqueobronquitis o bronconeumonía fatal.^{1,9}

La lesión pulmonar principal en la infección con CAV1 es una bronquitis y bronquiolitis necróticas y en hígado produce necrosis multifocal y cuerpos de inclusión intranucleares.¹

^{7,14-16} La patogenia de la adenovirus (CAV2), se resume en la figura 3.

Las tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) se basan en la detección de antígenos en células y tejidos, mediante anticuerpos específicos marcados con una enzima, que cuando se expone a un sustrato en presencia de un cromógeno el sitio de reacción antígeno-anticuerpo se puede visualizar a través del microscopio óptico.^{17,18}

La inmunohistoquímica ha sido de gran ayuda en la medicina e investigación y se ha empleado para diagnóstico e identificación de agentes infecciosos como virus, bacterias, parásitos y hongos.^{17,18}

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en los perros que mueren por procesos neumónicos asociados con agentes virales, no se puede determinar con exactitud por métodos histoquímicos, cuales son los virus involucrados en estas infecciones respiratorias, es necesario usar métodos de diagnóstico más sensibles y específicos como la inmunohistoquímica, para identificar a los agentes virales más frecuentemente involucrados en estas infecciones, tales como son el virus de distemper canino (CDV), el adenovirus canino (CAV) y el virus de parainfluenza canina (CPiV).

OBJETIVOS

◆OBJETIVO GENERAL:

Estandarizar técnicas de inmunohistoquímica para la identificación de agentes virales tales como CDV, CAV y CPiV en pulmones neumónicos de perros domésticos.

◆OBJETIVO PARTICULAR:

Determinar la frecuencia de los virus respiratorios CDV, CAV y CPiV involucrados en neumonías de perros domésticos, así como la asociación entre ellos.

HIPÓTESIS

- 1) Además del CDV, otros virus respiratorios como CAV, CPiV están presentes en perros domésticos con neumonía.

- 2) El CDV, es el virus más frecuentemente involucrado en procesos neumónicos agudos o subagudos en perros domésticos jóvenes.

- 3) La inmunohistoquímica es un método de diagnóstico efectivo para detectar a los virus causantes de neumonías de perros.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se realizó un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo, comparativo y transversal, en el cual se utilizaron muestras de pulmones neumónicos de 35 perros a los que se les realizó estudio anatomopatológico de diciembre de 1996 a junio del 2003.

Criterios de inclusión

Tomando en cuenta que las enfermedades respiratorias virales afectan principalmente a los animales jóvenes, se seleccionaron pulmones de perros preferentemente entre 2 meses y 5 años de edad, sin embargo, de acuerdo a la disponibilidad de casos se incluyeron pulmones de dos perros de 2 semanas, dos perros de 7 años de edad, el pulmón de un perro de 8 años de edad y el pulmón de un perro de 12 años de edad, sin tomar en cuenta la raza, ni el género, con diagnóstico *posmortem* de neumonía intersticial, bronconeumonía supurativa o neumonía broncointersticial, de curso agudo y subagudo (cuadro 1).

Examen Histopatológico

Se trabajó con muestras de pulmón incluidas previamente en parafina, que forman parte del acervo de diagnóstico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. A éstas muestras se les realizó un nuevo estudio histopatológico cortándose los tejidos a 3 μm de grosor y tiñéndose con hematoxilina y eosina, (H&E), para clasificar el tipo de neumonía de acuerdo a López MA.⁷, (cuadro 1). A partir de éstas muestras, se realizaron cortes seriados de 3 μm de grosor, las cuales se utilizaron posteriormente para el estudio de inmunohistoquímica.

Estudio inmunohistoquímico (IHQ)

Con el fin de identificar antígenos virales y poder diferenciarlos entre sí, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica Complejo Avidina-Biotina (CAB).¹⁷⁻¹⁹(figura 4).

Las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios, así como los tiempos de incubación, se determinaron mediante ensayos probando diferentes diluciones y tiempos, quedando estandarizados como se indica a continuación:

Anticuerpos primarios

Se usaron como anticuerpos primarios: **Anti-distemper canino*** monoclonal de origen murino. El marcador antigénico o epitopo es la glicoproteína F, que pertenece a la envoltura viral. La especificidad indicada por el fabricante, es que no reacciona con CAV 2 ni con CPiV, ni con el parvovirus canino (CPV) y ni tampoco con el coronavirus canino (CCV).

Anti-adenovirus canino** policlonal de origen canino. El fabricante no indica especificidad.

Anti-parainfluenza 1*** policlonal de origen caprino. La especificidad mencionada por el fabricante indica que reacciona antigénicamente con el virus de parainfluenza 2 (PI2) y parainfluenza 3 (PI3).

Tejidos utilizados como testigos

Para cada virus a evaluar se utilizaron como testigos los siguientes tejidos: el testigo positivo para el virus de distemper canino (CDV), fue una sección de pulmón, con la presencia de cuerpos de inclusión intranuclear en epitelio bronquial, detectados por histopatología y el encéfalo del mismo perro fue positivo por Inmunofluorescencia (IF), figura 5.

* No. Catálogo: 3800-0100, Labs. ANAWA S.A.

** No. Catálogo: 0152-1904, Labs. ANAWA S.A.

*** No. Catálogo: 7140-0406, Labs. ANAWA S.A.
Unterdorfstrasse 23, CH-8602, Wangen, Suiza.

El testigo positivo para adenovirus canino (CAV), consistió en una sección de hígado, con la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares en hepatocitos y positivo por inmunofluorescencia (figura 6).

El testigo positivo para el virus de parainfluenza (CPiV), fue una sección de pulmón bovino positivo para éste virus a través de inmunohistoquímica, considerando que es similar antigénicamente al PiV de los perros.^{2,11} (figuras 7 y 8).

Los testigos negativos para todos los procedimientos fueron secciones de los mismos testigos positivos, pero sin la aplicación de los anticuerpos primarios. (figura 9).

Los tejidos utilizados como testigos positivos y negativos para cada virus a identificar, se resumen en el cuadro 2.

Técnica de IHQ utilizada: Método complejo avidina-biotina (CAB).

Preparación de los tejidos:

De las muestras de pulmón incluidas en parafina, se realizaron 6 cortes seriados de 3µm de grosor, obteniéndose dos laminillas para cada virus a identificar, haciendo un total de 210. Los cortes histológicos se montaron en portaobjetos tratados previamente con la solución adhesiva Poli-L-Lysina* al 1%, para evitar el desprendimiento de las secciones durante el procedimiento.¹⁷

Las secciones se desparafinaron en una estufa a 60 °C, por 12 horas aproximadamente. Para completar este proceso, los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, realizando tres cambios de 20 minutos cada uno y después en acetona realizando dos cambios de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Para la rehidratación de los tejidos, los portaobjetos se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones, absoluto, 96%, 80% y 50%, realizando tres cambios de 3

*Sigma Chemical Company.
P.O. Box 14508. St. Louis Missouri 63178-0016

minutos cada uno, por cada concentración de alcohol y finalmente, se sumergieron en agua destilada realizando tres cambios de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Inhibición de la peroxidasa endógena

Para inhibir la actividad de peroxidasa endógena, las secciones de los órganos se trataron con peróxido de hidrógeno y metanol absoluto, en una relación 1:8, realizando dos cambios de 30 minutos cada uno. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguada de fosfatos (PBS)* con pH de 7.6, realizando tres cambios de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

Recuperación de antígenos

Para la recuperación de antígenos, los tejidos sumergidos en PBS se sometieron a tratamiento físico (calor) en un horno de microondas convencional marca Sanyo, modelo No. EMA-108s, a nivel medio (4), por 3 minutos. Inmediatamente, se cambió el PBS caliente, por PBS frío, para detener la reacción de recuperación.

Bloqueo de avidina y biotina endógenas

Para bloquear la avidina y biotina endógenas de los tejidos, se utilizaron 2 bloqueadores, el primero de tipo comercial*, con dos soluciones. La primera solución estuvo dirigida en contra de la avidina y consistió en aplicar dos gotas (50 µL/gota), incubando por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C) y después se realizó un lavado con PBS por 5 minutos. La segunda solución bloqueadora de la biotina, se aplicó siguiendo el mismo procedimiento que con la primera solución.

El segundo bloqueo estaba dirigido contra la estreptoavidina, se usó el reactivo comercial incluido en el equipo de inmunotinción.** Para ello se aplicaron dos gotas (50 µL/gota)

*Solución Amortiguada de fosfatos, Sigma.
P.O. Box 14508. St. Louis Missouri 63178-0016

*Endogenous Avidin/Biotin Blocking Kit
No. Catálogo: 00-4303, Zymed laboratorios, Inc.
561 Eccles Avenue, So. San Francisco, CA 94080

** Zymed Laboratories Inc. South San Francisco. California 94080. USA.

sobre cada laminilla, incubando por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25° C). En este caso la solución bloqueadora sólo se decantó.

Aplicación de anticuerpos primarios

Se procedió a la aplicación de los anticuerpos primarios, diluidos en PBS: anti-Distemper, anti-Adenovirus y anti-Parainfluenza 1.

Los tres anticuerpos primarios se aplicaron a las secciones de pulmón, en cada laminilla por separado, usando diferentes diluciones, quedando estandarizadas, de la siguiente forma:

- **Anti-distemper canino**, a una dilución de 1/350 µL.
- **Anti-adenovirus canino**, a una dilución de 1/800 µL.
- **Anti-parainfluenza 1**, a una dilución de 1/400 µL.

De cada anticuerpo primario, se aplicaron dos gotas (20 µL/gota) en cada laminilla, dejándolos incubar toda la noche (12 horas aprox.), en cámara húmeda a 4°C.

Para los testigos negativos de cada antígeno a identificar se substituyó el anticuerpo primario por PBS (20 µL/gota). Posterior a la incubación las muestras fueron sometidas a tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

Aplicación de anticuerpos secundarios

Posteriormente se aplicaron los anticuerpos secundarios marcados con biotina anti-anticuerpos primarios respectivamente:

Anti-ratón* dirigido en contra del anticuerpo primario de Distemper hecho en ratón, anti-perro** en contra del anticuerpo primario de Adenovirus de origen canino y anti-cabra*** en contra del anticuerpo primario de Parainfluenza 1 de origen caprino.

* Zymed Laboratories Inc., South San Francisco. California 94080. USA.

** Affinity Purified Antibody to Dog IgG (H+L)

No. Catálogo 16-19-06, KPL, Kirkegaard and Perry Laboratories
Cessna Court 2, Gaithersburg, MD 20879-4174 USA.

***Conjugate Biotin, Anti-Goat IgG (whole molecule)

No. Producto B 7014, Sigma Chemical Company
Spruce Street 3050, St. Louis, MO, USA., 63103.

Del anticuerpo anti-ratón del reactivo comercial*, se aplicaron dos gotas (20 µL/gota) a cada sección y se incubaron por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°).

El anticuerpo anti-perro se aplicó a una dilución 1/500 µL, diluido en PBS y el anticuerpo anti-cabra se aplicó a una dilución 1/1000 µL, diluido en PBS. De estos dos anticuerpos se aplicaron dos gotas (20 µL/gota) a cada sección por separado y se incubaron durante 1 hora con 30 minutos, en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25° C).

Para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Aplicación del CAB

Para magnificar la reacción inmunológica, se le aplicaron dos gotas (20 µL/gota) del conjugado de la enzima CAB* por cada sección y se incubaron por 45 minutos, en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C), (ffigura 4).

Aplicación del cromógeno

La preparación del cromógeno, así como los tiempos de incubación, se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante del reactivo comercial de tinción usado.¹⁷

Para revelar está reacción, se utilizó como cromógeno al 3-amino-9-etil carbazol (AEC)*, aplicando dos gotas (20 µL/gota), habiéndoles dado el siguiente tiempo de revelado para cada antígeno: 4 minutos para el CDV, 3.5 minutos para el CAV y 2 minutos para el CPiV, (figura 4).

Enseguida se realizó un lavado delicado con agua destilada sobre cada laminilla, para detener la reacción del revelado, e inmediatamente se sumergieron las laminillas nuevamente en agua destilada. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Meyer*, se aplicaron dos gotas (20 µL/gota) en cada muestra, la cual se lavó con agua

*Zymed Laboratories Inc., South San Francisco. California 94080. USA

destilada y posteriormente las laminillas se sumergieron en PBS, por 30 segundos, obteniéndose una contratinción azul tenue sobre el tejido y se regresaron al agua destilada.

Finalmente a las laminillas, se les aplicaron los cubreobjetos sellándolas con resina*.

Una reacción positiva se determinó al observar antígenos virales, en forma de gránulos intracelulares, teñidos de un color rojo característico.

Análisis de resultados

De acuerdo al análisis histopatológico, se determinó el tipo de neumonía (cuadro 3), tomándose en cuenta el grado de lesión, distribución y curso así como la frecuencia con la que se detectaron cuerpos de inclusión, basándose en la clasificación de neumonías de López MA.⁵

Para el análisis de los resultados de IHQ, se obtuvo el número y porcentaje de los casos positivos a los virus, así como el número y porcentaje de casos con infección mixta, de tal forma que se determinó su asociación y frecuencia.

Para determinar la frecuencia de presentación de los virus de acuerdo a la edad en los 35 animales, se formaron tres grupos: El grupo 1 fue constituido por muestras pulmonares de 17 animales entre una semana y dos meses de edad, el grupo 2 se formó por muestras de pulmonares de 10 animales mayores de 2 meses y hasta 1 año de edad y el grupo 3 fue integrado por muestras de pulmones de 8 animales mayores de un año. Además se identificaron las células que fueron positivas a los diferentes virus.

*Zymed Laboratories Inc., South San Francisco. California 94080. USA

RESULTADOS

Histopatología

Los resultados para el examen histopatológico se resumen en el cuadro 1, en donde se indica el diagnóstico morfológico por caso.

La bronconeumonía supurativa fue la lesión más frecuentemente en 15 casos (43%), seguida de la neumonía broncointersticial observada en 11 casos (31%) la neumonía intersticial en 7 casos (20%). Bronquitis catarral en un caso (3%) y neumonía neutrofílica en un caso (3%), cuadro 1. El grado de lesión más común fue grave en 14 casos (40%), seguido por moderado en 11 casos (31%) y ligero en 10 casos (29%).

Las lesiones microscópicas encontradas en el presente estudio fueron similares a las neumonías mencionadas en los criterios de inclusión y las cuales comúnmente se asocian a agentes virales, tales como neumonía intersticial, bronconeumonía y neumonía broncointersticial (figura 10).

En nueve de los 35 casos se encontraron cuerpos de inclusión, de los cuales 4 (44%) fueron de tipo intracitoplasmáticos, 2 (22%) de tipo intranuclear y en 3 (33%) de los casos se encontraron ambos tipos de inclusiones, (figuras 11 y 12).

Inmunohistoquímica

De acuerdo al estudio inmunohistoquímico realizado en pulmones neumónicos, todos los casos resultaron positivos al menos a un virus respiratorio.

Quince de los 35 casos resultaron positivos para un tipo de virus representando el 43%, 10 casos resultaron positivos para dos tipos de virus, los cuales representan al 29% y 10 casos resultaron positivos a los tres tipos de virus, representando el 29% (cuadro 3).

El número y porcentaje de casos inmunopositivos y negativos para cada virus, indican que el virus más frecuentemente identificado fue el CDV, en 27 casos (77%), seguido por el CAV en 20 casos (57%) y por el CPiV en 18 casos (51%), se resume en el cuadro 4.

El número y porcentaje de casos positivos para CDV, CAV y CPiV; así como las asociaciones entre ellos, se resumen en el cuadro 5 en donde se puede apreciar que el virus más frecuentemente identificado en forma individual, fue el CDV en 8 de 15 casos (53%), la asociación más frecuente entre dos tipos de virus fue el CDV con CPiV en 5 de 10 casos (50%) y en los 10 casos restantes se asociaron los tres virus.

La correlación entre la localización del antígeno viral en el pulmón y la edad de los animales por grupo, se resumen en los cuadros 6, 7 y 8. La mayoría de los antígenos se encontraron en el citoplasma de macrófagos alveolares e intersticiales; en neumocitos tipo II; en el citoplasma del epitelio bronquial, bronquiolar y monocitos, en un caso en el citoplasma de sincicios y en dos casos en epitelio bronquial y neumocitos con cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos, figuras 13 a 22.

Los resultados de frecuencia de presentación de virus identificados por IHQ en los tres grupos de acuerdo a la edad se resumen en el cuadro 9, en donde se puede apreciar que en el grupo 1 (animales de dos semanas a dos meses de edad), el virus más frecuente identificado fue el CDV en 13 de 17 casos (76%), en el grupo 2 (animales de tres meses a un año de edad), los virus más frecuentes identificados fueron el CDV y el CAV, en 7 animales, representando el 70% por cada virus respectivamente y en el grupo 3 (animales mayores de un año de edad), el virus más frecuente identificado fue el CDV en 7 de 8 casos (87%), cuadro 9.

DISCUSIÓN

Las lesiones microscópicas encontradas en pulmones de perros fueron muy semejantes a las descritas en la literatura mundial, que frecuentemente se asocian a neumonías producidas por agentes virales, tales como neumonía intersticial, bronconeumonía y neumonía broncointersticial.^{1,3-7}

Posiblemente, el hecho de que estas neumonías al clasificarlas por sus características histológicas, fueron consideradas de curso agudo o subagudo, permitió identificar con mayor facilidad a los virus respiratorios CDV, CAV y CPiV, los cuales por lo general no se encuentran en cantidades importantes o no se identifican en animales con neumonías crónicas.^{1,4}

El presente estudio confirma que en pulmones de perros con neumonías de curso agudo o subagudo, además del CDV, otros virus respiratorios se encuentran involucrados en perros domésticos, lo cual coincide con lo señalado con otros autores.^{10,14,15,20} Al respecto, diversos investigadores han propuesto que el desarrollo de neumonía en animales, se debe a la interacción de varios agentes, de los cuales los virus juegan un papel importante al provocar exfoliación de la mucosa respiratoria y algunos al inducir inmunodepresión, como es el caso del CVD, el cual produce linfonecrosis y apoptosis de tejido linfoide.^{1-7,21}

Por otro lado, en 9 de los 35 casos (26%), se apreciaron cuerpos de inclusión característicos de CDV por medio de histopatología, sin embargo, a través de IHQ, se identificaron 27 casos positivos (77%) para este virus, lo que indica que éste método de diagnóstico fue más sensible pudiendo detectar un 51% más de casos positivos con respecto a la histopatología.

Considerando que la bronconeumonía supurativa fue la lesión más frecuente en 15 perros (43%), y el grado de lesión más común fue el grave, se sugiere que en estos perros existió co-infección con agentes bacterianos, desarrollándose neumonías graves.

Por otro lado, en este estudio, la IHQ permitió identificar antígenos virales en todas las muestras de pulmón analizadas, por lo que esta técnica resulta ser una herramienta de diagnóstico efectiva que puede ser utilizada para complementar el examen histopatológico. Semejante a lo referido en la literatura mundial, el CDV fue el virus que se identificó con mayor frecuencia por IHQ en todos los perros, lo que indica que sigue siendo uno de los patógenos de mayor importancia al involucrarse en muchos casos de neumonías en poblaciones de perros jóvenes. (Greene)^{1-3,14,15,20-25}

Desafortunadamente, con base en las historias clínicas, no se contó con suficiente información acerca de la vacunación de estos perros, por lo que no se pudo hacer una correlación entre perros infectados por CDV, vacunados y no vacunados.

Es importante destacar que la asociación de CDV con CPiV fue la más frecuente cuando se asociaron 2 tipos de virus, lo que indica que el CPiV aunque fue el virus que se identificó con menor frecuencia en el total de los casos (51%), se detectó en el 59% en los perros de entre una semana y dos meses de edad (Grupo 1). Estos datos son similares a los referidos en otros estudios, que indican que el CPiV por lo general provoca una neumonía transitoria, de moderada a grave, afectando a perros muy jóvenes.^{26,27} También se destaca que no existen suficientes referencias en la literatura mundial que indiquen frecuencias de afección por este virus, sin embargo, en el presente estudio, se consideró como una frecuencia alta el haber encontrado antígenos virales de CPiV en 18 casos (51%), tomando en cuenta que éste virus afecta preferentemente vías respiratorias altas, según lo referido por otros investigadores.^{1,3-6,10,11}

El CAV se consideró como un agente importante causante de neumonía ya que fue el segundo virus que se detectó con mayor frecuencia tanto en el total de las muestras analizadas (57%), tanto solo como asociado con el CDV (40%). Ambos se identificaron con mayor frecuencia (70%), en perros de 2 meses hasta de un año de edad (Grupo 2), lo cual es semejante también a lo referido en diversos estudios.^{14,15,26,27} Además, al igual que

en el caso de CPiV, tampoco se citan suficientes informes de la frecuencia de presentación de este virus en poblaciones caninas en la literatura mundial.^{9,12-15,28}

Es importante señalar que 10 de los 35 casos (29%) fueron considerados como verdaderos complejos respiratorios, ya que se encontró antígeno para los 3 virus respiratorios, además de que probablemente se presentaron infecciones bacterianas secundarias. Los complejos respiratorios se han descrito ampliamente en diversas especies animales, la etiología es multifactorial: estrés, condiciones ambientales adversas, interacción de varios agentes infecciosos, etc.¹⁻⁷

La localización de los antígenos virales en el caso del CDV, se puede relacionar con la patogenia del virus dentro del aparato respiratorio, ya que según la patogenia de la enfermedad, cuando el CDV alcanza al pulmón, primero se replica en macrófagos alveolares y después en neumocitos tipo II, epitelio bronquial y bronquiolar.^{1-7,25} En el caso del CAV, el haber encontrado cantidad moderada y abundante de antígeno viral principalmente en macrófagos en la mayoría de los casos, sugiere que éste virus al inicio de la infección es fagocitado en el pulmón y al continuar la infección, es capaz de replicarse en epitelio bronquial provocando bronquitis necrótica, como previamente se ha descrito.^{1-7,16} Solo en 2 de los 20 casos positivos para éste virus (10%), se detectaron antígenos de CAV en epitelio bronquial y bronquiolar. Con respecto al CPiV, la localización de antígenos virales principalmente en macrófagos y epitelio bronquial coincide con la patogenia de la enfermedad previamente descrita.¹⁻⁷

Es importante señalar que 7 de 9 casos (78%) en los que se detectaron cuerpos de inclusión por histopatología, no fueron inmunopositivos. Probablemente se deba a que los cuerpos de inclusión corresponden a proteínas de ensamblaje y no a viriones, provocando que los anticuerpos primarios específicos para la identificación de cada virus, no sean capaces de reconocerlos adecuadamente.³ Esto concuerda con estudios realizados por Miry C, Ducatelle R, Thoonen H., Hoorens J.²⁰, donde informan que ninguno de los

cuerpos de inclusión detectados en los casos estudiados fueron inmunopositivos. Sin embargo, Berrocal, A. y López MA.²² han demostrado que los cuerpos de inclusión también pueden ser inmunopositivos, por lo que la positividad por IHQ en estos casos es variable.

Los resultados del presente trabajo se consideran satisfactorios, debido a que después de realizar varios ensayos se estandarizaron nuevas técnicas de inmunohistoquímica que permitieron identificar al CDV, CAV y CPiV en forma conjunta, lo cual no se ha informado en otras investigaciones. Aunque existen otros estudios que refieren la utilización de la IHQ para la detección de éstos agentes, han sido de forma individual o en grupos de perros detectando uno o dos antígenos.^{14,20-25,28} Existen otros trabajos en los cuales se informa de la aplicación de la IHQ para la detección del CDV, sin embargo, indican la detección de antígenos virales principalmente en otros tejidos que comúnmente son afectados por este virus como el SNC y linfonodos.^{29,30}

Se debe tomar en cuenta que el éxito de la IHQ dependerá de varios factores tales como: la cantidad de antígenos presentes y grado de autólisis en el tejido, tiempos de incubación durante el desarrollo de la técnica y temperatura ambiental entre otros.¹⁷⁻¹⁹ Algunas limitantes que presenta el estudio inmunohistoquímico pueden ser los fijadores, ya que si la muestra pasa mucho tiempo en formalina, se pueden desnaturalizar proteínas o enmascarar antígenos y provocar que la respuesta sea débil o escasa en el tejido.¹⁸ Además, la concentración alta o baja de los anticuerpos utilizados, pueden dar resultados falsos negativos o falsos positivos. Asimismo si el anticuerpo se descongela más de una vez también alterará los resultados.¹⁹

CONCLUSIONES

En el presente estudio, se estandarizaron técnicas de IHQ que permitieron identificar antígenos virales de CDV, CAV y CPiV en forma conjunta en pulmones neumónicos de perros domésticos.

En todos los casos, se identificó al menos un tipo de virus respiratorio lo que indica que estos agentes, juegan un papel importante en el desarrollo de neumonías.

Además del CDV, otros virus respiratorios fueron detectados en las muestras de pulmones neumónicos de perros domésticos, lo que indica que la infección de un virus, no excluye la presencia de otros virus.

Tal como se esperaba, el CDV, fue el virus que se identificó con mayor frecuencia en el total de las muestras (77%).

La asociación más frecuente entre dos tipos de virus fue el CDV con CPiV en 5 de 10 casos (50%).

En 10 de los 35 casos (29%) fueron considerados como verdaderos complejos respiratorios, debido a que se encontró antígeno para los 3 tipos de virus respiratorios.

El CAV y CDV fueron los virus que se detectaron con la misma frecuencia en el grupo 2 (7 casos/70%).

La IHQ permitió detectar un 51% más de casos positivos para CDV con respecto a la histopatología.

Finalmente, los antígenos virales fueron identificados en las células, que según indica la literatura son las más afectadas por estos virus tales como macrófagos, células epiteliales, neumocitos, monocitos y sincicios.

REFERENCIAS

- 1.- Greene CE, Appel MJ, Ford RB, Vaden SL. in .Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1998.
- 2.- Sherding RG. in Birchard SJ, Sherding RG. Manual clínico de pequeñas especies. 1^a ed. Vol. 1. México (DF): Interamericana-Mc Graw-Hill, 1996.
- 3.- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC. Veterinary virology. 3rd ed. Sn Diego California: Academic Press, 1999.
- 4.- Hoskins DJ. in Ettinger EJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine disease of the dog and cat. 4th ed. Vol. 1 Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1995.
- 5.- Dungworth DL. in Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. Pathology of domestic animals. 4th ed. Vol. 2. Sn Diego California: Academic Press, 1993.
- 6.- Jones CT, Hunt DR, King WN. Veterinary Pathology. 6th ed. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, 1997.
- 7.- López MA. in Mc Gavin DM, Carlton WW, Zachary JF. Thompson`s, Special Veterinary Pathology. 3rd ed. Mosby, Inc. St. Louis Missouri, 2001.
- 8.- Bell SC, Carter SD, Bennett D. Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. Res Vet Sci 1991; 50:64-68.
- 9.- Apple M, Binn LN. Canine adenovirus type 2 (infectious laryngotracheitis virus) 45-51, In, Apple M.(ed), Virus infectious of carnivores Elsevier, Amsterdam. 1987.
- 10.- Ajiki M, Takamura K, Hiramatsu K. Isolation and characterization of parainfluenza 5 virus from dog. Jap J Vet Sci 1982; 44:607-618.
- 11.- Randall RE, Young DF, Goswami KA, Russell WC. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to simian virus 5 and their use in revealing antigenic differences between human, canine and simian isolates. J Gen Virol 1987; 68: 2769-2780.
- 12.- Hamelin C, Jouvenne P, Assaf R. Genotypic characterization on type -2 variants of canine adenovirus. Am J Vet Res 1986; 47: 625-630.

- 13.-Mc Cartney L, Cavanaugh HM, Spibey N. Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of the dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Res Vet Sci* 1998; 44: 9-14.
- 14.- Kobayashi Y, Ochiai K, Itakura Ch. Dual Infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in dog. *J Vet Med Sci* 1993; 55:699-701.
- 15.- Ducatelle R, Maenhout D, Coussement W, Hoorens J. Dual adenovirus and distemper virus pneumonia in dog. *Vet Q* 1982; 4:84 – 88.
- 16.- Rakich PM, Prasse KW, Lukert PD, Cornelius LM. Immunohistochemical detection of canine adenovirus in paraffin sections of liver. *Vet Pathol* 1986; 23:478-484.
- 17.- Haines DM, Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3:101-102.
- 18.- Vanda CB, Valero EG. Inmunohistoquímica diagnóstica. Memorias del Curso sobre Inmunohistoquímica. 1997 junio 25, México (DF): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, 1997:s/p.
- 19.- Nadji M, Morales AR. Inmunoperoxidase techniques: a practical approach to tumor diagnosis. Chicago (Ill), American Society of Clinical Pathologists, 1994.
- 20.- Miry C, Ducatelle R, Thoonen H, Hoorens J. Immunoperoxidase study of canine distemper virus pneumonia. *Res Vet Sci* 1983; 34: 145-148.
- 21.- Haines DM, Martin KM, Chelack BJ, Sargent RA, Outerbridge CA, Clark EG. Immunohistochemical detection of canine distemper virus in haired skin, nasal mucosa, and footpad epithelium: a method for antemortem diagnosis of infection. *J Vet Diagn Invest* 1999; 11: 396-399.
- 22.- Berrocal A, López A. Pulmonary sarcocystosis in a puppy with canine distemper in Costa Rica. *J Vet Diagn Invest* 2003; 15:292-294.

- 23.- Ducatelle R, Coussement W, Hoorens J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody-enzyme method. *Am J Vet Res*, 1980; 41: 1860-1862.
- 24.- Gathumbi PK. The retrospective use of a peroxidase technique for confirmation of suspected canine distemper in Kenya. *Vet Res Commun* 1993; 17:197-201
- 25.- Okita M, Yanai T, Ochikubo F, Gemma T, Mori T, Maseki T, Yamanouchi T, Mikami T, Kai C. Histopathological features of canine distemper recently observed in Japan. *J Comp Path* 1997; 116:403-408.
- 26.- Moloney MB, Pye D, Smith HV, Scott PC. Isolation of parainfluenza virus from dog. *Austr Vet J* 1985; 62:285-286.
- 27.- Love DN. Review of canine viral disease. *Austr Vet J* 1972; 48:567-570.
- 28.- Adamus C, Buggin-Daubié M, Izembart A, Sonrier-Pierre C, Guigand L, Masson M-T, André-Fontaine G, Wyers M. Chronic hepatitis associated with leptospiral infection in vaccinated beagles. *J Comp Path* 1995; 113:185-190.
- 29.- Palmer DG, Huxtable CRR, Thomas JB. Immunohistochemical demonstration of canine distemper virus antigen as an aid in the diagnosis of canine of canine distemper encephalomyelitis. *Res Vet Sci* 1990, 49:177-181.
- 30.- Iwatsuki K, Okita M, Ochikubo F, Gemma T, Shin Y-S, Miyashita N, Mikami T, Kai C. Immunohistochemical analysis of lymphoid organs of dogs naturally infected with canine distemper virus. *J Comp Path* 1995; 113:185-190.
- 31.- Naish JS, Boenish T, Farmilo JA, Stead HR. Immunochemical staining methods. 1989, DAKO Corporation, Carpinteria California.

Cuadro 1. Datos por caso y diagnóstico morfológico de pulmón por histopatología.

Caso	Raza	Género	Edad	Diagnóstico morfológico
1	Rottweiler	Macho	2 semanas	Neumonía intersticial moderada difusa, con hiperplasia moderada de neumocitos tipo II
2	Mastín napolitano	-	2 semanas	Neumonía broncointersticial neutrofílica moderada multifocal coalescente subaguda con CIIC y edema ligero
3	Mestizo	Macho	3 semanas	Bronconeumonía supurativa e histiocítica ligera difusa
4	Pastor alemán	Hembra	1 mes	Neumonía broncointersticial linfohistiocítica moderada difusa con edema ligero e hiperplasia de neumocitos II discreta
5	Pastor alemán	Macho	1 mes	Neumonía broncointersticial linfohistiocítica ligera difusa
6	Samoyedo	Macho	1.5 meses	Bronconeumonía fibrinopurulenta grave difusa subaguda
7	Cobrador dorado	Hembra	1.5 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave multifocal coalescente con CIIN
8	Rottweiler	Macho	7 semanas	Neumonía intersticial ligera difusa aguda con hiperplasia de neumocitos II
9	Shitzu	Macho	2 meses	Neumonía intersticial ligera difusa aguda con hiperplasia de neumocitos II ligera
10	Schnauzer miniatura	Hembra	2 meses	Neumonía broncointersticial supurativa e histiocítica ligera difusa aguda con CIIC
11	Pastor belga	-	2 meses	Neumonía intersticial ligera difusa aguda con hiperplasia de neumocitos II ligera
12	Chow-chow	Hembra	2 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa con CIIC y CIIN
13	Mestizo	Hembra	2 meses	Bronconeumonía supurativa grave multifocal coalescente subaguda con sincitios
14	Cobrador de labrador	Macho	2 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa con CIIC y CIIN
15	Bulldog inglés	Macho	2 meses	Neumonía broncointersticial histiocítica moderada difusa con congestión moderada y CIIC
16	Schnauzer	Macho	2 meses	Neumonía intersticial moderada difusa aguda, con hiperplasia moderada de neumocitos tipo II
17	Mastín napolitano	Hembra	2 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa con abundantes sincitios
18	Yorkshire	Hembra	3 meses	Neumonía intersticial ligera difusa aguda con hiperplasia ligera de neumocitos II
19	Bull terrier inglés	Macho	3 meses	Bronconeumonía fibrinosupurativa grave difusa
20	Poodle	Hembra	3 meses	Bronconeumonía supurativa grave zonalmente extensiva aguda con CIIN
21	Pug	Macho	3 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa
22	Beagle	Macho	3 meses	Neumonía broncointersticial histiocítica moderada difusa, con congestión y edema difusos, con CIIC
23	Pastor belga malinés	Macho	3 meses	Bronconeumonía supurativa e histiocítica moderada difusa con vasculitis discreta y edema perivascular
24	Rottweiler	Macho	4 meses	Bronconeumonía supurativa grave difusa subaguda
25	Chow-chow	Macho	4 meses	Neumonía broncointersticial histiocítica moderada difusa con vasculitis y perivasculitis
26	Mestizo	Hembra	7 meses	Bronconeumonía supurativa grave difusa subaguda con descamación del epitelio
27	Pastor alemán	Macho	1 año	Neumonía broncointersticial linfohistiocítica moderada difusa aguda y congestión
28	Cobrador dorado	Macho	1.5 años	Bronconeumonía supurativa grave difusa
29	Scotch terrier	Macho	2.5 años	Neumonía broncointersticial histiocítica ligera difusa con congestión y edema ligero
30	Chihuahueño	Macho	3 años	Neumonía neutrofílica grave difusa y edema moderado difuso
31	Cobrador dorado	Hembra	3.5 años	Bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa con CIIC y CIIN
32	Mestizo	Macho	7 años	Bronquitis catarral ligera difusa con congestión y edema severo difuso
33	Mestizo	Hembra	7 años	Neumonía broncointersticial linfohistiocítica moderada difusa
34	Pastor alemán	Macho	8 años	Neumonía intersticial ligera difusa con hiperplasia de neumocitos II discreta
35	Poodle	Macho	12 años	Neumonía broncointersticial histiocítica moderada multifocal coalescente

CIIC= Cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos

CIIN= Cuerpos de inclusión intranucleares

Cuadro 2. Órganos utilizados como testigos.

Virus	Testigo (+)	Testigo (-)
CDV	Pulmón de Perro con CIIC e IN, del cual el encéfalo fue (+) por IF	Pulmón neumónico sin Ac. 1ario
CAV	Pulmón e hígado de perro con CIIN (+) por IF	Pulmón neumónico sin Ac. 1ario.
CPIV	Pulmón de bovino (+) a PI3 por IHQ y con CIIC	Pulmón neumónico sin Ac. 1ario.

CDV= Virus de distemper canino
CAV= Adenovirus canino
CPIV= Virus parainfluenza canina
IF= Inmunofluorescencia
Ac= Anticuerpo

CIIC= Cuerpos de inclusión intracitoplásmicos
CIIN= Cuerpos de inclusión intranucleares
PI3= Virus de parainfluenza 3
IHQ= Inmunohistoquímica
(+)= Positivo

Cuadro 3. Número y porcentaje positivos por inmunohistoquímica (IHQ) para uno, dos y tres virus.

No. de casos	No. de casos positivos para 1, 2 y 3 virus	% del total de casos
15	1	43
10	2	29
10	3	29
Total 35		100

Cuadro 4. Número y porcentaje de inmunopositivos y negativos a virus de distemper canino (CDV), adenovirus canino (CAV) y virus de parainfluenza canina (CPIV), en pulmones neumónicos de perros domésticos.

	CDV		CAV		CPIV	
	No.	%	No.	%	No.	%
Positivos	27	77	20	57	18	51
Negativos	8	23	15	43	17	49
TOTAL	35	100	35	100	35	100

CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPIV= Virus de parainfluenza canina

Cuadro 5. Número y porcentaje de casos positivos para CDV, CAV y CPiV y asociaciones entre ellos.

Virus	No. casos positivos	%
CDV	8	53
CAV	5	33
CPiV	2	13
Subtotal	15	100
CDV + CAV	4	40
CDV + CPiV	5	50
CPiV + CAV	1	10
Subtotal	10	100
CDV + CAV +CPiV	10	100
Total	35	100

CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPiV= Virus de parainfluenza canina

Cuadro 6. Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 1, grado y localización del antígeno en perros de 2 semanas a 2 meses de edad.

Caso	Edad	Resultados de IHQ a CDV	Resultados de IHQ a CAV	Resultados de IHQ CPiV
1	2 semanas	(+) moderada cantidad de Ag en neumocitos	(-) a IHQ	(+) ligera cantidad de Ag en neumocitos
2	2 semanas	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos
3	3 semanas	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) abundante Ag en macrófagos	(+) abundante Ag en macrófagos y monocitos.
4	1 mes	(+) abundante Ag en macrófagos y epitelio alveolar	(+) abundante Ag en macrófagos	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos
5	1 mes	(+) abundante Ag en macrófagos y epitelio alveolar	(+) abundante Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos
6	1.5 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos
7	1.5 meses	(-) a IHQ	(+) abundante Ag en macrófagos	(-) a IHQ
8	7sem	(+) moderada cantidad de Ag en neumocitos II y macrófagos	(-) a IHQ	(-) a IHQ
9	2 meses	(-) a IHQ	(-) a IHQ	(+) abundante Ag epitelio bronquial y macrófagos
10	2 meses	(+) ligera cantidad de Ag en epitelio bronquiolar	(-) a IHQ	(-) a IHQ
11	2 meses	(-) a IHQ	(+) ligera cantidad de Ag en monocitos	(-) a IHQ
12	2 meses	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en epitelio bronquial y macrófagos
13	2 meses	(+) modera cantidad de Ag en macrófagos y epitelio alveolar	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ
14	2 meses	(+) abundante Ag. en macrófagos y neumocitos II	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos
15	2 meses	(+) ligera cantidad de Ag macrófagos	(-) a IHQ	(-) a IHQ
16	2 meses	(-) a IHQ	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad en epitelio bronquiolar
17	2 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos, neumocitos y sincios	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ

(+)= Positivo

(-)= Negativo

Ag= Antígeno

IHQ= Inmunohistoquímica

CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPiV= Virus de parainfluenza canina

Cuadro 7. Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 2, grado y localización del antígeno en perros de 3 meses a 1 año de edad.

Caso	Edad	Resultados de IHQ a CDV	Resultados de IHQ a CAV	Resultados de IHQ CPiV
18	3 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(-) a IHQ
19	3 meses	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos, epitelio bronquial y neumocitos II	(-) a IHQ
20	3 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos.	(+) abundante Ag en macrófagos y epitelio bronquial
21	3 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) abundante Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos y epitelio bronquial
22	3 meses	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos, monocitos y neumocitos II.	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos y epitelio bronquial
23	3 meses	(+) abundante Ag en macrófagos	(+) CAV abundante Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos
24	4 meses	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos
25	4 meses	(-) a IHQ	(+) ligera cantidad de Ag perivascular y macrófagos	(-) a IHQ
26	7 meses	(-) a IHQ	(+) abundante Ag en macrófagos	(-) a IHQ
27	1 año	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(-) a IHQ

(+)= Positivo

(-)= Negativo

Ag= Antígeno

IHQ= Inmunohistoquímica

CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPiV= Virus de parainfluenza canina

Cuadro 8. Resultados de inmunohistoquímica (IHQ), del grupo 3, grado y localización del antígeno en perros de 1.5 a 12 años de edad.

Caso	Edad	Resultados de IHQ a CDV	Resultados de IHQ a CAV	Resultados de IHQ CPiV
28	1,5 años	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(-) a IHQ
29	2.5 años	(+) ligera cantidad de Ag en epitelio bronquial	(+) moderada cantidad de Ag en epitelio bronquiolar y macrófagos	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos y epitelio bronquial
30	3 años	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos
31	3,5 años	(+) abundante Ag en monocitos, neumocitos y macrófagos	(+) abundante Ag en macrófagos	(-) a IHQ
32	7 años	(+) abundante Ag en macrófagos, monocitos y neumocitos II	(-) a IHQ	(-) a IHQ
33	7 años	(-) a IHQ	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos, endotelio y monocitos	(+) moderada cantidad de Ag en epitelio bronquial y macrófagos
34	8 años	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos y neumocitos II	(-) a IHQ	(-) a IHQ
35	12 años	(+) ligera cantidad de Ag en macrófagos	(+) moderada cantidad de Ag en macrófagos	(-) a IHQ

(+)= Positivo

(-)= Negativo

Ag= Antígeno

IHQ= Inmunohistoquímica

CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPiV= Virus de parainfluenza canina

Cuadro 9. Frecuencia de virus identificados por inmunohistoquímica (IHQ) de acuerdo a la edad.

No. Casos	CDV		CAV		CPiV	
	No.	%	No.	%	No.	%
Grupo 1 17	13	76	9	53	10	59
Grupo 2 10	7	70	7	70	5	50
Grupo 3 8	7	87	4	50	3	37
Total 35	27		20		18	

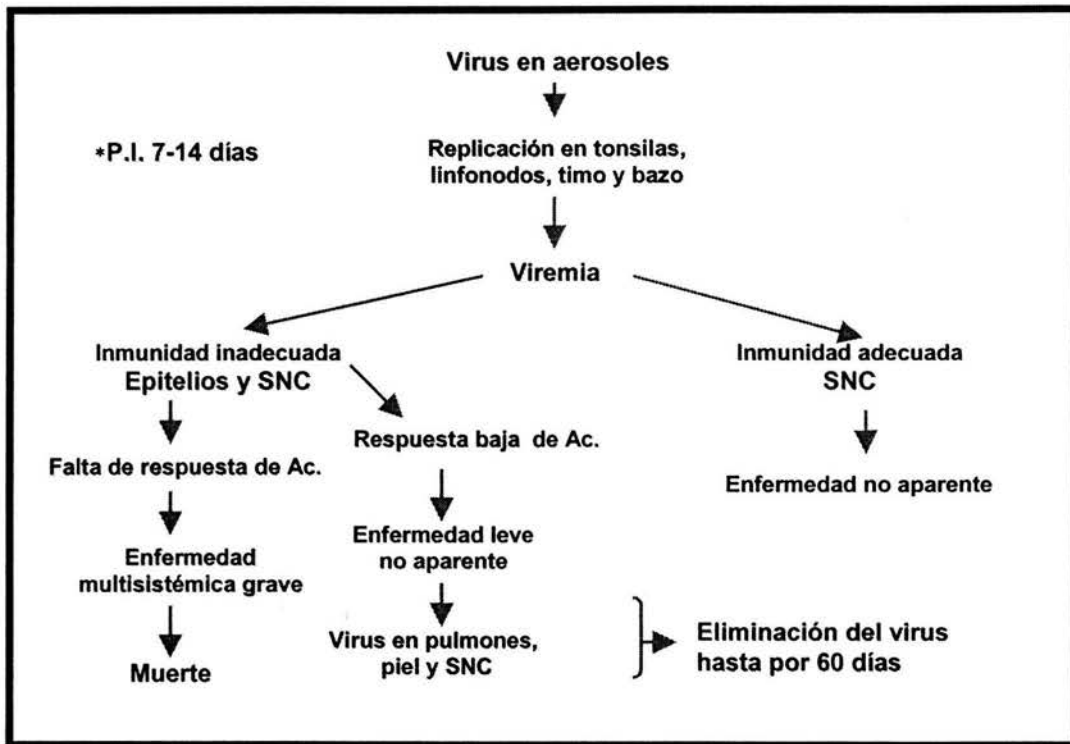
CDV= Virus de distemper canino

CAV= Adenovirus canino

CPiV= Virus de parainfluenza canina

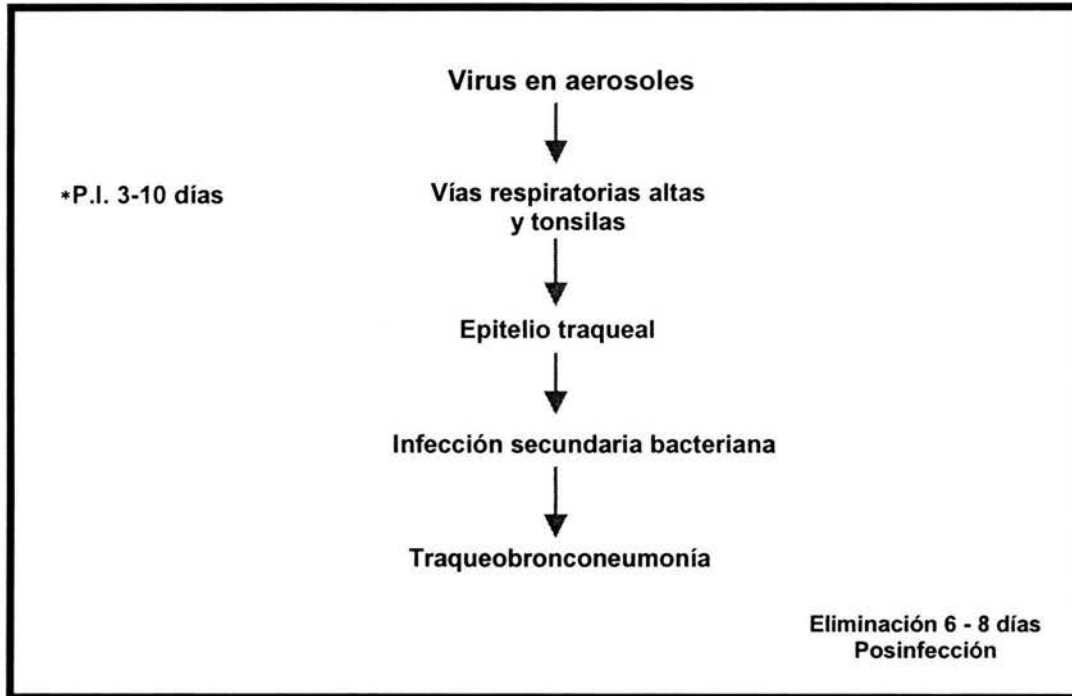
FIGURAS:

Figura 1. Patogenia del distemper canino (CDV)



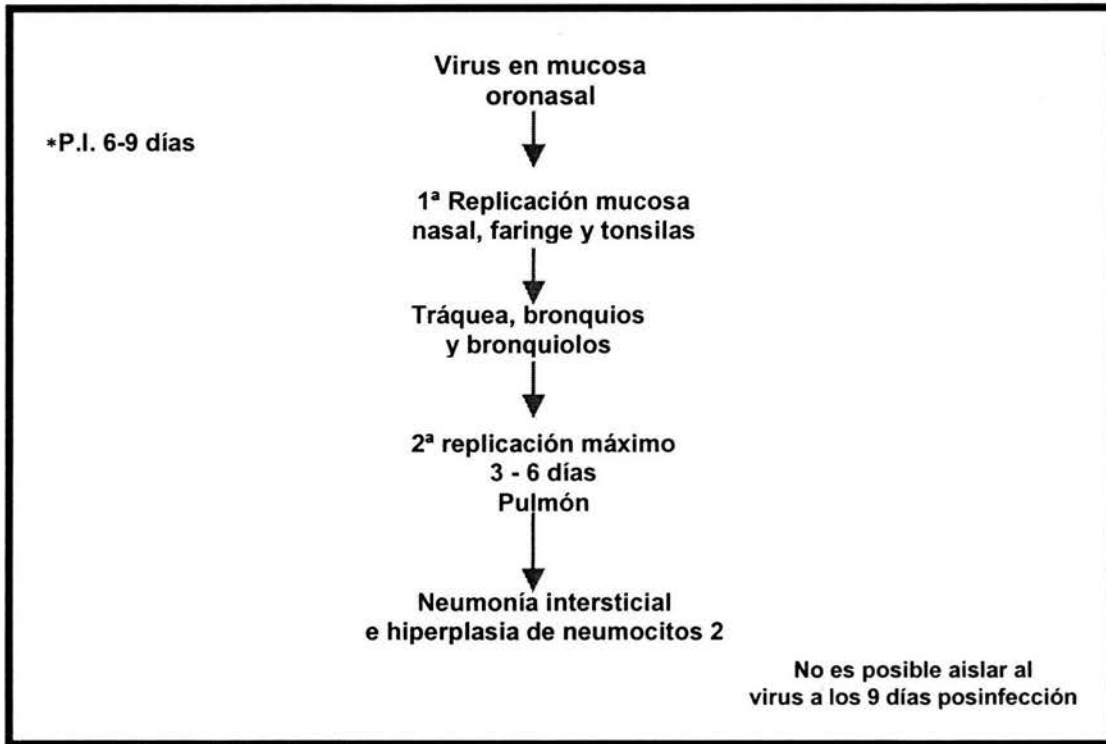
Modificado de Greene, CE¹
*P.I.= Período de incubación.
Ac.= Anticuerpos

Figura 2. Patogenia de la parainfluenza (CPIV)



*P.I.= Período de incubación

Figura 3. Patogenia de la adenovirus canina 2 (CAV 2)



*P.I.= Período de incubación

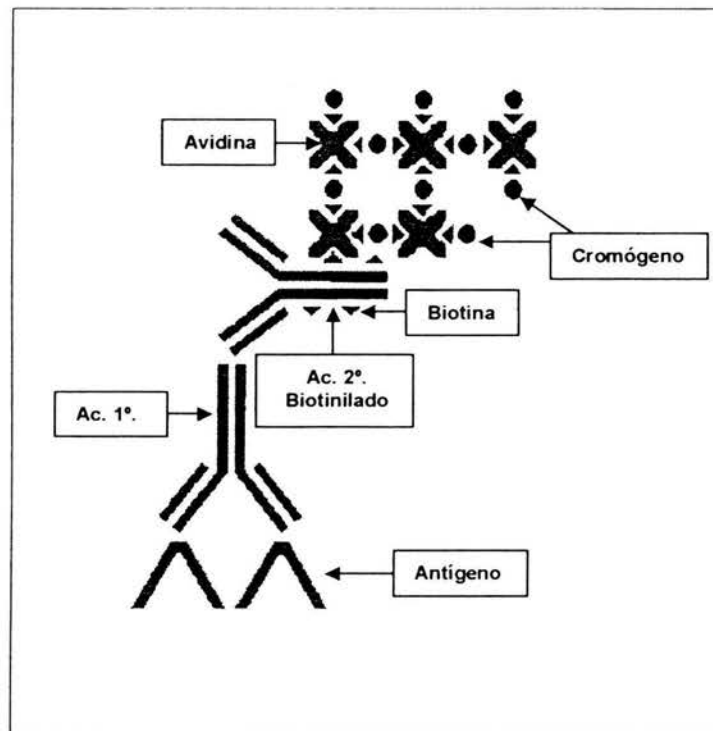


Figura 4. Esquema del complejo avidina-biotina (CAB), tomado de *Immunochemical Staining Methods*.³¹

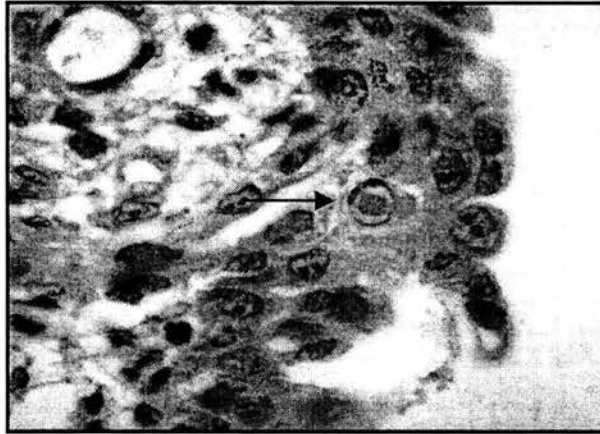


Figura 5. Tejido utilizado como testigo positivo a virus de distemper canino (CDV), con cuerpo de inclusión intranuclear en epitelio bronquial (flecha), H&E, 1000 X.

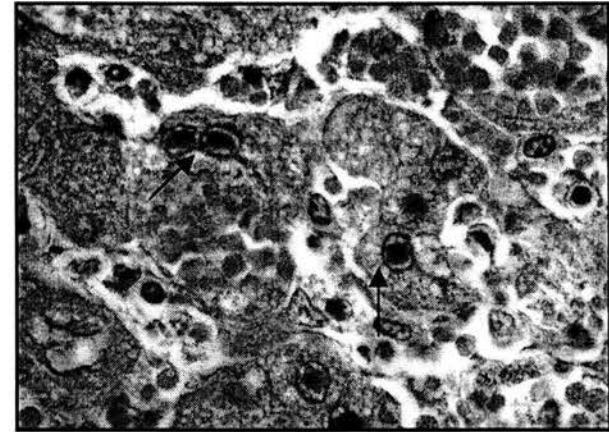


Figura 6. Caso 23, hígado con cuerpos de inclusión intranucleares (flechas), testigo positivo de adenovirus canino (CAV), H&E, 1000 X.

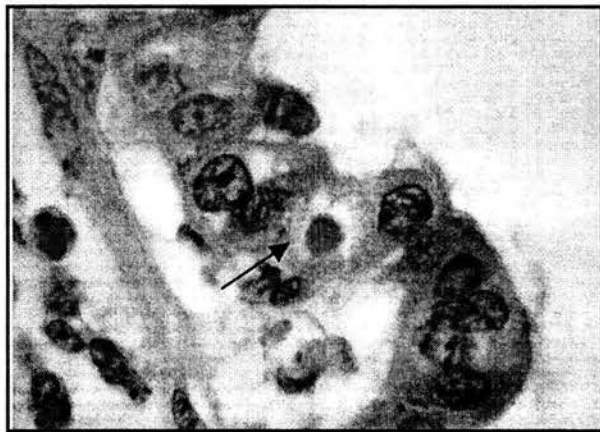


Figura 7. Tejido de bovino positivo a virus de parainfluenza 3 (PI3), epitelio bronquial con cuerpo de inclusión intracitoplásmico eosinofílico (flecha), H&E, 1000X.

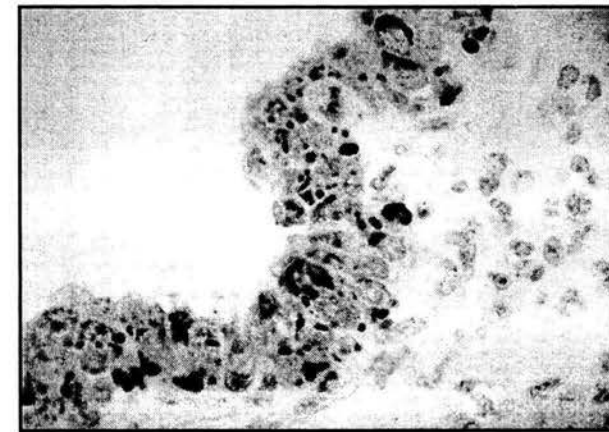


Figura 8. Inmunohistoquímica (IHQ) de pulmón de bovino, testigo positivo a virus de parainfluenza 3 (PI3), exhibe inmunoposividad en epitelio bronquial, DAB, 400X. Caso cortesía del Dr. Brian Chelack.

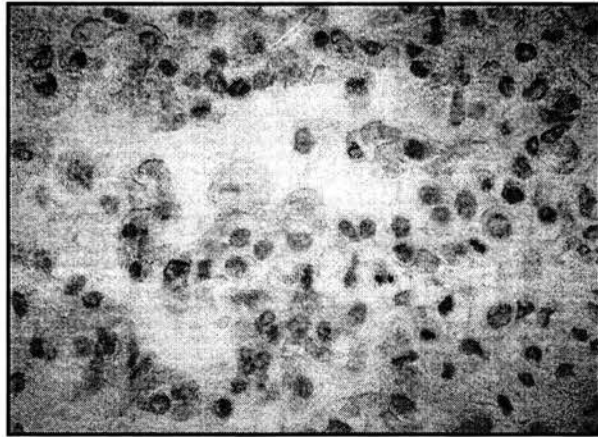


Figura 9. Tejido utilizado como testigo negativo, IHQ, 1000X.

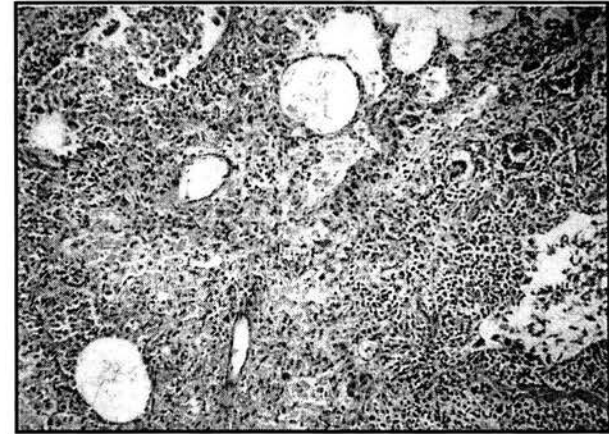


Figura 10. Caso 7, bronconeumonía supurativa e histiocítica grave difusa, con bronquiectasia, H&E, 100X.

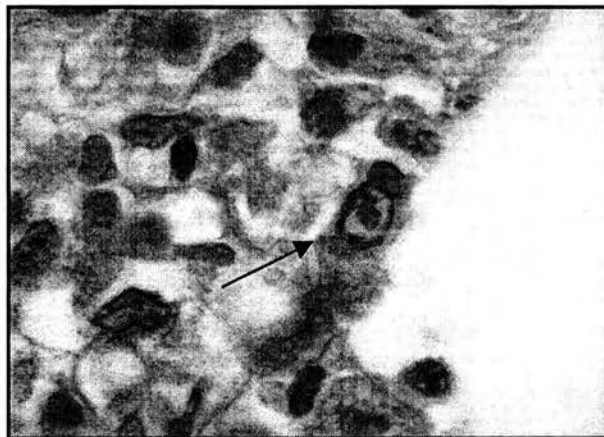


Figura 11. Caso 14, cuerpo de inclusión intranuclear eosinofílico en neumocito (flecha), H&E ,1000X.

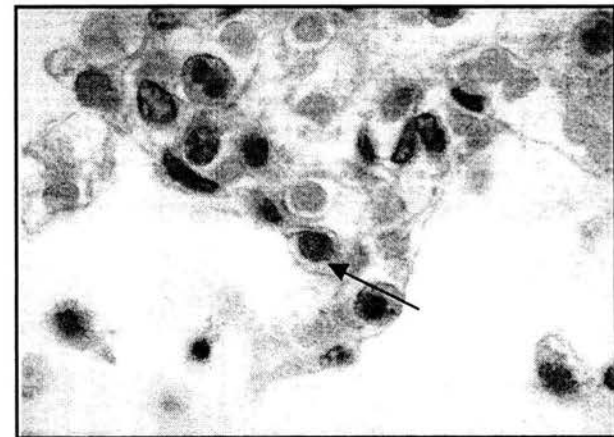


Figura 12. Caso 7, cuerpo de inclusión intranuclear basofílico e intrahistiocítico (flecha), H&E, 1000X.

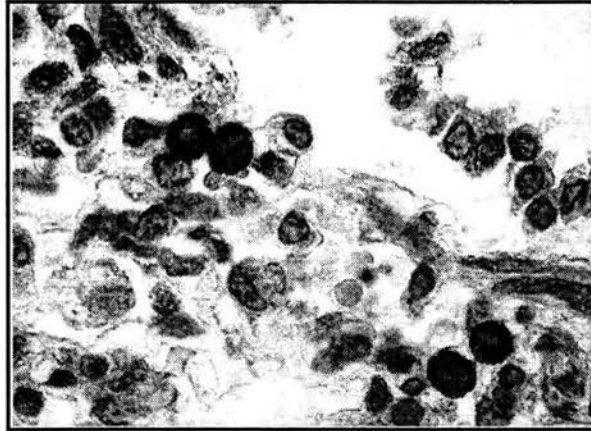


Figura 13. Caso 4, macrófagos alveolares exhiben en su citoplasma inmunopositividad marcada a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 1000X.

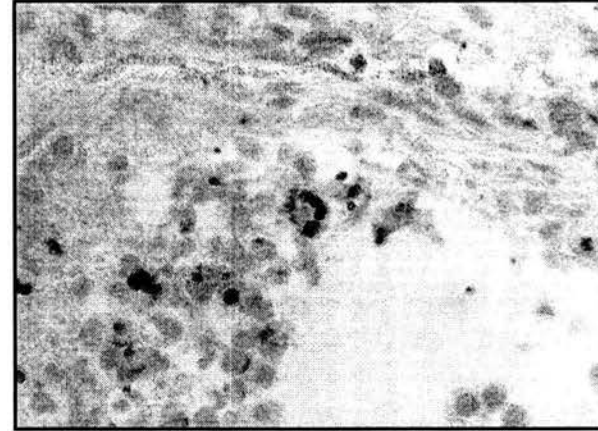


Figura 14. Caso 20, bronquiolo presenta inmunopositividad por adenovirus canino (CAV), en el citoplasma de macrófagos, IHQ, AEC, 1000X.

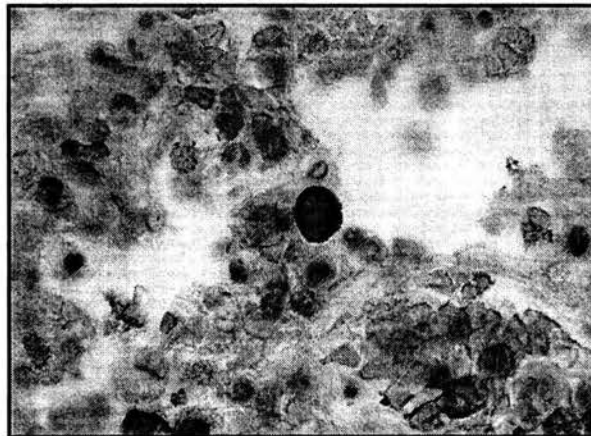


Figura 15. Caso 23, macrófago alveolar con inmunopositividad intracitoplásmica e intranuclear de virus de parainfluenza canina (CPIV), IHQ, AEC 1000X.

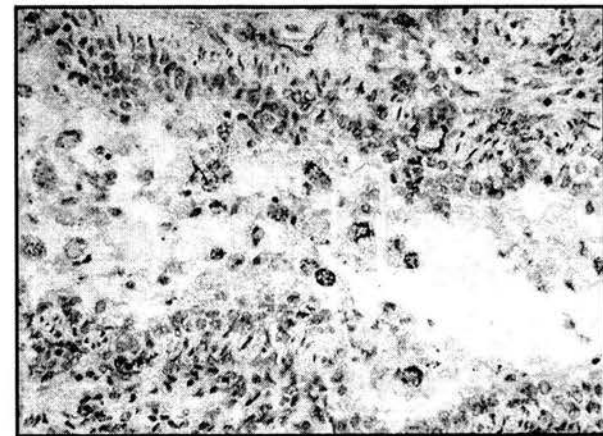


Figura 16. Caso 3, bronquio muestra en su luz macrófagos espumosos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 400X.

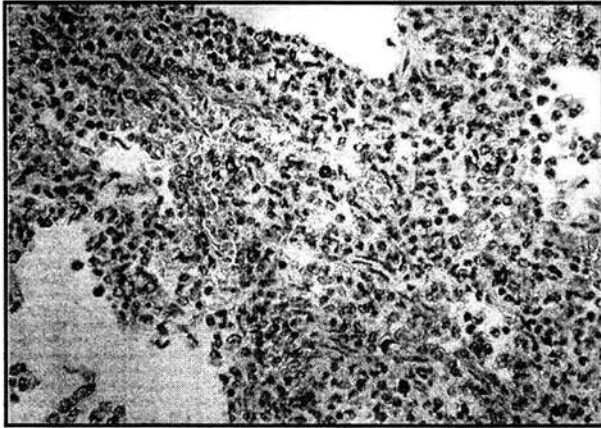


Figura 17. Caso 2, neumonía intersticial e hiperplasia de neumocitos tipo II con macrófagos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 100X.

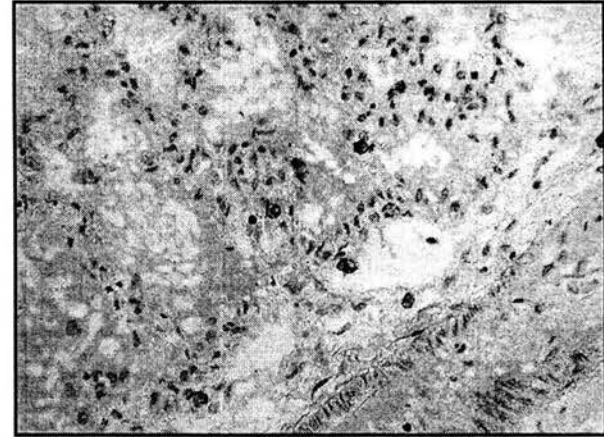


Figura 18. Caso 14, se aprecia inmunopositividad a virus de distemper canino (CDV) y edema IHQ, AEC, 100X.

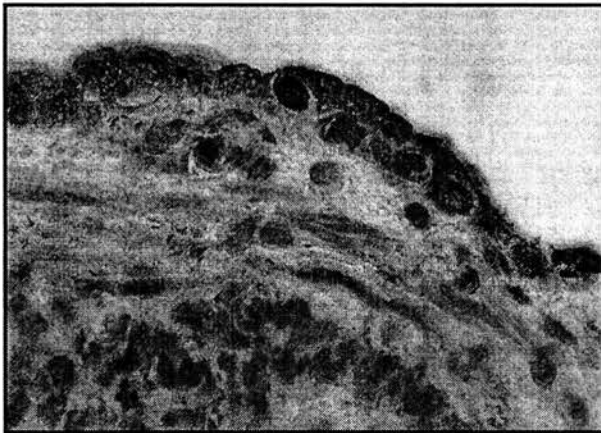


Figura 19. Caso 23, epitelio bronquiolar inmunopositivo a virus de parainfluenza canina (CPIV), IHQ, AEC, 1000X,

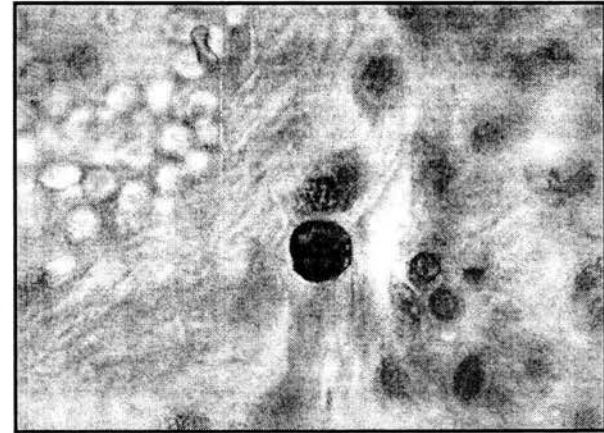


Figura 20. Caso 25, macrófago perivascular exhibe inmunopositividad por adenovirus canino (CAV), IHQ, AEC, 1000X.

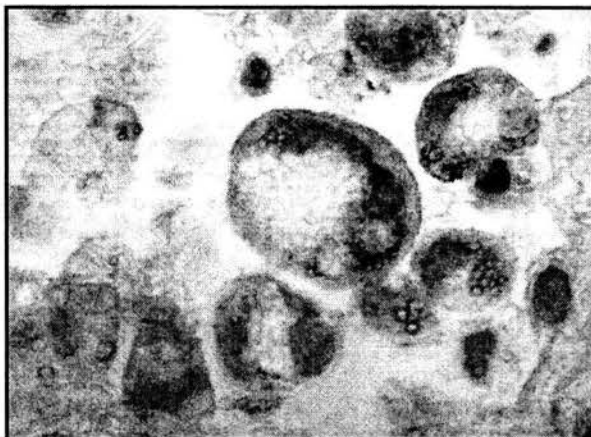


Figura 21. Caso 17, sincicios y macrófagos espumosos inmunopositivos a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 1000X.

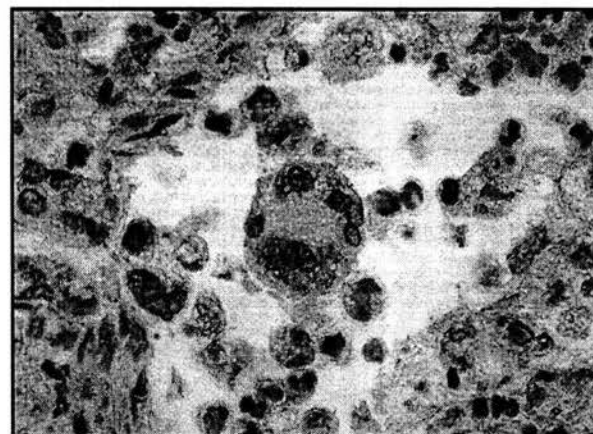


Figura 22. Caso 17, sincicio y macrófagos exhiben inmunopositividad a virus de distemper canino (CDV), IHQ, AEC, 1000X.