

10  
24.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

EVALUACION INMUNOLOGICA DE CACHORROS  
CANINOS FRENTE A ENFERMEDAD DE CARRE  
MEDIANTE LA UTILIZACION DE LA PRUEBA DE  
FIJACION DEL COMPLEMENTO DIRECTA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:

PALOMA CARRANZA ARAUJO



Asesores: MVZ. Laura Patricia Noé Martínez  
MVZ. Francisco Javier Basurto Alcántara  
MVZ. Myrna Alicia Vicencio Malién

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

232972



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.

**EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA DE CACHORROS CANINOS FRENTE A  
ENFERMEDAD DE CARRÉ MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE LA  
PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO DIRECTA**

Tesis presentada ante la  
División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de  
Médico Veterinario Zootecnista

Por

**Paloma Carranza Araujo**

Asesores: MVZ Laura Patricia Noé Martínez  
MVZ. Francisco Javier Basurto Alcántara  
MVZ. Myrna Alicia Vicencio Mallén

México, D.F.  
1998

## Agradecimientos

A la empresa Holland de México, S.A. de C.V., en especial al Dr. Humberto Andonegui por haber aceptado patrocinar parte de este trabajo y al Biólogo Fernando Guadarrama por dejarme compartir su área de trabajo.

A los miembros del Laboratorio de Serología del Departamento de Microbiología e Inmunología.

A mis asesores.

A los miembros de mi jurado.

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

Dedicatorias.

A mi mamá, gracias por todo tu apoyo y por enseñarme a no darme por vencida ante nada.

A mis abuelos, quienes siempre están conmigo.

A todos los profesores que sembraron algo en mí, aquí está el fruto.

A los conejos, cuyes y perros que participaron en este proyecto.

"Los animales no son hermanos, ni son subordinados; son otras naciones, atrapadas junto con nosotros en la red de la vida y del tiempo."  
(Henry Beston)

## Resumen

CARRANZA ARAUJO PALOMA. Evaluación inmunológica de cachorros caninos frente a Enfermedad de Carré mediante la utilización de la prueba de Fijación del Complemento Directa. (Bajo la dirección de: MVZ. Laura Patricia Noé Martínez, MVZ. Francisco Javier Basurto Alcántara y MVZ. Myrna Alicia Vicencio Mallén).

Se realizó la evaluación inmunológica frente a Enfermedad de Carré de ciento veinte muestras sueros de perro lotificados en distintos grupos según su edad, estado de salud y vacunaciones recibidas. Se utilizó la prueba de Fijación de Complemento directa en microplaca a 37°C y a 4°C. De los sueros evaluados, un 45% resultó negativo a la prueba tanto en caliente como en frío; otro 14.16% de las muestras mostró efecto anticomplementario. El resto de los sueros presentó resultados distintos en cuanto a los títulos obtenidos en la prueba. La Enfermedad de Carré se considera una enfermedad infecciosa importante, por lo que es indispensable asegurar que la práctica de vacunación sea llevada a cabo con éxito y establecer un método de evaluación inmunológica que sea confiable.

## Introducción

### Generalidades

El Moquillo Canino, Distemper Canino o Enfermedad de Carré, está considerada como una de las enfermedades infecciosas más importantes en los perros<sup>13,26,56,59</sup>. Se trata de una enfermedad sistémica, aguda o subaguda, altamente contagiosa y generalmente fatal, que en muchos casos involucra al sistema nervioso central<sup>13,15,24,26,56,57,62,66</sup>.

### Historia

La enfermedad se notificó por primera vez en Europa en 1760, pero no fue sino hasta 1809 que Jenner la describió con mayor exactitud. En 1905 Carré demostró que el agente etiológico era un virus<sup>10,26,30,38,49,56</sup>. En 1923-24 Puntoni confirmó que la enfermedad era de origen viral e inició los ensayos para la inmunización; transmitió el agente por inoculación intracerebral y encontró que el agente aislado de cerebro e inactivado con formalina protegía a los perros al enfrentarlos a virus virulento<sup>10,22,30</sup>. Lebailly repitió los experimentos de Puntoni en 1927, pero utilizó bazo en vez de cerebro<sup>10</sup>. Dunkin y Laidlow confirmaron la teoría de Carré en 1926<sup>10,30,36,49</sup>, y desarrollaron el primer método exitoso para la inmunización artificial contra el moquillo<sup>10,49</sup>, haciendo de la vacunación un procedimiento cotidiano<sup>10</sup>. A partir de 1920 se profundizó el estudio de esta enfermedad; actualmente se sigue considerando una entidad importante debido a diferentes factores, tales como la alta mortalidad en perros, las complicaciones neurológicas y su amplia distribución geográfica<sup>15,26,35,56</sup>.

### Características del agente etiológico

El virus del moquillo canino pertenece al orden de los mononegavirales<sup>17,26</sup> género *Morbillivirus*, familia *Paramyxoviridae*<sup>17,24,26</sup>. Está relacionado antigénicamente con los virus de sarampión humano, peste bovina y distemper de focas y delfines<sup>17,20,24,26,48,53,64</sup>.

Es un virus ARN de una sola cadena, con sentido negativo, envuelto, con una cubierta lipoproteica. Los viriones son pleomórficos en forma y tamaño, generalmente tienden a ser esféricos<sup>17,24,26</sup>. Contienen un 0.5% de ácido nucleico y 20-25% de lípidos<sup>17</sup>. El virus tiene simetría helicoidal y mide de 150 a 300 nm<sup>17,24,26</sup>. Está formado por una proteína no estructural (C) y seis proteínas estructurales: proteína mayor (L), hemaglutinina (H), fosfoproteína (P), proteína de la nucleocápside (N), proteína de fusión (F) y proteína de matriz (M)<sup>24</sup>. (Figura 1)

La nucleoproteína protege al genoma y es muy sensible a la proteólisis intracelular, está fosforilada y se considera el antígeno que presenta mayor reacción cruzada entre los virus del género. La proteína P también es sensible a la proteólisis y está fosforilada, se encuentra asociada con las proteínas N y L en la nucleocápside y cumple funciones en la transcripción y replicación del ARN viral. La proteína C sólo se encuentra en células infectadas, se desconoce su papel en la biología del virus<sup>24</sup>.

La proteína M, importante para la maduración del virus, está bajo la bicapa lipídica y sirve como enlace entre la nucleocápside y las glicoproteínas de superficie, F y H<sup>24</sup>. Éstas dos son antígenos de superficie<sup>17,20,24,26,48</sup> y protectores virales<sup>24</sup>. La proteína F facilita la diseminación del virus entre las células<sup>20,24,26,67</sup>, y la H, con actividad de neuraminidasa<sup>24,47</sup>, es importante para la liberación de las partículas virales de las células<sup>46</sup>. Se sabe que la H tiene una interacción específica de especie con el receptor celular<sup>24,57,67</sup> y que es responsable del tropismo selectivo del virus<sup>40,67</sup>.

La proteína L forma la nucleocápside junto con las proteínas N, P y el ARN genómico. Debido a su tamaño, es la que exhibe la mayor actividad de la ARN polimerasa<sup>24</sup>.

Solamente hay un serotipo del virus de distemper<sup>13,26,59</sup>, aunque existen varias cepas, cada una con virulencia y tropismos diferentes<sup>13,26,35,56,59</sup>.

El virus se inactiva fácilmente<sup>13,23,24,51,59</sup> con luz ultravioleta y luz visible de alta intensidad<sup>23,35,59</sup>. Permanece de siete a ocho semanas a 4°C y a 25°C y se inactiva en treinta minutos a temperaturas de 56 a 60°C<sup>32</sup>. Los solventes lipídicos al 0.3% lo inactivan en diez minutos, el formaldehído al 0.1% en dos horas, los compuestos fenólicos al 1% en varias horas y los cuaternarios de amonio al 0.2% en treinta minutos<sup>32,35,51,59</sup>.

### Epizootiología

Su distribución es mundial<sup>5,26,59</sup>. Afecta a perros domésticos y a otros miembros de las familias de los cánidos (zorro, perro salvaje, chacal, dingo, coyote, lobo); prociónidos (martucha, mapache, panda menor, coatí); mustélidos (comadreja, hurón, mink, tejón, zorrillo, nutria, mofeta) y vivérridos (civeta, mangosta)<sup>5,22,24,26,35,56,59,64</sup>. La infección también se ha demostrado en pecaríes de collar y algunos felinos<sup>5,35,56,64</sup> (leones, tigres, leopardos y jaguares)<sup>6,27</sup>. Se ha informado que las hienas también pueden ser susceptibles<sup>6,34,64</sup>. El virus se ha aislado de ardillas rojas y de puercoespines<sup>6</sup>. Aunque los gatos y los cerdos no desarrollan la enfermedad, el virus también se ha aislado de ellos<sup>8,56</sup>.

El virus de moquillo se transmite fácilmente entre las especies susceptibles, pero el perro sigue siendo el hospedero más importante<sup>5,56,64</sup>. En esta especie la incidencia de infección es mayor que la de enfermedad; esta diferencia radica en la inmunidad natural e inmunidad inducida por vacunación<sup>26,35,56</sup>.

El nivel de infección depende de la virulencia de la cepa, la edad, raza e inmunocompetencia del perro<sup>9,26,35,38,56,63</sup>. Algunos perros se recuperan espontáneamente y otros sucumben ante la infección<sup>9</sup>. Los animales jóvenes tienen mayor probabilidad de contraer la enfermedad<sup>16,24,26,38,56,59,66</sup>, sobre todo entre los tres y los seis meses de edad, cuando la

concentración de anticuerpos maternos empieza a desaparecer y el sistema inmunológico aún no alcanza su madurez<sup>26,35,38,56,59</sup>. La respuesta inmune tanto humoral como celular es un factor crucial que limita la diseminación del virus de distemper en el organismo, por lo que existe una relación directa entre la sobrevivencia y la activación de ésta<sup>9,23,26,35,38,56,59,61,62</sup>. La mayoría de los casos de moquillo canino se presenta en perros no vacunados y en individuos con un historial de vacunación desconocido<sup>16,20,59,64</sup>.

El nacimiento de cachorros en cualquier época del año impide la eliminación del virus de las poblaciones caninas<sup>25,34,58</sup>. La prevalencia de la enfermedad se favorece porque los cachorros son separados de su madre cuando aún no pueden responder efectivamente a la vacunación; además, algunas camadas son reunidas en sitios donde entran en contacto con otros perros que representan una importante fuente de contagio para los animales susceptibles<sup>11,23,26,45,66</sup>. No se ha determinado el papel de la fauna silvestre en la epidemiología de la enfermedad<sup>5,16,64</sup>, aunque es posible que los mustélidos actúen como reservorio del virus<sup>5</sup>.

### **Patogenia**

El virus entra al organismo por el tracto respiratorio después del contacto directo con animales infectados o sus secreciones. Hay una infección inicial del epitelio respiratorio y de los macrófagos alveolares y durante los siguientes dos días el virus pasa a células mononucleares en los nódulos linfoides bronquiales y tonsilas. En todos estos sitios hay replicación viral<sup>26,35,38,40,56,59,63,66</sup>. Durante la primera semana, antes del establecimiento de los signos clínicos, el virus asociado a macrófagos se disemina por sangre a médula ósea, timo, nódulos linfoides cervicales y mesentéricos y a macrófagos en la lámina propia del estómago e intestino delgado. En el séptimo día, las células mononucleares infectadas migran al epitelio de los órganos viscerales, piel y espacios perivasculares en sistema nervioso central<sup>26,35,56,63</sup>. En todos los órganos blanco hay replicación viral<sup>26</sup> seguida por una segunda fase de viremia<sup>26,35</sup>.

El nivel de distribución del virus del octavo al noveno día varia y parece depender de la producción de anticuerpos neutralizantes<sup>26,35,38,56,62,63</sup>. En animales con elevados títulos de anticuerpos no hay diseminación viral, el virus desaparece de los tejidos linfoides y la infección permanece en forma subclínica. Si para el día catorce no se ha alcanzado el nivel óptimo de anticuerpos, el virus continúa replicándose y se disemina por todo el organismo<sup>26,35,38,56</sup>. Hay infección de células mononucleares en el sistema linfático, infección extensa del epitelio en tractos intestinal, respiratorio y urogenital; en piel y glándulas<sup>26,35</sup>. La viremia asociada a leucocitos favorece la persistencia del virus ya que éste se encuentra protegido de los anticuerpos<sup>26,35,38,40,61</sup>. El papel de la inmunidad celular no está bien definido, pero se sabe que los linfocitos T sensibilizados tienen una función importante en la eliminación del virus<sup>23,61,62,69</sup>.

En algunos casos la infección alcanza el encéfalo, generalmente después de la infección sistémica<sup>26,35,40,56,63,68,70</sup>. El virus aparece primeramente en macrófagos de meninges y en células mononucleares en la adventicia perivascular y más tarde en células ependimales, células de la glía y neuronas<sup>26,35,40,63</sup>. La infección de éstas se asocia a signos que generalmente persisten hasta después de la recuperación<sup>26,56,63,66</sup>. Algunos autores mencionan que el líquido cefalorraquídeo también está involucrado en la diseminación del virus dentro del sistema nervioso central<sup>35,63</sup>.

De cuarenta a sesenta días después de la aparente recuperación, puede haber encefalitis, con desmielinización característica y que generalmente lleva a la muerte<sup>26,35,38,40,56,59,62,63,70</sup>. Otros animales presentan altos títulos de anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo<sup>26,35,56,59</sup>. Años después se establece la "encefalitis de perro viejo", condición rara y fatal con replicación viral persistente en neuronas<sup>24,26,56,59</sup>.

Durante la segunda fase de viremia el agente llega a los sitios de eliminación<sup>26</sup>. El virus se puede encontrar en secreciones nasales y oculares<sup>26,56,66</sup>, heces, orina y saliva<sup>56,66</sup> a partir del quinto día de infección<sup>26</sup>.

La recuperación del moquillo canino es seguida de una inmunidad prolongada, posiblemente de por vida<sup>25,56,66</sup>. Desafortunadamente, los animales recuperados también conservan sutiles fallas en la respuesta inmune asociadas al virus<sup>62,64</sup>.

Un aspecto muy importante en la patogenia del virus de moquillo canino es que infecta linfocitos<sup>9,26,33,38,58,59,51,62,69</sup>, lo que ocasiona una inmunodeficiencia y el animal sucumbe ante infecciones secundarias<sup>1,9,23,28,33,38,55,59,61,66</sup>. Hay disminución en la estimulación de los linfocitos con depresión temporal en la inmunidad celular y una menor síntesis de anticuerpos<sup>33,61,62,63,69</sup>. Además hay depleción linfoide y linfopenia, las cuales también contribuyen a la inmunodepresión<sup>9,35,38,59,59,61,62</sup>. El grado de inmunodepresión, la habilidad para montar una respuesta inmune específica y el desarrollo clínico de la enfermedad están determinados, en parte, por la susceptibilidad de los linfocitos a la infección con virus de moquillo canino<sup>9,59,62</sup>. En otras palabras, la respuesta inmune en la infección viral depende de la patogenia de la infección<sup>56,59,62,63,69</sup>.

El virus de distemper puede persistir en el organismo de por vida, venciendo la resistencia del hospedador al evadir, evitar y trastornar los mecanismos de defensa antivirales<sup>43,56,58,63,69,70</sup>. La persistencia está asociada de manera cercana a la virulencia<sup>56,61,63,70</sup>. La proteína de la nucleocápside (N) es importante para que el virus persista ya que cumple funciones regulatorias en la transcripción y replicación e influye en el ensamblaje del virus<sup>55</sup>.

El cofactor para la infección de las células blanco con el virus de moquillo canino es la molécula CD9, la cual tiene funciones en el ciclo de replicación viral. Es posible que esta molécula forme parte del complejo receptor del virus o que actúe, vía señalamientos intracelulares, favoreciendo la expresión o la actividad del receptor<sup>40</sup>. Es una proteína transmembranal que se encuentra en la superficie de células pre-B y células B inmaduras<sup>1,40</sup>, células T activas<sup>40</sup>, monocitos y plaquetas<sup>1</sup> y en células del sistema nervioso central<sup>40</sup>.

## Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Carré puede presentar tres formas:

A) Forma catarral o sistémica<sup>16,26,35</sup> con conjuntivitis y signos relacionados a los tractos respiratorio y digestivo<sup>15,26,35,56,59,66</sup>. Los signos respiratorios incluyen ruidos debido a la inflamación de la laringe y bronquios, tonsilitis<sup>26,56</sup>, disnea y tos<sup>25,35,56,59,66</sup> seca que puede volverse húmeda y productiva<sup>55</sup>. Después se desarrolla bronquitis o bronconeumonía catarral y algunas veces pleuritis<sup>26,56</sup>. Hay secreciones oculares y nasales de serosas a mucopurulentas<sup>35,56,59,66</sup>.

Los signos gastrointestinales incluyen vómito y diarrea acuosa<sup>26,35,56,59,66</sup> que puede llegar a presentar moco<sup>35,41</sup>. Puede haber tenesmos e intususcepción<sup>56</sup>.

B) Forma nerviosa: Se caracteriza por mioclonos, ataxia, espasmos tónico-clónicos, ataques epileptoides, parestia, alteraciones en la conciencia y conductuales<sup>16,26,35,56,59</sup> y crisis de "masticación"<sup>35,56,59</sup>. Suele haber deficiencia visual<sup>56,59,66</sup>.

C) Forma de endurecimiento digital o "hard-pad": Se observa hiperqueratosis de cojinetes plantares y nasales<sup>16,26,35,56,59,66</sup>. Generalmente aparece como una complicación tardía del moquillo canino<sup>26,33,56</sup>.

La mayoría de los perros presentan la forma sistémica, que puede o no involucrar al sistema nervioso central<sup>16,35</sup>, así como la hiperqueratosis de cojinetes plantares y nasales<sup>16</sup>. Casi todos los perros con hiperqueratosis desarrollan problemas neurológicos<sup>56</sup>.

Los signos clínicos también incluyen deshidratación, anorexia, pérdida de peso y fiebre difásica de hasta 41°C. Los animales están deprimidos e indiferentes<sup>26,35,56,59,66</sup>. En algunos casos se pueden observar erupciones petequiales en abdomen<sup>20,30,57</sup> o dermatitis pustular<sup>26,35,56,59</sup>.

Los perros que se infectan de moquillo antes del brote de los dientes permanentes sufren daños en el estrato dentario, el cual presenta una apariencia irregular, muchas veces con hipoplasia del esmalte<sup>35,56,59</sup>.

## Diagnóstico

El diagnóstico se basa en el reconocimiento de los signos clínicos<sup>25,35,55</sup>. Las pruebas de laboratorio confirman el diagnóstico presuntivo con la determinación de antígenos o anticuerpos<sup>25,26,61</sup>.

### a) Diagnóstico antemortem.

Generalmente, los primeros análisis que se llevan a cabo a nivel de laboratorio son estudios hematológicos en los cuales se detecta linfopenia y trombocitopenia<sup>35,56,59</sup>.

El diagnóstico de moquillo canino se puede hacer por aislamiento del virus<sup>8,9,25,35,59</sup>. Durante las dos primeras semanas de infección se realiza en cultivos de linfocitos de perro<sup>8,9,35</sup> a partir de muestras de la capa leucocitaria<sup>8,9,56</sup>. A partir de la tercera semana se prefieren hisopos nasales, conjuntivales y vaginales y muestras de líquido cefalorraquídeo<sup>8,31</sup>.

La prueba de inmunofluorescencia permite la detección del antígeno a partir de células conjuntivales<sup>16,25,26,31,35,56,59</sup> o de linfocitos periféricos<sup>26,31,35,38,56,59</sup>.

El serodiagnóstico, de importancia decisiva, está basado en la detección de un alza significativa en los niveles de anticuerpos específicos, utilizando muestras de suero pareadas, con quince días de diferencia entre ambas<sup>15,16,25,26,31,56,61</sup>, o de líquido cefalorraquídeo<sup>25,31,35,56</sup>. La detección de IgM es importante para el monitoreo de infecciones recientes de moquillo canino, ya que esta inmunoglobulina es la primera que aparece en la infección y declina a niveles relativamente bajos, en comparación con IgG, que aumenta en los tres meses siguientes<sup>16,25,35,45,56</sup>. La IgG aparece hasta la quinta o sexta semana de infección y su presencia indica que la infección ya está en su fase final o ya se superó e indica que el perro ya es inmune al virus<sup>45</sup>. Las pruebas para detectar anticuerpos anti-distemper son ELISA<sup>15,16,25,31,35,45</sup>, neutralización<sup>31,35,39</sup>, precipitación y fijación del complemento<sup>15,38,39,49</sup>.

La biología molecular propone pruebas de ADN complementario para la detección del virus<sup>25</sup>.

#### b) Diagnóstico postmortem.

Para el estudio de inmunofluorescencia postmortem se utilizan muestras de pulmón, estómago, intestino, vejiga<sup>26,31,35,56,59</sup>, encéfalo<sup>31,35,56</sup>, hígado<sup>31,35</sup>, tonsilas, bazo, ganglios linfáticos<sup>35</sup> y cojinetes plantares<sup>45,59</sup>.

También se hace un estudio histopatológico para determinar la presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos intracitoplasmáticos<sup>16,26,35,38,41,56</sup>. Estas inclusiones se localizan en neutrófilos, linfocitos, monocitos y eritrocitos. Su presencia corresponde a la replicación viral en sistema linfoide<sup>26,41,56</sup> e indica que el animal se encuentra en fase virémica<sup>56</sup>.

#### Tratamiento

No existe tratamiento específico para la enfermedad de distemper, solamente es sintomático e incluye terapia de sostén a base de líquidos. Se recomienda administrar complejo B para fortalecer al organismo y estimular el apetito<sup>26,35,36,59</sup> y hacer uso de suplementos nutricionales<sup>59</sup>. Los antieméticos parenterales son útiles para controlar el vómito<sup>56</sup>. Es común administrar antibióticos de amplio espectro para controlar las infecciones bacterianas secundarias<sup>26,35,56,59</sup>. Los perros con infecciones respiratorias superiores deben mantenerse limpios, calientes y fuera de las corrientes de aire<sup>35,56</sup>, se les pueden dar expectorantes, broncodilatadores y mucolíticos si la tos es productiva<sup>56</sup>. Se recomiendan anticonvulsivos para aminorar un poco las convulsiones<sup>33,58</sup>.

#### Prevención

La prevención del moquillo canino se basa en la vacunación con biológicos de virus activo modificado<sup>2,13,20,22,23,26,35,59,61,66</sup>. Éstas contienen una cepa activa pero inocua del virus<sup>2,23,26,35,61</sup>, la cual brindará mayor protección mientras más parecido sea el virus vacunal al patógeno<sup>2,42</sup>.

El agente modificado permanece en el organismo, replicándose dentro de él, y estimula una buena respuesta inmune sin producir enfermedad<sup>2,4,23,26,34,47,51</sup>. Una sola dosis vacunal bastará para inmunizar perros adultos que carezcan de anticuerpos naturales contra moquillo<sup>22,34,59</sup>. Sin embargo, se recomiendan refuerzos anuales o bianuales para mantener un adecuado nivel de protección<sup>2,26,51,56,59,66</sup>. Los perros vacunados con estos biológicos inician tanto una respuesta celular<sup>9,23,34</sup> como una respuesta humoral<sup>34</sup>.

Las vacunas de virus activo cumplen con los requerimientos para ser una excelente vacuna<sup>4</sup>. Activan células presentadoras de antígeno para iniciar el procesamiento del antígeno y la producción de interleucinas<sup>4,51</sup>. Activan linfocitos T y B para tener una buena dotación de células de memoria<sup>4,20,23,26,61</sup>, lo cual es importante ya que las células T y B efectoras tienen una vida corta, haciendo indispensable la creación de una memoria inmunológica<sup>4,23</sup>. Las vacunas generan linfocitos T cooperadores y citotóxicos para varios epitopos, para así contrarrestar la variación en la respuesta inmune debido al polimorfismo del complejo mayor de histocompatibilidad. La persistencia del antígeno en tejido linfoide favorece la diferenciación de células plasmáticas que continúan produciendo anticuerpos<sup>4,20,23,26,61</sup>.

Desafortunadamente, las vacunas de virus activo pueden causar problemas<sup>2</sup> como reversión del virus a su forma patógena en el animal inoculado<sup>2,21,22,26,34,35,61</sup>, como sucede con la vacuna de moquillo canino en hurones<sup>2,35</sup>. El virus vacunal posiblemente tenga un efecto supresor en el sistema inmune del hospedador<sup>1,2,22,34,61</sup>, haciéndolo más susceptible a otros componentes de la vacuna en caso de utilizar vacunas mixtas, como las que combinan el virus de distemper con adenovirus<sup>2,22,61</sup>. Por último, las vacunas de virus activo modificado no se recomiendan para hembras gestantes<sup>2,26,34,42</sup>.

Es importante no vacunar perros menores de un mes de edad o inmunodeprimidos, ya que existe el riesgo de que se presente un problema de encefalitis postvacunal<sup>18,22,34,35,56,61</sup>; éste aumenta al combinar vacunas de moquillo con vacunas de parvovirus o bien al vacunar contra

moquillo perros infectados con parvovirus<sup>22,34,35,51,56</sup>. En animales con una deficiencia inmunológica preexistente la vacuna puede resultar en moquillo clínico<sup>23,34,51,61</sup>.

En cachorros, la inmunización efectiva no es fácil de lograr. El problema principal radica en la interferencia de los anticuerpos maternos con la respuesta a la vacuna<sup>13,18,20,22,23,34,50,51,55,61</sup>. Estos anticuerpos retrasan la síntesis de inmunoglobulinas por un proceso de retroalimentación negativa<sup>1,52,61</sup>. Así, los cachorros que son vacunados contra moquillo canino cuando todavía tienen anticuerpos maternos no responden a la vacunación<sup>13,18,20,22,50,51,61</sup>.

Debe tomarse en cuenta que la edad de respuesta a la vacunación es proporcional al título de anticuerpos de la madre<sup>13,22,23,34,61</sup>, ésta varía en función de la transferencia de inmunoglobulinas en útero (5-10%) (IgG) y por medio del calostro (90-95%) (IgA, IgG e IgM)<sup>20,23,34,50,51,55,61,66,68</sup>. La cantidad de inmunoglobulinas, a su vez, es inversamente proporcional al tamaño de la camada, es decir, que a mayor número de crías, menos inmunoglobulinas para cada uno<sup>18,34,50,68</sup>. Los anticuerpos maternos contra moquillo contenidos en el calostro son absorbidos en el intestino de los cachorros y alcanzan su máxima cifra sérica entre doce y veinticuatro horas después del nacimiento<sup>50,51,55,61</sup>. Esta concentración disminuye al aumentar la edad<sup>20,22,23,50,51,55,61,66,68</sup>. La vida media para los anticuerpos contra moquillo canino es de 8.4 días<sup>34,50,51,55,61</sup>.

Los perros son susceptibles a esta enfermedad desde su nacimiento<sup>26,59</sup>, aumentando el riesgo hacia las doce semanas de vida cuando los anticuerpos maternos han desaparecido<sup>20,34,51,61</sup>. Estos animales deben recibir una serie de vacunas de acuerdo a programas prácticos que aseguren lo más posible la inducción de inmunidad<sup>13,22,23,61,68</sup>. Existe una relación directa entre los títulos de anticuerpos presentes en calostro y en el suero de la madre con los títulos séricos de las crías<sup>13,18,22,23,34,51,68</sup>. Se ha propuesto la utilización del nomograma diseñado por Gillespie y sus colaboradores en 1959 para determinar el momento adecuado para la primera vacunación<sup>10,11,18,34,50,55,60</sup>. Éste se basa en correlacionar el título de anticuerpos de las madres con

la edad de las crías, conociendo la vida media de los anticuerpos<sup>11,55,61</sup>. En Estados Unidos el título de anticuerpos neutralizantes que permite asegurar éxito en la vacunación en cachorros es de 100<sup>13,23,61</sup>. La mayoría de los perros alcanzan este nivel a las doce semanas de vida<sup>20,23,51,61</sup>, aunque algunos lo tienen desde las nueve semanas<sup>23,51</sup>.

En 1965, Philips Roxane introdujo la utilización de vacunas de sarampión para contrarrestar los problemas de inmunización en cachorros<sup>10</sup>. La vacunación heterotípica se recomienda en zonas de alta prevalencia de moquillo canino para cachorros menores de diez semanas de edad, en los cuales la vacuna de distemper puede no ser efectiva debido a la interferencia de los anticuerpos maternos<sup>13,20,22,23,34,51,61</sup>. Esta vacuna de virus activo modificado, cepa Edmonston<sup>60</sup>, ofrece protección cruzada contra moquillo por la presencia de la proteína F del virus de sarampión<sup>20,48,57,61</sup>. La vacuna produce una respuesta de tipo humoral y celular contra el virus de moquillo canino<sup>18,20,23,59</sup>.

La vacuna de sarampión no se recomienda para hembras que se vayan a destinar a la reproducción, ya que los anticuerpos generados pueden pasar a su progenie y estas crías no responderán a la vacunación heterotípica<sup>20,22,34,51</sup>. Lo mismo sucede si se vacunan perros mayores de diez semanas de edad con esta vacuna<sup>51,59</sup>.

En la actualidad la inmunización debe practicarse utilizando los recursos que la ciencia ha diseñado para su mejor logro<sup>22,68</sup>. La elaboración de calendarios de vacunación debe ajustarse a las necesidades individuales de cada paciente y no generalizar por especie<sup>13,23,60,66</sup>. Uno de los criterios a considerar es la edad de susceptibilidad y la madurez inmunológica del perro<sup>13</sup>.

El nomograma no siempre resulta práctico<sup>10,18,34</sup>, ni se logra aplicar con éxito por razones económicas y de tiempo, ya que la prueba de seroneutralización requiere aproximadamente quince días y tiene un costo muy elevado<sup>10,13,18,45</sup>. Por ello, la única manera práctica para determinar la eficacia de un programa de inmunización, en caso de duda, es "preguntar al perro" a través de métodos serológicos. Se deben utilizar muestras pre- y postvacunación y tanto las pruebas como

los resultados deben adecuarse a las condiciones de cada lugar donde se quiera aplicar la vacunación de manera exitosa<sup>11,13,18,60,66</sup>.

### **Prueba de Fijación del Complemento**

La prueba de Fijación del Complemento (FC') es una buena opción para la evaluación inmunológica de los animales<sup>13,39,52</sup>. La prueba hemolítica de FC' se lleva a cabo en dos etapas: la fase invisible y la visible. En primer lugar, el antígeno y el suero problema (cuyo complemento se inactivó por el calentamiento a 56-60°C por treinta minutos) se incuban en presencia de suero normal de cuye<sup>14,61,65</sup>, el cual suministra una fuente de complemento que tiene gran actividad hemolítica<sup>14,52,61,65</sup>. Después de reaccionar algún tiempo la mezcla Ag-Ac-C', se mide la cantidad de complemento libre<sup>14,61,65</sup>, añadiendo un sistema indicador formado por una suspensión de eritrocitos de ovino cubiertos de anticuerpos. La lisis de esos glóbulos rojos, caracterizada por la aparición de una solución roja transparente, constituye un resultado negativo, pues significa que el complemento no se fijó ya que no había anticuerpos en el suero problema. Si no hay lisis y persiste la suspensión turbia de glóbulos rojos, la prueba fue positiva. Se acostumbra titular el suero problema, de manera que si existen anticuerpos en él, al diluirlo la reacción en cada pozo pasará de eritrocitos sin destruir (prueba positiva) a lisis completa (prueba negativa)<sup>14,52,61,65</sup>. Se puede considerar que el título del suero es la dilución más alta de éste en la cual hay 100% de sedimentación de glóbulos rojos<sup>14,61</sup>.

Existen dos variantes de la prueba de FC'. Una es la prueba a 37°C, en la cual la mezcla Ag-Ac-C' se incubaba a esta temperatura durante una hora antes de agregar el sistema indicador<sup>12,14,52,61,65</sup>. La otra es la prueba en frío; en ésta se incubaba la mezcla Ag-Ac-C' a 4°C durante doce horas y posteriormente se le agrega el sistema indicador. La prueba en frío es más específica que la de 37°C para la detección de IgG<sup>65</sup>.

La prueba de FC' ha sido utilizada para la detección de anticuerpos séricos en pacientes enfermos de sarampión<sup>3,37,46,47,48,54</sup>. La relación antigénica entre este virus y el de moquillo canino nos permite considerar que el método diagnóstico propuesto será apropiado para la determinación de anticuerpos anti-distemper.

El diagnóstico de moquillo canino se ha logrado detectando antígeno viral en órganos de animales infectados, principalmente en bazo<sup>6,30</sup>, utilizando la técnica de FC' directa. Inclusive, se ha demostrado que el suero de perros coalescentes de moquillo canino fija el complemento en presencia de antígeno de sarampión<sup>30</sup>. Por esto, podemos pensar que la prueba de FC' no sólo es útil para detectar antígeno viral sino también para anticuerpos séricos contra moquillo canino.

La prueba de FC' presenta como ventajas su alta sensibilidad<sup>44</sup>, ya que detecta anticuerpos desde concentraciones de 0.05 µg/ml<sup>19,61</sup>; requiere muy poca cantidad de reactivos<sup>65</sup>, es fácil de leer, rápida, económica y no se ve afectada por fenómenos de zona<sup>3,14,30,61</sup>. Además se obtienen resultados veraces en poco tiempo<sup>3,14,65</sup>. Por todo esto se requiere realizar los ensayos de laboratorio necesarios para diseñar, aplicar, evaluar y aprobar o rechazar la técnica de Fijación del Complemento como una herramienta en la evaluación de cachorros caninos al momento de la primera vacunación.

### **Hipótesis**

La prueba de Fijación del Complemento Directa (FC') es una herramienta útil para evaluar inmunológicamente a los cachorros caninos antes y después de la primera vacunación contra la Enfermedad de Carré.

## **Objetivos**

1. Obtener y evaluar el antígeno para normalizar la prueba de Fijación del Complemento y para elaborar sueros hiperinmunes.
2. Obtener y evaluar sueros hiperinmunes en perro y en conejo para utilizarlos como testigos de la prueba.
3. Realizar los ensayos necesarios para normalizar la prueba de Fijación del Complemento.
4. Desarrollar una curva patrón para la evaluación de los sueros problema.
5. Evaluar sueros de cachorros y adultos, aparentemente sanos y clínicamente sospechosos de moquillo canino, vacunados y sin vacuna contra distemper.

## Material y métodos

### 1) Antígeno:

Se trabajó con virus de moquillo canino cepa Rockborn<sup>a</sup> cultivado en células MDCK, inactivado con bromoetilamina y con un título de  $10^{3.5}$  DIFF<sub>50</sub>. Éste se utilizó como antígeno en la prueba de Fijación del Complemento y para la elaboración de sueros hiperinmunes, los cuales sirvieron para estandarizar la prueba y como testigos positivos de la misma.

### 2) Sueros hiperinmunes:

Para la elaboración de los sueros hiperinmunes se utilizaron:

Conejos Nueva Zelanda blancos, machos, con un peso inicial de 2 kg.

Perros de raza, sexo, edad y peso indistintos.

### 3) Sueros problema:

Se trabajó un total de 120 muestras, obtenidas de tres criaderos y varias clínicas particulares, las cuales se lotificaron dentro de los siguientes grupos:

- a) Cachorros clínicamente sanos y sin vacuna contra distemper.
- b) Cachorros clínicamente sanos y vacunados contra distemper.
- c) Cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.
- d) Cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.
- e) Adultos clínicamente sanos y vacunados contra distemper.
- f) Adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.
- g) Adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.

La cantidad de sangre tomada fue la suficiente para obtener un mínimo equivalente a 0.5 ml de suero. La colección de muestras se hizo de manera aséptica utilizando tubos vacutainer o jeringas. Se permitió la coagulación de la sangre para después proceder a la centrifugación para

---

<sup>a</sup> Proporcionada gentilmente por Laboratorios Holland de México, S.A. de C.V.

separar los sueros. Éstos se conservaron en viales estériles, manteniéndolos a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la utilización del suero.

En todas estas muestras se midió el título de anticuerpos contra moquillo canino mediante la prueba de FC' directa. El procedimiento se repitió tres veces para cada suero, a  $37^{\circ}\text{C}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Los dueños de los animales muestreados llenaron un cuestionario al momento del muestreo de sus mascotas. Éste sirvió para llevar un registro de los perros y conocer sus antecedentes. (Figura 2) Se realizó un examen físico de los animales, reportándose también los datos obtenidos. (Figura 3)

**Reactivos para la prueba de FC':**

Además de los sueros problema y el antígeno de moquillo canino:

Solución buffer (preparada con tabletas OXOID Complement Fixation diluent tablets, agua destilada y NaCl); complemento de cuye (suero depositado en viales y mantenido congelado a una temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ ); sistema indicador formado por glóbulos rojos de ovino lavados y diluidos al 2% en solución buffer y hemolisina (anticuerpos para sensibilizar los glóbulos rojos de ovino).

**Material para la prueba de FC':**

Microplacas de 96 pozos, micropipetas de  $25\ \mu\text{l}$  para la aplicación de los reactivos y la realización de las diluciones, baño María de  $56-90^{\circ}\text{C}$  para la inactivación de los sueros diluidos y de  $37^{\circ}\text{C}$  para la incubación de la prueba.

**Método:**

Se realizaron diluciones 1:2 de los sueros a analizar y se incubaron en baño María a  $60^{\circ}\text{C}$  durante treinta minutos para inactivar el complemento propio.

Se identificaron las microplacas con los números de sueros, las diluciones a probar (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), los controles de suero, los sueros positivos y el negativo y los controles de la reacción (antígeno, antígeno-complemento, complemento y sistema hemolítico).

Se colocaron 25  $\mu$ l de solución buffer en todos los pozos de las diluciones y controles de suero, con excepción de aquéllos de la dilución 1:2. En los pozos de los controles se utilizó buffer en las siguientes cantidades: antígeno, 50  $\mu$ l; antígeno-complemento, 25  $\mu$ l; complemento, 50  $\mu$ l; sistema hemolítico, 75 $\mu$ l.

Se agregaron 25  $\mu$ l de los sueros inactivados en los pozos marcados con las diluciones 1:2 y 1:4 correspondientes a cada uno. Se hicieron diluciones dobles seriadas hasta 1:64.

Se agregaron 25  $\mu$ l de antígeno de moquillo previamente titulado a todos los pozos, excepto a los controles de suero y los de complemento y sistema hemolítico.

Se descongeló el complemento necesario para trabajar con dos unidades diluidas en solución buffer y se añadieron 25  $\mu$ l a todos los pozos, excepto a los controles de antígeno y sistema hemolítico.

Posteriormente, se pusieron a incubar las microplacas en baño María a 37°C durante sesenta minutos. Mientras transcurría este tiempo se preparó el sistema indicador. A los treinta minutos de incubación de la microplaca, se puso a incubar el sistema indicador en las mismas condiciones. Éste se incubó treinta minutos, mientras la microplaca completaba su incubación en el mismo tiempo.

Al terminar el período de incubación, se agregaron 50  $\mu$ l del sistema indicador a cada uno de los pozos de la microplaca. Se mezcló perfectamente por agitación y se regresó al baño María en espera de la reacción para la lectura, siendo treinta minutos el período máximo.

Se realizó también la prueba de FC' en frío. En ésta, la incubación del sistema Ag-Ac-C' se hizo a 4-8°C durante doce horas. Después de esta incubación el procedimiento fue el mismo que para la prueba a 37°C.

## Resultados

### Sueros hiperinmunes de conejo.

Los tres conejos utilizados para la elaboración de sueros hiperinmunes presentaron títulos de anticuerpos antidistemper fijadores del complemento desde la tercera inoculación de antígeno. Los títulos máximos alcanzados son 1:16 y 1:32 en FC' a 37°C y 1:32 y 1:64 a 4°C.  
(Cuadro 1)

**Cuadro 1: Valores obtenidos en los sueros hiperinmunes de conejo.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
1	1:16	1:64
1	1:32	1:32
1	1:16	1:32

Total de conejos: 3.

### Sueros hiperinmunes de perro.

De los cuatro animales utilizados, solamente tres respondieron a la inoculación de antígeno de moquillo canino. Un perro presentó títulos de 1:4 para FC' tanto a 37°C como a 4°C. Los resultados de la prueba para otros dos perros fueron 1:2 para ambas variantes de la técnica. El suero del animal restante mostró efecto anticomplementario, por lo cual no se pudo evaluar la síntesis de anticuerpos en este ejemplar ni se pudo utilizar como testigo en la prueba de FC' para los sueros problema. (Cuadro 2)

**Cuadro 2: Valores obtenidos en los sueros hiperinmunes de perro.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
1	1:4	1:4
2	1:2	1:2
1	anticomplementario	anticomplementario

Total de animales: 4.

**Grupo a) Cachorros clínicamente sanos y sin vacuna contra distemper.**

Este grupo es en el que se encuentra un mayor número de muestras, cincuenta y cinco de las ciento veinte trabajadas. De éstas, veintiocho no mostraron títulos para la prueba de FC' en ninguna de las dos técnicas. Diecisiete sueros resultaron negativos a 37°C; dieciseis de ellos mostraron un título de 1:2 a 4°C y uno de 1:4, también a 4°C. Se obtuvieron resultados de 1:2 a 37°C para cinco sueros, de los cuales tres fueron negativos, uno tuvo un título de 1:2 y el otro de 1:4 cuando se evaluaron a 4°C. Las cinco muestras restantes fueron insuficientes para poder realizar con ellas la prueba en frío. Los resultados de éstas en caliente fueron negativos para tres de ellas y de 1:2 para las otras dos. (Cuadro 3)

**Cuadro 3: Resultados de la prueba de FC' en cachorros clínicamente sanos y sin vacuna contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
28	negativo	negativo
16	negativo	1:2
1	negativo	1:4
3	negativo	muestra insuficiente
3	1:2	negativo
1	1:2	1:2
1	1:2	1:4
2	1:2	muestra insuficiente

Total de muestras: 55.

**Grupo b) Cachorros clínicamente sanos y vacunados contra distemper.**

De las diez muestras de este lote, ocho resultaron negativas para la prueba de FC' tanto a 37°C como a 4°C. Las dos restantes presentaron efecto anticomplementario cuantas veces se trabajaron y a pesar de someterlas a tratamiento para eliminar esto. (Cuadro 4)

**Cuadro 4: Resultados de la prueba de FC' en cachorros clínicamente sanos y vacunados contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
8	negativo	negativo
2	anticomplementario	anticomplementario

Total de muestras: 10.

**Grupo c) Cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.**

En este grupo formado por diecisiete muestras encontramos trece sueros que no presentaron títulos de anticuerpos antidistemper en la prueba de FC' a 37°C. Nueve de éstos fueron negativos también a 4°C, dos tuvieron un título de 1:2 y dos de 1:4 en esta variante de la prueba. Los cuatro sueros restantes, con títulos de 1:2 a 37°C, mostraron los siguientes resultados al evaluarlos con la técnica en frío: dos negativos, uno con 1:2 y uno con 1:4. (Cuadro 5)

**Cuadro 5: Resultados de la prueba de FC' en cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
9	negativo	negativo
2	negativo	1:2
2	negativo	1:4
2	1:2	negativo
1	1:2	1:2
1	1:2	1:4

Total de muestras: 17.

**Grupo d) Cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.**

Del total de siete muestras lotificadas en esta categoría encontramos cuatro negativas a 37°C, tres de éstas negativas en FC' a 4°C y la última con título de 1:2 para la prueba en frío. Dos sueros mostraron resultados de 1:2 a 37°C y 1:4 a 4°C. La séptima muestra de este lote es la que tiene los valores más altos del total de ciento veinte sueros problema trabajados, 1:4 para FC' a 37°C y 1:8 para FC' a 4°C. (Cuadro 6)

**Cuadro 6: Resultados de la prueba de FC' en cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
3	negativo	negativo
1	negativo	1:2
2	1:2	1:4
1	1:4	1:8

Total de muestras: 7.

**Grupo e) Perros adultos clínicamente sanos y vacunados contra distemper.**

De veintiún sueros de este lote solamente se pudieron titular diez, ya que once mostraron efecto anticomplementario, el cual impidió su evaluación. Los títulos de las restantes diez muestras son los siguientes: cuatro negativas en ambas variantes de la prueba de FC'; una negativa a 37°C y con título de 1:2 a 4°C; cuatro con resultados 1:2 al evaluarlas en ambas temperaturas y una con 1:4 a 37°C pero negativo a 4°C. (Cuadro 7)

**Cuadro 7: Resultados de la prueba de FC' en perros adultos clínicamente sanos y vacunados contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
4	negativo	negativo
1	negativo	1:2
4	1:2	1:2
1	1:4	negativo
11	anticomplementario	anticomplementario

Total de muestras: 21.

**Grupo f) Perros adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.**

Este grupo es el que tiene un menor número de muestras, solamente cuatro de un total de ciento veinte. Una de ellas resultó negativa en la prueba de FC' en caliente y en frío. Dos mostraron títulos de 1:2 en ambas variantes. La última muestra de este lote presentó efecto anticomplementario, lo cual imposibilitó su evaluación. (Cuadro 8)

**Cuadro 8: Resultados de la prueba de FC' en perros adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
1	negativo	negativo
2	1:2	1:2
1	anticomplementario	anticomplementario

Total de muestras: 4.

**Grupo g) Perros adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.**

Las seis muestras restantes del total de ciento veinte corresponden a este grupo. De éstas se lograron titular sólo la mitad ya que tres presentaron efecto anticomplementario al evaluarlas. Los títulos de los tres sueros evaluados son: uno negativo para FC' a ambas temperaturas; uno negativo a 37°C y 1:2 a 4°C; 1:2 en ambas variantes para el último suero. (Cuadro 9)

**Cuadro 9: Resultados de la prueba de FC' en perros adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino y vacunados contra distemper.**

No. de muestras	FC' 37°C	FC' 4°C
1	negativo	negativo
1	negativo	1:2
1	1:2	1:2
3	anticomplementario	anticomplementario

Total de muestras: 6.

## Discusión

Al analizar los resultados correspondientes a la producción de sueros hiperinmunes para el presente trabajo observamos que los conejos presentan títulos más altos que los perros. De éstos últimos solamente tres muestran resultados y el suero del cuarto animal presentó efecto anticomplementario. Es interesante resaltar esta característica, ya que es común en esta especie<sup>12,28,30,44,52</sup>, y su presencia se repitió en varios de los sueros problema trabajados. Más adelante se discutirá el efecto.

El hecho de haber obtenido resultados no adecuados en los sueros hiperinmunes de perro nos lleva a pensar que el antígeno utilizado no fue un buen inmunógeno. Sin embargo, esto no es así ya que los conejos presentaron títulos más elevados al inocularse con el mismo antígeno, lo cual indica que éste sí cumplió como inmunógeno.

Krakowka, et al (1975) reporta haber encontrado dos componentes en el antígeno viral de moquillo canino, el de la envoltura y el de la nucleocápside. La respuesta inmune frente a cada uno de éstos es diferente y permite una cierta distinción entre animales inmunizados y perros con infección persistente de distemper<sup>39</sup>. En la elaboración de los sueros hiperinmunes para el presente trabajo se utilizó antígeno viral de distemper íntegro, sin separar sus componentes. Es decir, no se separaron los determinantes antigénicos, así que los anticuerpos detectados no son distintivos de uno u otro. Este hecho influye en que los valores obtenidos en FC' para los sueros hiperinmunes sean bajos o negativos, ya que no hay especificidad antigénica.

En los resultados de FC' para los cachorros clínicamente sanos y sin vacuna contra distemper nos enfrentamos a una mayoría de sueros sin títulos de anticuerpos. Estos animales no presentan anticuerpos naturales por enfermedad ni anticuerpos vacunales. La única razón para que se presenten anticuerpos en el suero de estos cachorros es la transferencia de inmunidad de la madre. Varios autores mencionan que siempre existe una relación entre el nivel de anticuerpos

en el calostro y en el suero de la madre con los títulos séricos de las crías<sup>13,18,22,23,34,51,68</sup>. Sin embargo, no hay que olvidar los reportes de otros autores acerca de que la tasa de anticuerpos maternos disminuye al aumentar la edad de los cachorros y que este decremento varía entre camadas y entre individuos<sup>20,22,23,50,51,55,61,66,68</sup>. Por lo tanto, y guiándonos por Winters (1981), podemos pensar que las muestras se obtuvieron cuando la inmunidad materna se encontraba en niveles sumamente bajos por lo que no fue posible su detección<sup>68</sup>. Los animales que sí presentaron títulos, aunque bajos, todavía tenían anticuerpos antidistemper de origen materno en el suero. Cabe subrayar el hecho de que la mayoría de las muestras trabajadas (cincuenta y cinco de ciento veinte) corresponde a esta categoría. Esto se relaciona con la importancia de conocer el nivel de anticuerpos maternos en los cachorros para proceder a vacunarlos y asegurar la síntesis de anticuerpos en respuesta a la inoculación de antígeno vacunal<sup>11,13,18,22,23,60,61,66</sup>.

En el caso de los cachorros clínicamente sanos y vacunados contra distemper nos encontramos con resultados negativos para ocho sueros en la prueba de FC' a 37°C y a 4°C. Esto seguramente se debe a una interferencia de los anticuerpos maternos con la vacuna, posibilidad mencionada por varios autores<sup>13,18,20,22,34,61</sup>. Debido a la presencia de los anticuerpos maternos en el suero de los perritos, éstos no respondieron a la vacunación. Esto resalta la importancia de realizar pruebas serológicas para evaluar el estado inmunológico de los animales y asegurar el éxito de la inmunización.

Las otras dos muestras de este grupo presentaron efecto anticomplementario, factor que se discutirá más adelante.

En cuanto a los resultados correspondientes a los cachorros clínicamente sospechosos de moquillo canino y sin vacuna contra distemper tenemos una mayoría de muestras negativas para ambas variantes de la prueba de FC'. Solamente dos animales mostraron títulos en ambas temperaturas. La ausencia de anticuerpos detectables se debe a que no existen anticuerpos vacunales ya que estos perros no están inmunizados por vía artificial. Otra razón, referente al estado de salud de los animales, se refiere a la inmunodepresión a consecuencia de las

infecciones con virus de distemper. Algunos autores mencionan que las pruebas serológicas no siempre son útiles debido a la ausencia de respuesta inmunológica en los perros con infección de moquillo canino<sup>35,38,59,62,63,69</sup>. Los animales que sí presentaron títulos tal vez se encuentran en fase de recuperación, en la cual ya se pueden detectar anticuerpos en suero<sup>38,39,59</sup>.

A su vez, Garza (1965) menciona que en la prueba de FC' es común obtener títulos bajos y resultados negativos para moquillo canino, ya que los perros rara vez producen anticuerpos fijadores del complemento frente a la infección con virus de distemper<sup>28</sup>. En caso de que se sintetizan, desaparecerán entre la tercera y la décima semanas después de la infección<sup>7,28,29,30</sup>. Esta información se encuentra validada por los resultados del presente trabajo, pues los animales clínicamente sospechosos de enfermedad de Carré presentan títulos muy bajos o incluso negativos en la prueba de FC'.

Para los adultos clínicamente sanos y vacunados contra distemper tenemos resultados negativos y con títulos de 1:2 y 1:4. También tenemos sueros con efecto anticomplementario. La ausencia de anticuerpos detectables se relaciona con las observaciones de Garza (1965) de la falta de producción de anticuerpos antidistemper fijadores del complemento<sup>28</sup>. Los sueros con títulos de anticuerpos, aunque bajos, confirman que la vacunación protege a los animales frente a posibles infecciones pues los perros sintetizaron anticuerpos frente a la inmunización. Sin embargo, los resultados bajos indican que los anticuerpos producidos no son principalmente fijadores del complemento.

Hay autores que reportan que los anticuerpos fijadores del complemento, cuando se producen en respuesta a la vacunación, desaparecen entre la tercera y la décima semanas después de ésta<sup>7,28,30,52</sup>. Las muestras de animales vacunados se tomaron a diferentes tiempos después de la vacunación, por lo que es probable que no se encuentren títulos adecuados en ellos porque ya estaban en la fase de disminución.

En este mismo grupo de perros se encontró en mayor número de sueros con efecto anticomplementario. Éste se presenta indistintamente en cachorros y adultos, vacunados y sin

vacunar. Todas las muestras fueron sometidas a tratamiento para eliminar el fenómeno, pero éste permaneció en diecisiete de las ciento veinte trabajadas y en uno de los sueros hiperinmunes de perro. Varios autores reportan lo mismo y coinciden en que la prueba de FC' es poco utilizada para la evaluación de sueros de perros debido al efecto anticomplementario de éstos<sup>12,28,30,44,52</sup>.

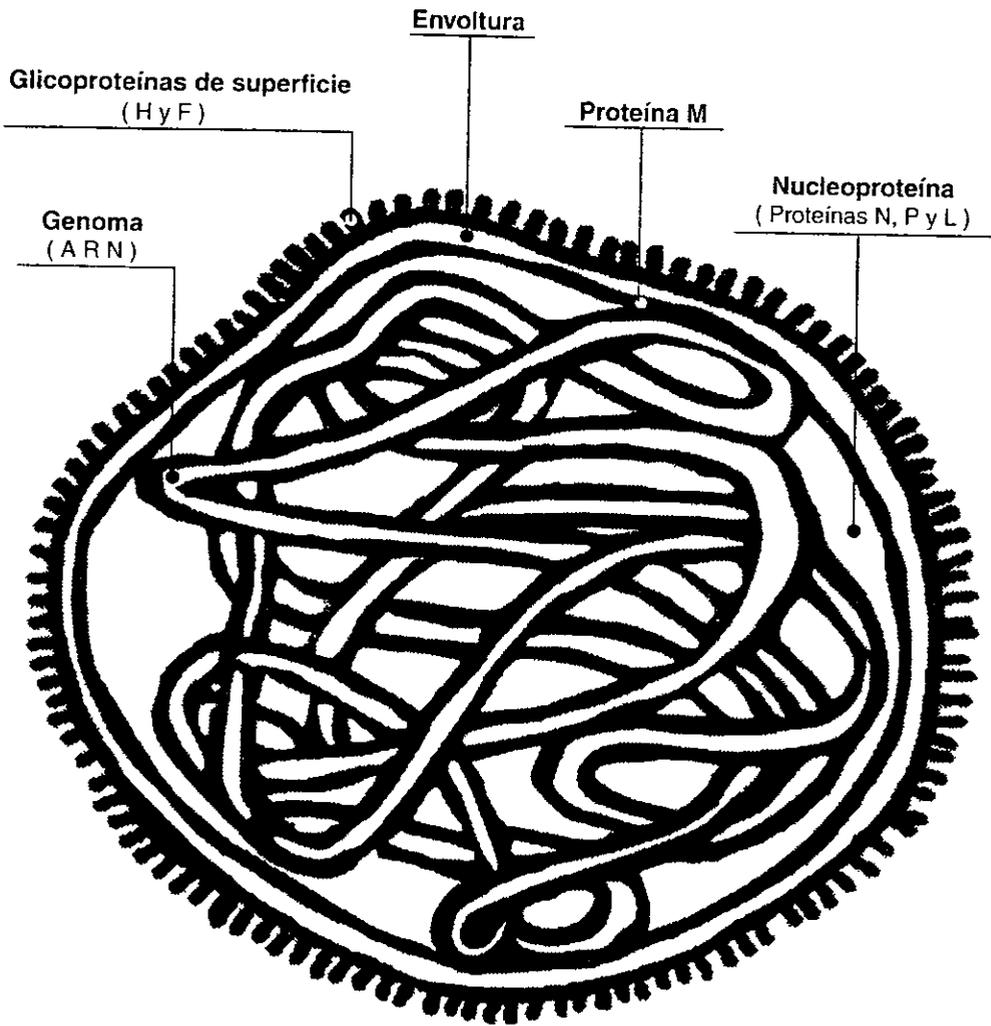
La temperatura influye en la presentación de este fenómeno. Los sueros obtenidos de muestras sanguíneas que permanecieron a temperatura ambiente mucho tiempo o que fueron expuestas a temperaturas elevadas presentan efecto anticomplementario<sup>28,30</sup>. Tal vez la presentación del efecto en los sueros problema se deba a un mal manejo de las muestras durante su traslado al laboratorio.

Cabe recordar que las muestras trabajadas proceden de animales tanto clínicamente sanos como sospechosos de moquillo canino, pero éstas no se sometieron a otras pruebas para descartar o confirmar el diagnóstico. Rice (1968) comenta que algunas enfermedades pueden alterar el balance natural entre las sustancias procomplementarias y anticomplementarias del suero<sup>52</sup>, así pues, cualquier complejo inmunitario presente en el suero se unirá al complemento. Los contaminantes bacterianos que pudieran estar presentes fijan al complemento por la vía alterna y el suero entonces se vuelve anticomplementario, tal vez como lo manifiesta Tizard (1995)<sup>61</sup>.

Los sueros de los perros adultos clínicamente sospechosos de moquillo canino, vacunados y sin vacunar contra distemper apoyan con sus resultados todo lo ya mencionado acerca de la ausencia de anticuerpos, a los títulos bajos en la prueba de FC' frente al antígeno de moquillo canino y al efecto anticomplementario. Para éstos no hay que olvidar que otro condicionante es el momento en el cual se tomaron las muestras. La mayoría se obtuvo cuando los perros se encontraban en la fase inicial de la enfermedad. Además, nos enfrentamos al hecho de que no se les confirmó el diagnóstico presuntivo de moquillo canino a todos los perros, así que no podemos asegurar que los anticuerpos presentes sean específicos frente al antígeno trabajado. En caso de que si existieran esos anticuerpos, seguramente serían del tipo IgM, ya que es la

inmunoglobulina que aumenta en la respuesta inmune primaria<sup>1,15,19,26,36,61</sup>. Vidal (1996) señala que la prueba de FC<sup>1</sup> detecta principalmente IgG<sup>65</sup>, así que necesitaríamos animales enfermos de forma crónica o ya recuperados para evaluar la prueba.

Figura 1: Esquema de un virus de la familia *Paramyxoviridae*, tomado de Fener (1993).



**Figura 2: CUESTIONARIO**

Muestra número: \_\_\_\_\_

**Datos del propietario:**

Nombre: \_\_\_\_\_ Teléfono: \_\_\_\_\_

Domicilio: \_\_\_\_\_

**Datos del animal:**

Raza: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Tipo de alimentación: Comercial: \_\_\_\_\_ Casera: \_\_\_\_\_

Vacunas: Moquillo \_\_\_\_\_ Hepatitis: \_\_\_\_\_ Leptospirosis: \_\_\_\_\_ Parvovirus: \_\_\_\_\_ Rabia: \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

Fecha de la última vacunación contra moquillo: \_\_\_\_\_

Desparasitaciones: Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ Fecha y producto: \_\_\_\_\_

Contacto con otros animales: Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_

**Para animales menores de seis meses:**

**Datos de la madre:**

Edad: \_\_\_\_\_ Número de parto: \_\_\_\_\_ Número de crías: \_\_\_\_\_

Vacunas: Moquillo \_\_\_\_\_ Hepatitis: \_\_\_\_\_ Leptospirosis: \_\_\_\_\_ Parvovirus: \_\_\_\_\_ Rabia: \_\_\_\_\_

Otras: \_\_\_\_\_

Fecha de la última vacunación contra moquillo: \_\_\_\_\_

**Figura 3: DATOS DEL EXAMEN FÍSICO**

**Muestra número:** \_\_\_\_\_

Frecuencia cardíaca: \_\_\_\_\_ Frecuencia respiratoria: \_\_\_\_\_ Temperatura: \_\_\_\_\_

Tiempo de llenado capilar: \_\_\_\_\_ Mucosas: \_\_\_\_\_ Ganglios: \_\_\_\_\_

Aspecto general del animal: \_\_\_\_\_

El animal está clínicamente sano: Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

El animal presenta signos clínicos de moquillo canino: Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

Cuáles: \_\_\_\_\_

Confirmación del diagnóstico de moquillo canino por inmunofluorescencia: Si: \_\_\_\_\_ No: \_\_\_\_\_

### Literatura citada

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S.: Cellular and Molecular Immunology. 2a edición. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
2. Ackerman, L.: Infectious Diseases and Vaccination. The Vaccine Controversy. Internet, 1997.
3. Acton, J.D., Kucera, L.S., Myrvik, Q.N., Weiser, R.S.: Virología. Nueva Editorial Interamericana, México, 1977.
4. Ada, G.L.: The Immunological Principles of Vaccination. The Lancet, 335: 523-526 (1990).
5. Anderson, E.C.: Morbillivirus Infections in Wildlife (In Relation to their Population Biology and Disease Control in Domestic Animals). Veterinary Microbiology, 44: 319-332 (1995).
6. Andrewes, C.H., Pereira, H.G.: Viruses of Vertebrates. 4a edición. Baillière Tindall, London, 1978.
7. Appel, M.J.G., Mendelson, S.G., Hall, W.W.: Macrophage Fc Receptors Control Infectivity and Neutralization of Canine Distemper Virus-Antibody Complexes. Journal of Virology, 51: 643-649 (1984).
8. Appel, M.J.G., Pearce-Kelling, S., Summers, B.A.: Dog Lymphocyte Cultures Facilitate the Isolation and Growth of Virulent Canine Distemper Virus. J. Vet. Diagn. Invest., 4: 258-263 (1992).
9. Appel, M.J.G., Shek, W.R., Summers, B.A.: Lymphocyte-Mediated Immune Cytotoxicity in Dogs Infected with Virulent Canine Distemper Virus. Infection and Immunity, 37: 592-600 (1982).
10. Baker, J.A.: Current Status of Distemper Immunization Procedures. J.A.V.M.A., 149: 686-698 (1966).
11. Baker, J.A., Robson, D.S., Gillespie, J.H., Burgher, J.A., Doughty, M.F.: A Nomograph that Predicts the Age to Vaccinate Puppies Against Distemper. The Cornell Veterinarian, XLIX: 158-167 (1959).

12. Barta, O., Barta, V.: Canine Hemolytic Complement: Optimal Conditions for its Titration. Am. J. Vet. Res., 34: 653-657 (1973).
13. Basurto A., F.J., Montaña H., J.A.: Criterios generales para la elaboración de calendarios de vacunación. En: Memorias - Enfermedades infecciosas y su prevención en perros y gatos. México, D.F., 1996, 67-76. División de Educación Continua. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - U.N.A.M., México (1996).
14. Berrón H., D.: Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* mediante la prueba de Fijación del Complemento en una población de felinos salvajes albergada en el Zoológico de Chapultepec. Tesis de licenciatura. Fac. De Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 1991.
15. Blixenkron-Moller, M., Pedersen, I.R., Appel, M.J., Griot, C.: Detection of IgM Antibodies Against Canine Distemper Virus in Dog and Mink Sera Employing Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). J. Vet. Diagn. Invest., 3: 3-9 (1991).
16. Blixenkron-Moller, M., Svansson, V., Have, P., Örvell, C., Appel, M., Pedersen, I.R., Dietz, H.H., Henriksen, P.: Studies on Manifestations of Canine Distemper Virus Infection in an Urban Dog Population. Veterinary Microbiology, 37: 163-173 (1993).
17. Büchen-Osmond, C., Dallwitz, M.J.: Morbillivirus. 6<sup>th</sup> ICTV Classification and Nomenclature of Viruses. Index Virum. Internet (1997).
18. Carmichael, L.E., Olin, J.M., Baker, J.A.: Immunization Strategies in Puppies - Why Failures? Compendium on Continuing Education, 5: 1043-1052 (1983).
19. Carter, G.R., Moojen, V.: A Summary of Serologic Tests Used to Detect Common Infectious Diseases of Animals. Veterinary Medicine / Small Animal Clinician, 76: 1725-1730 (1981).
20. Chalmers, W.S.K., Baxendale, W.: A Comparison of Canine Distemper Vaccine and Measles Vaccine for the Prevention of Canine Distemper in Young Puppies. Veterinary Record, 135: 349-353 (1994).

21. Chapek, M.L., Strauss, A., Marshall, R.F., McClaughry, L.E.: Duration of Immunity in Dogs Inoculated with an Inactivated Feline Parvovirus Vaccine. Veterinary Medicine / Small Animal Clinician, 76: 1319-1324 (1981).
22. Chappuis, G.: Control of Canine Distemper. Veterinary Microbiology, 44: 351-358 (1995).
23. Cornwell, H.J.C., Thompson, H.: Vaccination in the Dog. In Practice, 4: 151-158 (1982).
24. Diallo, A.: Morbillivirus Group: Genome Organisation and Proteins. Veterinary Microbiology, 23: 155-163 (1990).
25. Evermann, J.F.: Diagnóstico de laboratorio de infecciones virales y rickettsiales. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 225-230. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.
26. Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O.: Veterinary Virology. 2a edición. Academic Press, E.U.A., 1993.
27. Fix, A.S., Riordan, D.P., Hill, H.T., Gill, M.A., Evans, M.B.: Feline Panleukopenia Virus and Subsequent Canine Distemper Virus Infection in Two Snow Leopards (*Panthera uncia*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 20: 273-281 (1989).
28. Garza R., J.: Determinación de anticuerpos contra el virus de la Enfermedad de Carré por medio de la Prueba de Conglutinación. Tesis de licenciatura. Fac. De Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1965.
29. Gillespie, J.H.: The Significance of Passive Immunity and the Biological Tests Used in the Study of Distemper. J.A.V.M.A., 149: 623-632 (1966).
30. Gorham, J.R.: Canine Distemper (La Maladie de Carré). Advances in Veterinary Science, 6: 287-351 (1960).
31. Greene, C.E.: Apéndice 8. Pruebas de laboratorio para confirmar enfermedades infecciosas. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 935-946. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.

32. Greene, C.E.: Apéndice 9. Supervivencia ambiental de ciertos microorganismos y algunos biocidas efectivos. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 953-955. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.
33. Greene, C.E.: Inmunodeficiencia y enfermedades infecciosas. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 59-68. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.
34. Greene, C.E.: Inmunoprofilaxis e inmunoterapia. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 23-58. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.
35. Greene, C.E., Appel, M.J.: Moquillo canino. En: Enfermedades infecciosas. Perros y gatos. Editado por: Greene, C.E., 236-252. Interamericana McGraw-Hill, México, 1993.
36. Klaus, G.G.B.: Generation of Memory Cells. III. Antibody Class Requirements for the Generation of B-Memory Cells by Antigen-Antibody Complexes. Immunology, 37: 345-351 (1979).
37. Katz, S.L., Medearis, D.N., Enders, J.F.: Some Recent Advances in Varicella and Measles. En: Viral Infections of Infancy and Childhood. Editado por: Rose, H.M., 215-224. Hoeber-Harper, New York, 1960.
38. Krakowka, S., Higgins, R.J., Koestner, A.: Canine Distemper Virus: Review of Structural and Functional Modulations in Lymphoid Tissues. Am.J. Vet. Res., 41: 284-292 (1980).
39. Krakowka, S., Olsen, R., Confer, A., Koestner, A., McCullough, B.: Serologic Response to Canine Distemper Viral Antigens in Gnotobiotic Dogs Infected with Canine Distemper Virus. J. Infect. Dis., 132: 384-392 (1975).
40. Löffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D.O., Ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J.: CD9, a Tetraspan Transmembrane Protein, Renders Cells Susceptible to Canine Distemper Virus. Journal of Virology, 71: 42-49 (1997).
41. McLaughlin, B.G., Adams, P.S., Cornell, W.D., Elkins, A.D.: Canine Distemper Viral Inclusions in Blood Cells of Four Vaccinated Dogs. Can. Vet. J., 26: 368-372 (1985).

42. Méndez G., A.: Criterios para la selección de biológicos. En: Memorias - Enfermedades infecciosas y su prevención en perros y gatos. México, D.F., 1996, 77-80. División de Educación Continua. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - U.N.A.M., México (1996).
43. Mims, C.A.: New Insights into the Pathogenesis of Viral Infection. Veterinary Microbiology, **33**: 5-12 (1992).
44. Moguel P., A.: Utilización de las pruebas: Contrainmunolectroforesis, Fijación del Complemento, de Aglutinación Rápida en Placa, de Aglutinación Lenta en Tubo, y de Factor Inhibidor de la Migración de los Macrófagos, para detectar anticuerpos o células sensibilizadas contra *Brucella canis* en un grupo de perros sin dueño en el D.F. Tesis de licenciatura. Fac. De Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1984.
45. Noon, K.F., Rogul, M., Binn, L.N., Keefe, T.J., Marchwicki, R.-H., Appel, M.J.: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Evaluation of Antibody to Canine Distemper Virus. Am. J. Vet. Res., **41**: 605-609 (1980).
46. Norrby, E., Gollmar, Y.: Appearance and Persistence of Antibodies Against Different Components After Regular Measles Infection. Infection and immunity, **6**: 240-247 (1972).
47. Norrby, E., Gollmar, Y.: Identification of Measles Virus-Specific Hemolysis-Inhibiting Antibodies Separate from Hemagglutination-Inhibiting Antibodies. Infection and Immunity, **11**: 231-239 (1975).
48. Örvell, C., Norrby, E.: Immunological Relationships Between Homologous Structural Polypeptides of Measles and Canine Distemper Virus. J. Gen. Virol., **50**: 231-245 (1980).
49. Ott, R.L.: Introduction to the Symposium on Canine Distemper Immunization. J.A.V.M.A., **149**: 607-609 (1966).
50. Pollock, R.V.H., Carmichael, L.E.: Maternally Derived Immunity to Canine Parvovirus Infection: Transfer, Decline, and Interference with Vaccination. J.A.V.M.A., **180**: 37-42 (1982).

51. Povey, R.C.: Distemper Vaccination of Dogs: Factors Which Could Cause Vaccine Failure. Can. Vet. J., 27: 321-323 (1986).
52. Rice, C.E.: Comparative Serology of Domestic Animals. Advances in Veterinary Science, 12: 105-162 (1968).
53. Rima, B.K., Wishaupt, R.G.A., Welsh, M.J., Earle, J.A.P.: The Evolution of Morbilliviruses: A Comparison of Nucleocapsid Gene Sequences Including a Porpoise Morbillivirus. Veterinary Microbiology, 44: 127-134 (1995).
54. Salmi, A.A., Norby, E., Panelius, M.: Identification of Different Measles Virus-Specific Antibodies in the Serum and Cerebrospinal Fluid from Patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis and Multiple Sclerosis. Infection and Immunity, 6: 248-254 (1972).
55. Scott, F.W., Csiza, C.K., Gillespie, J.H.: Maternally Derived Immunity to Feline Panleukopenia. J.A.V.M.A., 156: 439-452 (1970).
56. Shell, L.G.: Canine Distemper. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 12: 173-179 (1990).
57. Stephensen, C.B., Welter, J., Thaker, S., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E.: Canine Distemper Virus (CDV) Infection of Ferrets as a Model for Testing *Morbillivirus* vaccine Strategies: NYVAC- and ALVAC-Based CDV Recombinants Protect Against Symptomatic Infection. Journal of Virology, 71: 1506-1513 (1997).
58. Stettler, M., Zurbriggen, A.: Nucleotide and Deduced Amino Acid Sequences of the Nucleocapsid Protein of the Virulent A75/17-CDV Strain of Canine Distemper Virus. Veterinary Microbiology, 44: 211-217 (1995).
59. Swango, L.J.: Enfermedades virales caninas. En: Tratado de medicina interna veterinaria. enfermedades del perro y el gato. 3a edición. Editado por: Ettinger, S.J., 319-333. Intermédica Editorial, México, 1992.
60. Symposium on Immunity to Selected Canine Infectious Diseases. J.A.V.M.A., 156: 175-182 (1970).

61. Tizard, I.: *Inmunología Veterinaria*. 4a edición. Interamericana McGraw-Hill, México, 1995.
62. Trautwein, G.: Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Viral Diseases: A Review. Veterinary Microbiology, **33**: 19-34 (1992).
63. Vandeveld, M., Zurbriggen, A.: The Neurobiology of Canine Distemper Virus Infection. Veterinary Microbiology, **44**: 271-280 (1995).
64. Van Moll, P., Aldinger, S., Baumgärtner, W., Adami, M.: Distemper in Wild Carnivores: An Epidemiological, Histological and Immunocytochemical Study. Veterinary Microbiology, **44**: 193-199 (1995).
65. Vidal H., E.: Detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en suero de wallabie de cuello rojo (*Macropus rufogriseus*) mediante la prueba de fijación de complemento directa. Tesis de licenciatura. Fac. De Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1996.
66. What You Should Know About: Distemper. American Veterinary Medical Association. Internet (1997).
67. Wild, T.F., Nanche, D., Rabourdin-Combe, C., Gerlier, D., Malvoisin, E., Lecouturier, V., Buckland, R.: Mode of Entry of Morbilliviruses. Veterinary Microbiology, **44**: 267-270 (1995).
68. Winters, W.D.: Time Dependent Decreases of Maternal Canine Virus Antibodies in Newborn Pups. Veterinary Record, **108**: 295-299 (1981).
69. Zinkernagel, R.M.: Virus-Induced Acquired Immune Suppression by Cytotoxic T Cell-Mediated Immunopathology. Veterinary Microbiology, **33**: 13-18 (1992).
70. Zurbriggen, A., Graber, H.U., Vandeveld, M.: Selective Spread and Reduced Virus Release Leads to Canine Distemper Virus Persistence in the Nervous System. Veterinary Microbiology, **44**: 281-288 (1995).