

Caracterización del virus del Distemper (moquillo canino) en cultivos celulares, aislado de animales clínicamente enfermos

Serafín Pérez Delgado*
Raymundo Iturbe Ramírez**
Emeterio Saldívar Zúñiga**

Resumen

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

Introducción

El Distemper (Moquillo Canino o Enfermedad de Carré) es una enfermedad producida por un paramixovirus del género morbillivirus. Esta enfermedad infecciosa afecta a cánidos (perros, lobos, coyotes), procióidos (mapaches) y mustélidos (hurones y visones).^{7,8,14,25,26} Los virus de la familia Paramixoviridae son pleomórficos, tienen ARN de una sola cadena y la

nucleocápside helicoidal con envoltura. Su diámetro es de 100 a 300 nanómetros. La réplica de estos virus tiene lugar en el citoplasma. Maduran por brote a través de la membrana celular.^{8,23,24}

El VDC relacionado antigénicamente con los de la Peste Bovina y Sarampión contiene una hemaglutinina, pero no neuroaminidasa. Es sensible a solventes de lípidos y estable a pH de 5 a 10; además, puede permanecer activo durante un mes - 10 C e indefinidamente a - 76 C o liofilizado.^{1,10,28}

El Distemper se diagnostica en todo el mundo, incluso México, donde se considera una enfermedad enzoótica que afecta sobre todo a perros jóvenes (una raza muy susceptible es el pastor alemán).^{10,11,12} El periodo de la incubación de la enfermedad es de 3 a 8 días. Los animales presentan fiebre difásica, descarga nasal y ocular, vómito, diarrea, disnea y a veces hiperqueratinización de los cojinetes plantares. Las manifestaciones nerviosas son hiperestasia, incoordinación, convulsiones, postración, parálisis y muerte.^{1,9,24}

La gravedad y extensión del daño en el sistema nervioso central, previa meningitis, marcará y definirá el curso del cuadro clínico. Los animales que sobreviven quedan infectados de por vida, actuando como portadores.^{8,10,27}

Otros agentes virales pueden provocar cuadros semejantes al Distemper; por ende, es necesario confirmar por pruebas de laboratorio el diagnóstico clínico del mismo.^{14,17,22} La biometría hemática puede establecer alteraciones en la población leucocitaria.^{20,22} El examen histológico del tejido nervioso revela satelitosis neuronal, neuronofagia, gliosis focal, infiltración linfocitaria perivascular, proliferación de astrocitos, formación de sincitios y, en ocasiones, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos e intranucleares.^{14,17,20,20,31,44} La técnica de IF, permite determinar la presencia del antígeno viral en tejido nervioso y epitelial principalmente.^{20,26,29} El aislamiento del virus es laborioso y no siempre se tiene éxito.^{22,44} Sin embargo, ninguna de las pruebas citadas permite, en caso de obtener un resultado positivo, establecer si el virus infectante es vacunal o de campo, ya que todavía no existe un marcador que los diferencie.^{3,4,9,13,14,15,18,21,23,33,37}

En trabajos recientes en los que se emplea la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida se muestra

Recibido para su publicación el 12 de septiembre de 1991

* Práctica privada, Calle Privada de Buena Vista No. 6, 16100, México, D.F.

** Departamento de Inmunología y Virología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

que hay diferencias en el patrón electroforético de las proteínas H y F; la primera puede hemoadsorber y la segunda provoca la fusión del virus con la célula huésped. Esto es muy importante, pues hay casos de moquillo en los que la evidencia sugiere que el virus vacunal causó el cuadro clínico observado.^{5, 6, 22, 23, 27, 28, 36} Probablemente, las diferencias en las proteínas H y F se asocian a la virulencia del virus, así como a su capacidad de producir efectos citopatogénicos, hemoadsorber y hemoaglutinar eritrocitos de diversas especies. Los virus de campo producirán efectos citopatogénicos en cultivos celulares y tendrán mayor capacidad hemoadsorbente y hemoaglutinante; los virus vacunales no producirán efectos citopatogénicos y tendrán menor capacidad hemoadsorbente y hemoaglutinante.

La finalidad de este trabajo fue evaluar la capacidad del virus del Distemper para:

- Diferenciar los virus de campo de una cepa vacunal.
- Hemoaglutinar glóbulos rojos de diferentes especies a distintos pH y concentraciones.
- Hemoadsorber glóbulos rojos de diferentes especies a través de cultivos celulares infectados con el VDC.

Material y métodos

Se utilizaron: muestras congeladas de tejido nervioso, provenientes de perros que murieron mostrando una sintomatología predominantemente nerviosa, positivos al virus del Distemper por IF, con cuerpos de inclusión al examen histológico y mantenidas a -70 °C; conjugado anti-VDC producido y elaborado según la técnica de Kawamura;^{21*} células de riñón de mono verde (VERO)⁸, crecidas en Medio Mínimo de Eagle (MEM)²² suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB) y antibióticos (100 UI de penicilina y 100 µg de estreptomycin por ml de medio). Virus vacunal del Distemper, empleado como testigo⁸ y cultivo de CRP, obtenido según el procedimiento descrito por Freshney,¹⁵ crecidas y mantenidas con MEM adicionado de SFB y antibióticos.

Preparación de las muestras. Las muestras provenientes de encéfalo fueron maceradas a una concentración del 10% peso/volumen (p/v) utilizando como diluyente una Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF) con pH de 7.2; posteriormente, se centrifugaron a 1,500 g durante 15 minutos. El sobrenadante de cada muestra se recuperó y a cada uno se le adicionó 0.2 ml de antibióticos; después de 20 minutos, a 4 °C, se aplicó 1 ml de cada inóculo a botellas de cultivo celular²³ de 25 cm² de área, que contenían células VERO. Se dio un tiempo de adsorción de 1 hora a 37 °C se retiró el sobrenadante, se lavó el monoestrato con 2 ml de MEM y se adicionaron 10 ml de MEM que contenía 2% de SFB. Las

botellas ya inoculadas se incubaron a 37 °C y se observaron al microscopio óptico invertido²⁴ a las 24, 48 y 72 horas.

Transcurridas 72 horas posinoculación, se congelaron y descongelaron las botellas por tres ocasiones, antes de efectuar un segundo pase a tubos de Leighton de 4 cm² de área²⁵ con cubreobjetos que contenían células VERO y CRP. Cada tubo se inoculó con 0.2 ml de sobrenadante obtenido de cada botella. Se dio un tiempo de adsorción de 1 hora a 37 °C, se retiró el inóculo y se adicionaron 2.5 ml de MEM con 2% de SFB. Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C durante 24, 48 y 72 horas. Luego, los tubos se lavaron con SAF, y se fijaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con solución de metanol absoluto. Se retiró el cubreobjetos conteniendo las células inoculadas y se sometió a la prueba de IF directa²⁶, según el procedimiento descrito por Kawamura.²¹ Otra parte se tiñó con colorante de hematoxilina y eosina de acuerdo a la técnica de Freshney.¹⁵ Una parte más se usó en la prueba de hemoadsorción previamente descrita por Lennette,²⁵ utilizando eritrocitos humanos tipo O positivo y de cuye, a una concentración de 0.5%. Con las células CRP se siguió simultáneamente y por separado el procedimiento, lo mismo para las células infectadas con el virus vacunal.

Para la prueba de hemoaglutinación se utilizó el procedimiento descrito por Lennette;²⁵ para ello se emplearon eritrocitos de ave, cerdo, equino, bovino, conejo, cuye y hombre, tipo O, en concentraciones de 0.5, 0.75 y 1% y pH de 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 y 8.

Resultados

- No se observó diferencia alguna entre el empleo de células VERO y CRP.
- En el examen histológico se determinaron los siguientes cambios: citomegalia, núcleos prominentes, sincitios, cuerpos de inclusión intracitoplasmáticos redondos y eosinofílicos, vacuolización, cromatina fina y granular en 76% de las muestras evaluadas (Cuadro 1).
- De las muestras trabajadas 82% (13) resultó positivo a la prueba de IF en cultivos celulares en las primeras horas posinoculación. La mayor intensidad específica se observó a las 48 horas (Cuadro 2).
- Diez muestras (59%) resultaron positivas a la prueba de hemoadsorción (Cuadro 3).
- Ninguna muestra, incluyendo los testigos, fue capaz de hemoaglutinar.

Discusión

El tejido nervioso del cual se tomaron los inóculos era de animales clínicamente enfermos, con un cuadro predominantemente nervioso y por último perecieron, lo cual, de acuerdo a la información disponible, sugiere que se trata de virus virulento.^{5, 25, 36} Estos virus debieron producir ECP. En el presente estudio, al inocular las

* Proporcionado por el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

** Proporcionado por el Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

*** GIBCO Laboratories, 5175 Stanley Road, Grand Island, New York 14072 a) Marca Costar; b) Marca Leitz Wetzlar y c) Marca Bellco.

²⁴ Fotomicroscopio Carl Zeiss modelo III de epifluorescencia.

Cuadro 1
RESULTADOS DE LA PRODUCCION DE EFECTOS
CITOPATICOS EN CULTIVOS CELULARES A LAS 24, 48 Y 72
HORAS POSINOCULACION

Identificación de las muestras	24 horas VERO/CRP	48 horas VERO/CRP	72 horas VERO/CRP
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	+	+	+
9	-	-	-
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	-	-	-
17	-	-	-
virus vacunal (testigo)	+	+	+

NOTA: - = ausencia de ECP, + = presencia de ECP

muestras, sólo el 76% los produjo. Metzler *et al.*³⁰ informan que en el primer pase a cultivos celulares, las probabilidades de réplica del VDC están restringidas y se incrementan para el segundo pase, de tal manera que se pueden observar ECP que desaparecen para el tercero. Así se podría explicar el 24% de muestras negativas obtenidas en este trabajo, en el que sólo se realizaron 2 pases.

Morikawa *et al.*³³ al trabajar con el VDC adaptado a células no neurales como las VERO, encontró que si se

Cuadro 2
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE INMUNOFUORESCENCIA
REALIZADA A LAS 24, 48 Y 72 HORAS

Identificación de las muestras	24 horas VERO/CRP	48 horas VERO/CRP	72 horas VERO/CRP
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	++	++
4	+	++	++
5	+	++	++
6	-	-	-
7	+	++	++
8	+	++	++
9	+	++	++
10	+	++	++
11	+	++	++
12	+	++	++
13	+	++	++
14	+	++	++
15	+	++	++
16	+	++	++
17	+	++	++
virus vacunal (testigo)	+	+	+

NOTA: - = reacción negativa ++ = máxima intensidad de fluorescencia
+ = reacción positiva

daba pase a células provenientes de la oligodendroglia, estos virus recuperaban su virulencia. En cambio, si los pases se efectuaban en células del neuroblastoma, la reversión de la virulencia era parcial; este evento indica que los virus provenientes de tejido nervioso pasados a células no neurales ven su réplica restringida y, por ende, disminuye la probabilidad de observar ECP. El origen renal de las células empleadas en este trabajo quizá permita explicar los resultados similares que se obtuvieron con ambas, aunque unas sean de tipo primario y otras de línea.

Otros autores mencionan que VDC aislados de perros que mostraron cuadros con sintomatología respiratoria o nerviosa, no produjeron ECP y reaccionaron a la prueba de IF; ello sugiere diferencias entre ellos, que pueden radicar en su virulencia, inmunogenicidad o ambas, y que se sospecha atañen inclusive a las cepas vacunales.^{2, 4, 9, 35} Este argumento encuentra bases más sólidas en el caso del virus de sarampión humano (estrechamente relacionado con el VDC), pues se publicó que cepas vacunales de sarampión, como la Beckman, revierten su virulencia^{9, 31, 36} la Edmonton, Chang 41 y Chang 12 conservan su inmunogenicidad hasta cierto número de pases,⁴² y la Schavay produce fiebre y eritema en la dosis que provoca seroconversión.⁴³

Cuadro 3
RESULTADOS DE LA PRUEBA DE HEMOADSORCION

Identificación de las muestras	24 horas VERO/CRP	48 horas VERO/CRP	72 horas VERO/CRP
1	+	+	+
2	-	-	-
3	+	+	+
4	+	+	+
5	-	-	-
6	-	-	-
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	-	-	-
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	-	-	-
15	+	+	+
16	-	-	-
17	-	-	-
virus vacunal (testigo)	+	+	+

Es difícil afirmar, con la información ahora disponible, que esto ocurra con las cepas vacunales del Distemper, mas la probabilidad no puede descartarse.

Las semejanzas entre los VDC y del sarampión son tales, que se puede emplear la vacuna del segundo para proteger contra el primero.⁴ Estudios cuantitativos y cualitativos de las proteínas de estos virus demuestran que poseen las mismas proteínas: F, N, NP, P y M, que sólo pueden presentar variaciones como resultado del proceso de adaptación a determinadas condiciones y cultivos celulares. Dichas variaciones se dan sobre todo en la proteína F que, paradójicamente, conserva una

parte de ella de manera constante. Esta proteína provoca la adherencia y fusión del VDC con la célula huésped, así como de la inducción de inmunoglobulinas capaces de neutralizar al virus *in vivo*.^{34, 35, 40} Esto cobra particular importancia si se considera que las pruebas de seroneutralización que se realizan *in vitro* determinan la presencia de inmunoglobulinas contra la proteína H (hemoaglutinante), que no brinda protección *in vivo*.^{32, 43} Por otra parte, cuando la proteína F se fracciona lentamente se trata de virus de baja virulencia y si se fracciona con rapidez se trata de virus virulentos.⁴¹ En este trabajo, los cambios observados a las 24, 48 y 72 horas, así como la severidad de ellos, no permitieron establecer diferencia alguna respecto al grado de virulencia de los virus estudiados.

Otra situación conocida que participa en el agravamiento del cuadro clínico es que el virus del Distemper, como el del sarampión, producen estados de inmunodeficiencia, pues se replica en tejido linfóide (células cooperadoras CD4, CD8 y macrófagos). Esto provoca además la liberación de factores inmunosupresores, como las prostaglandinas (PGE2) que suprimen la actividad de linfocitos T cooperadores, e inhiben la liberación de sustancias que estimulan a las células T como la interleucina 2, o incrementan la actividad de leucotrienos.^{30, 33, 38, 39} Tal información explica en parte porqué, a pesar de la vacunación, siempre hay casos fatales. La información disponible en el caso del sarampión dice que el 0.1% de cada mil casos es fatal.³⁹ A pesar de efectuar programas de vacunación, dichos casos se atribuyen a transmisión aérea, alta probabilidad de contacto, registros de vacunación inciertos y respuesta inmune inadecuada, por la temprana edad de vacunación o por el efecto inmunosupresor antes mencionado.^{39, 39}

Desafortunadamente, para el caso del Distemper no se encuentra información disponible al respecto, salvo que es una de las enfermedades caninas más diagnosticadas después de la rabia en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.^{11, 12} En otro estudio, se menciona que por cada caso de rabia confirmado por laboratorio, existen 1.27 casos de Distemper;¹⁹ no obstante, se desconoce el porcentaje de población canina vacunada, la frecuencia de la vacunación, así como las vacunas (cepas) utilizadas, por lo que con dificultad se obtiene conclusión alguna respecto al comportamiento de estos biológicos en la población canina de México.

En cuanto a los resultados obtenidos con la prueba de hemoaglutinación, no se observaron resultados positivos no obstante haber utilizado pH, tipos de sangre, concentraciones y temperaturas diferentes; se confirma así lo mencionado por otros autores, que informan que esta prueba no es constante y fiable como método de diagnóstico.^{5, 18} En la prueba de hemoagglutina 64% de las muestras resultó positivo; desafortunadamente, al no disponer de datos obtenidos por otros autores, es difícil hacer comparación alguna. Sin embargo, Bacsko,³ utilizando la prueba de electroforesis de poliácridamida, informa que la proteína H se determina ocasionalmen-

te, en comparación con la proteína N (nucleocápside) y la P (fosfoproteína), más constantes, lo cual puede explicar la inconsistencia de los resultados obtenidos con ambas pruebas.

Considerando los resultados obtenidos con este trabajo, así como la información disponible al respecto, se concluye que 41% de los virus estudiados se comportó como virulento al producir ECP, sin que sea posible establecer si el origen de estos virus es o no vacunal.

La presencia de cambios citopáticos en las muestras 1, 2 y 6 que resultaron posteriormente negativas a la prueba de inmunofluorescencia, permite pensar que dichos cambios pudieron ser ocasionados por:

- a) Virus del moquillo canino que no reaccionó antigénicamente con el conjugado empleado.
- b) Otros virus que producen lesiones similares.
- c) Toxicidad del medio para estas células en particular.
- d) Algún cambio físico (temperatura) o químico (toxicidad de las muestras inoculadas) que pudiera afectar células muy susceptibles.

Abstract

The behavior of Canine Distemper Virus (CDV), in primary cell culture and VERO line cell culture, was evaluated. Different brain isolates of CDV, obtained from dogs which had died with a neurologic signology, were used. Histopathological and immunofluorescence (IF) studies were performed. All brains showed inclusion bodies and were positive to the IF reaction. Each sample was inoculated in both VERO line cell culture and in the kidney dog primary cell one. The following parameters were evaluated: a) cytopathic effect production, b) reaction in the presence of anti-CDV fluorescent conjugate, c) haemoagglutination of red blood cells from different animal species and in different conditions and d) haemoagglutination to red blood cells. Results according to the parameters mentioned above were as follows: a) There were no differences when VERO line cells or primary cell culture were used. It was possible to observe the cytopathic effect in the infected cells and no effect in the non-infected cells, b) Antigenicity was not affected in 88% of the samples positive to IF (the greater intensity was observed at 48 hours post-inoculation, c) Only 58% of the samples showed haemoagglutination capacity and d) None of the samples showed haemoagglutination. There were no significant differences between the street viruses and the vaccine ones.

Literatura citada

1. Andrewes, C.: Viruses of Vertebrates. 4th ed. Baillière and Tindall, London, 1978.
2. Axtell, M., Krakowka, S. and Gorham, J.: Canine Distemper virus: *In vivo* virulence of *in vitro*-passaged persistent virus strains. *Am. J. vet. Res.*, 48: 227-233 (1987).
3. Bacsko, K.: Restriction of measles virus gene expression in measles inclusion body encephalitis. *J. Infect. Dis.*, 158: 144-150 (1988).

4. Belixenkrone, M.: Detection of intracellular canine Distemper virus antigen in mink inoculated with an attenuated or a virulent strain of canine Distemper virus. *Am. J. vet. Res.*, 50: 1616-1620 (1989).
5. Burge, T., Griot, C., Vandeveld, M. and Peterhans, E.: Antiviral antibodies stimulate production of reactive oxygen species in cultured canine brain cells infected with canine Distemper virus. *J. Virol.*, 63: 2790-2797 (1989).
6. Calain, P. and Roux, L.: Generation of measles virus defective interfering particles and their presence in a preparation of attenuated live virus vaccine. *J. Virol.*, 62: 2859-2866 (1988).
7. Carrigan, D.: Round cell variant of measles virus: Mechanisms involved in the establishment of defective viral infection of the central nervous system. *Virology*, 155: 614-624 (1986).
8. Chen, T., Goldbaum, M., Wassilak, F., Morkowitz, E. and Orestein, A.: An explosive point-source measles outbreak in highly vaccinated population. *Am. J. Epidemiol.*, 129: 173-182 (1989).
9. Cordy, O. and Holliday, A.: Necrotizing meningoencephalitis of Pug dogs. *Vet. Pathol.*, 26: 191-194 (1989).
10. Cornwell, H., Thomson, H., McCandlish, A., Macartney, L. and Nash, A.: Encephalitis in dogs associated with a batch of canine Distemper (Rockborn) vaccine. *Vet. Rec.*, 112: 54-59 (1988).
11. Departamento de Patología: Enfermedades diagnosticadas en el Departamento de Patología de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México, durante el año de 1974. *Vet. Méx.*, 7: 87-89 (1976).
12. Departamento de Patología: Enfermedades diagnosticadas en el Departamento de Patología de la Fac. de Med. Vet. y Zoot. de la Universidad Nacional Autónoma de México durante el año de 1976. *Vet. Méx.*, 10: 55-56 (1979).
13. Frankhauser, R. and Vandeveld, M.: Veterinary neurology past, present and future. *J. comp. Path.*, 98: 275-286 (1988).
14. Fenner, F., Bachmann, P., Murphy, F., Studdert, M. and Whit, D.: Veterinary Virology. *Academic Press*, Orlando, Florida, 1987.
15. Freshney, R.: Animal Cell Culture: A Practical Approach. *IRL*, Oxford, England, 1986.
16. Griot, C., Vandeveld, M. and Peterhans, E.: Antibody induced generation of reactive oxygen radicals by brain macrophages in canine Distemper encephalitis: A mechanism for bystander demyelination. *Acta Neuropath.*, 78: 306-405 (1980).
17. Groelke, J., Dixon, L., Cummings, C. and Baseman, J.: Virus contamination and cytopathology of Ferret tracheal epithelial cells in culture caused by vaccination with Distemper virus. *Lab. Anim. Sci.*, 35: 527-529 (1986).
18. Howe, C. and Lee, L.: Virus-erythrocyte interactions virus advances in research. Vol. XVII. *Academic Press*, New York, 1972.
19. Iturbe, R.R.: Diagnóstico de moquillo canino por inmunofluorescencia directa en perros diagnosticados clínicamente como rabiosos. *Vet. Méx.*, 20: 161-167 (1989).
20. Johnson, T., Griffin, E. and Moench, R.: Pathogenesis of measles immunodeficiency and encephalomyelitis: Parallels to AIDS. *Microb. Path.*, 4: 169-174 (1988).
21. Kawamura, A.: Fluorescent Antibody Technique and their Applications. 2nd ed. *University of Tokyo Press*, Tokyo, Japan, 1977.
22. Kimoto, T.: *In vitro* and *in vivo* properties of the virus causing natural canine Distemper encephalitis. *J. Gen. Virol.*, 67: 487-503 (1986).
23. Krakowka, S., Cork, L., Winkelstein, J. and Axtell, M.: Establishment of central nervous system infection by canine Distemper virus: Breach of blood brain barrier and facilitation by antiviral antibody. *Vet. Immun. Immunopath.*, 17: 471-482 (1987).
24. Kuchler, R.: Biochemical Methods in Cell Culture and Virology. *Dowden Hutchinson*, Ross, Pennsylvania, 1977.
25. Lennette, H.: Diagnostic Procedures for: Viral Rickettsial and Chlamydial Infections. 5th ed. *Am. Pub. Hlth. Ass.*, Washington, D.C., 1979.
26. McFarland, H. and Dhib, J.: Immune mechanism relating to viral infections of the nervous system. *Immun. Allergy Clin. North Am.*, 8: 225-238 (1988).
27. McFarland, F. and McFarlin, E.: Humoral and cellular immune responses to matrix protein of measles virus in subacute sclerosing panencephalitis. *J. Virol.*, 62: 2483-2489 (1988).
28. McLaughlin, B., Adams, P., Cornwell, W. and Elkins, D.: Canine Distemper viral inclusions in blood cells of four vaccinated dogs. *Can. vet. J.*, 26: 368-372 (1985).
29. Meric, S.: Canine meningitis. *J. vet. Internal. Med.*, 2: 26-35 (1988).
30. Metzler, E., Krakowka, S., Axtell, K. and Gorham, R.: *In vitro* propagation of canine Distemper virus: Establishment of persistent infection in VERO cells. *Am. J. vet. Res.*, 45: 2211-2214 (1984).
31. Mirchamsy, H., Shafiyi, A., Nazarin, P. and Sassani, A.: Evaluation of live attenuated measles vaccines prepared in human diploid cells for reimmunization. *Epidemiol. Inf.*, 101: 437-443 (1988).
32. Morikawa, Y., Yoshikawa, Y. and Yamanouchi, K.: Characterization of canine Distemper virus adapted to human neural cells. *Microbiol. Immunol.*, 32: 1211-1220 (1988).
33. Morikawa, Y., Yoshikawa, Y. and Yamanouchi, K.: Reversion of neurovirulence and *in vitro* phenotype of neural cell adapted canine Distemper virus after passage in non neural cells. *Microbiol. Immunol.*, 32: 1263-1268 (1988).
34. Morrison, T.: Structure, function and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. *Virus Res.*, 10: 113-136 (1988).
35. Olsen, G. and Krakowka, S.: Immunología e Inmunopatología de los Animales Domésticos. *El Manual Moderno*, México, D.F., 1983.
36. Porta Della, A.: Veterinary Viral Diseases: Their Significance in South-East Asia and Western Pacific. *Academic Press*, Orlando, Florida, 1985.
37. Povey, Ch.: Distemper vaccination of dogs: Factors which could cause vaccine failure. *Can. vet. J.*, 27: 321-323 (1986).
38. Rouse, T. and Horobov, W.: Immunosuppression in viral infections. *Rev. Infect. Dis.*, 8: 223-238 (1988).
39. Rude, T.: Canine Distemper virus: Infection and prevention. *Canine Pract.*, 14: 16-24 (1987).
40. Shen, D., Cox, N. and Swango, L.: Electrophoretic determination of albumin and gammaglobulin concentrations in the cerebrospinal fluid of dogs with encephalomyelitis attributable to canine Distemper virus infection: 15 cases. *J. Am. vet. med. Ass.*, 195: 977-980 (1989).
41. Sheshberadaran, H., Norby, E., Kennet, C., Carpenter, C. and Orvell, C.: The antigenic relationship between measles, canine Distemper and Rinderpest viruses studied with monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 67: 1381-1391 (1986).
42. Summers, B. and Appel, M.: Syncytia formation: An aid in the diagnosis of canine Distemper encephalomyelitis. *J. comp. Path.*, 95: 433-434 (1985).
43. Thomas, R., Diane, E. and Christine, R.: Acute measles in patients with and without neurological involvement: Distribution of measles virus antigen and RNA. *J. Infect. Dis.*, 158: 433-442 (1988).
44. Yoshikawa, K., Nomura, Y., Sugiyama, M. and Yamanouchi, K.: Natural infection with canine Distemper virus in Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Vet. Microbiol.*, 20: 193-204 (1989).