

86
26



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

ESTAMPADO
1988
NOV 20

TITULACION DE ANTICUERPOS DEL SUERO HIPER-
INMUNE CONTRA LA PARVOVIROSIS CANINA, PRO-
DUCIDO EN EL SERVICIO DE CIRUGIA EXPERIMEN-
TAL, SECCION BIOTERIO DEL H. R.
"20 DE NOVIEMBRE" I. S. S. S. T. E.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :
AMARO VENEGAS CASTILLON

DIRECTOR. MVZ. FERNANDO VINIEGRA RODRIGUEZ



1988

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E :

RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	5
OBJETIVO.....	16
HIPOTESIS.....	17
MATERIAL Y METODOS.....	18
RESULTADOS.....	25
DISCUSION.....	35
CONCLUSIONES.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	39

R E S U M E N

Se midió el nivel de anticuerpos en el suero de un lote de 9 caninos hiperinmunizados contra parvovirus canino, para probarlo en un programa de inmunización pasiva en hembras gestantes y en cachorros, en el Bioterio del Servicio de Cirugía Experimental de H. R. "20 de Noviembre", I.S.S.S.T.E.

Para la hiperinmunización se utilizó una vacuna de origen canino vivo y modificado, Laboratorio Litton de México.

A cada uno de los perros se les aplicó un total de 4 dosis a los 0, 14, 28 y 35 días respectivamente. La titulación de anticuerpos se llevó a cabo antes y después de cada vacunación, empleando para ello la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

Al finalizar la fase de hiperinmunización se obtuvieron sueros con títulos que van desde 1:5120 hasta 1:20480, observando que en 4 perros no hubo variación en el nivel de anticuerpos alcanzados entre la tercera y la cuarta dosis, mientras que en 5 de los casos si hubo un aumento. Con esto se concluye que es posible obtener sueros con un alto título de anticuerpos contra el parvovirus canino, después de aplicar varias dosis de la vacuna y que el suero puede ser probado en el programa de inmunización pasiva.

INTRODUCCION

La parvovirus canina, mejor conocida como Gastroenteritis Hemorrágica Parvoviral Canina; es una enfermedad altamente contagiosa caracterizada principalmente por vómito, diarrea sanguinolenta y de mal olor, deshidratación, en ocasiones miocarditis y muerte. Afecta a cánidos de todas las edades siendo más grave en cachorros menores de 6 meses.

Las primeras evidencias sobre esta enfermedad datan de 1977 (2,12,24); sin embargo, el verdadero interés surgió en 1978, cuando en los Estados Unidos se empezó a identificar el síndrome caracterizado por vómito y diarrea hemorrágica sanguinolenta, el cual tuvo una aparición súbita causando un fuerte impacto económico en criaderos de perros, debido a las elevadas tasas de morbilidad y mortalidad (2,12).

Los estudios que se realizaron sobre el padecimiento demostraron que el agente causal era un miembro de la familia Parvoviridae, también se demostró que la enfermedad estaba diseminada por prácticamente toda la Unión Americana, Canadá, Australia y varios países de Europa (3,8,12). En México se detectó la presencia de anticuerpos en sueros de perros de una colonia de Beagles perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias a fines de 1978 (12), pero fue hasta 1980, cuando se hicieron clínicamente aparentes los primeros brotes de esta enfermedad en perros de la República Mexicana (26).

Los miembros de la familia Parvoviridae son agentes isométricos, no poseen envoltura y contienen una cadena sencilla

de ácido desoxirribonucleico (DNA), cuyo peso molecular es de 1.5 a 2.2 x 10⁶ daltons; son virus resistentes al eter, al cloroformo, al calor y a los ácidos.

Transmisión y Patogénesis:

La vía natural de infección es la oral, a través de materia fecal de animales enfermos. El parvovirus canino posee una actividad linfocitotrópica por lo que al entrar al organismo tiende a invadir tejido linfoide, los sitios primarios de la replicación viral son los tejidos linfoides de la región bucofaringea y los ganglios mesentéricos, posteriormente la infección se generaliza a consecuencia de la fase de viremia, de esta manera el virus esta presente en practicamente todos los tejidos, incluyendo las células del epitelio intestinal (12, 19). Esto indica que aún cuando la enfermedad causada por parvovirus en los perros es principalmente de tipo entérico y a pesar de que la enfermedad ocurre por vía oral, el camino que sigue el virus para llegar a producir las lesiones en intestino es a través de la circulación sanguínea (12).

Cuadro Clínico:

Se conocen dos formas clínicas de infección por parvovirus; una entérica y una forma cardiaca. Ambas suelen seguir un curso fatal. Hay evidencias serológicas que sugieren la posibilidad de que en algunos perros la infección sea subclínica; en estos casos, los animales infectados representan un importante foco de infección (12).

Forma Entérica:

Se afectan perros de cualquier edad. Los principales signos clínicos son: depresión, anorexia, vómito, fiebre, diarrea de color grisáceo y frecuentemente hemorragia lo que propicia un cuadro de deshidratación severa (8,12,19,24,26).

Al realizar estudios hematológicos de los perros clínicamente afectados, es posible identificar cierto grado de leucopenia.

Forma Cardíaca:

Esta forma de infección por parvovirus se ha identificado en cachorros menores de 12 semanas de edad; sin embargo, puede darse el caso de que animales que sobrevivieron de un proceso de miocarditis de origen parvoviral, sufran de fallas cardíacas a la edad de 5 meses o mayores. Por lo general la miocarditis ocurre en ausencia de signos de enteritis, o bien puede aparecer de 3 a 6 semanas después de que los animales se han recuperado del cuadro entérico.

Los cachorros muestran postración y se quejan, al realizar la auscultación se pueden identificar arritmias cardíacas disnea e incluso, edema pulmonar. Es común encontrar al cachorro muerto sin que se haya manifestado signo alguno de enfermedad (12).

Diagnóstico Clínico:

Las manifestaciones clínicas de la infección por parvovirus por ser tan variables no siempre permiten establecer un diagnóstico confiable; por lo general el diagnóstico clínico

es de caracter presuntivo que permite iniciar una terapia de sostén, sin embargo existen numerosos procesos patológicos que pueden presentar un cuadro parecido al de la enteritis por parvovirus, por lo que se deben tener en cuenta para el diagnóstico diferencial.

Diagnóstico Diferencial:

La enteritis causada por coronavirus es una de las infecciones virales que más se asemeja a la parvovirosis; sin embargo, se considera que la primera tiene un curso menos severo, presentando porcentajes de mortalidad inferiores. En la mayoría de los casos los animales infectados con coronavirus se recuperan en 6 a 9 días aún sin tratamiento (12).

Es discutible la capacidad de los rotavirus de producir diarrea en perros, si bien hay informes de enteritis fatal se vera asociada con rotavirus en cachorros muy jóvenes, las lesiones en general son discretas (26).

La hepatitis viral canina en ocasiones produce cuadros clínicos similares a los encontrados en gastroenteritis por parvovirus, pero con mayor frecuencia produce también otros signos clínicos diferentes (26).

La infección de cachorros con el virus de moquillo canino frecuentemente se asocia con un cuadro entérico que se manifiesta por diarrea; sin embargo, suele incluir además signos de problemas respiratorios y nerviosos que permiten la diferenciación con otras formas de enteritis viral (12,26).

Las enteritis de origen parasitario deben ser considera-

das en el diagnóstico diferencial, especialmente en cachorros jóvenes; la coccidiosis y la presencia de Ancylostoma spp., suelen producir enteritis severas. Otros nemátodos podrían también ocasionar cuadros parecidos a la parvovirus. En ocasiones los cachorros pueden padecer simultáneamente enteritis por parvovirus y una parasitosis intestinal.

Diagnóstico de Laboratorio:

Son numerosos los métodos utilizados en el laboratorio para establecer el diagnóstico de parvovirus canino: Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación (HA-HI).

El parvovirus canino es capaz de aglutinar a los glóbulos rojos de cerdo, por lo que al hacer suspensiones de materia fecal y posteriormente diluciones de ésta, mezclada con eritrocitos de cerdo, es posible establecer el título hemaglutinante de la muestra. Luego se intenta inhibir la reacción repitiendo la prueba pero añadiendo suero anti-parvovirus canino; los resultados positivos a la HI indican la presencia de parvovirus en las heces examinadas. Esta prueba es de utilidad durante la fase activa de eliminación del parvovirus en heces, lo que ocurre durante las 2 semanas siguientes a la infección (8).

La prueba de Inhibición de la Hemaglutinación puede emplearse también para identificar la presencia de anticuerpos en el suero de perros, utilizando un parvovirus conocido y glóbulos rojos de cerdo. El título del suero será la mayor dilución del mismo, capaz de bloquear la aglutinación de los

eritrocitos porcinos, por parte del parvovirus (8).

Neutralización con Suero:

Los resultados que ofrece esta prueba son equiparables a la HA-HI, sin embargo requiere una mayor infraestructura para su realización puesto que se utilizan cultivos celulares, además de que necesita varios días (8).

Prueba de Anticuerpos Fluorescentes:

Este procedimiento es utilizado en muchos laboratorios para determinar la posible presencia de partículas virales en tejidos de animales, o bien para establecer si existen anticuerpos específicos en el suero de un animal sospechoso. En este caso, una laminilla preparada con tejido infectado es bañada con suero problema; después de incubar y lavar la preparación ésta es teñida con anticuerpos fluorescentes específicos contra inmunoglobulinas de perro. La persistencia del conjugado fluorescente en la preparación es indicio de la presencia de anticuerpos específicos contra parvovirus en el suero examinado (4,12).

Aislamiento Viral:

El diagnóstico definitivo de parvovirus se puede lograr mediante el aislamiento del microorganismo, utilizando para ello varias líneas celulares e incluso cultivos primarios de células de diferentes tejidos. El virus se puede aislar a partir de heces de perros infectados, durante las dos semanas siguientes a la infección. Este método de diagnóstico es el más preciso, pero resulta costoso y delicado, por lo

que no se emplea rutinariamente (12).

Microscopía Electrónica:

La observación de suspensiones de materia fecal preparadas para examen mediante microscopía electrónica permiten identificar las partículas de virus cuando éstas están siendo eliminadas en heces. Con este método es posible diferenciar con facilidad entre parvovirus, coronavirus y rotavirus (8, 12).

Tratamiento:

El tratamiento se recomienda como medida auxiliar para contrarrestar los efectos de la deshidratación y evitar la aparición de infecciones secundarias causadas por bacterias. Tan pronto como se identifica el problema es necesario iniciar una terapia a base de líquidos. La diarrea puede tener como consecuencia un cuadro de acidosis metabólica, por lo que es recomendable añadir bicarbonato de sodio y cloruro de potasio a las soluciones que se administren, para mantener el equilibrio electrolítico. Los productos recomendados incluyen: la solución de Ringer con lactato de sodio y la solución de Hartman por vía intravenosa, además antieméticos, protectores de la mucosa intestinal a base de caolín, pectina y emulsiones de hidróxido de aluminio. antibióticos como la ampicilina o bien gentamicina y cefalosporinas (4,12).

La forma cardíaca de la enfermedad suele ocurrir de manera súbita, por lo que no hay oportunidad de aplicar alguna terapia.

La emergencia de la parvovirus canina creó una necesidad urgente de producir una vacuna que pudiera prevenir la enfermedad (9). Los primeros estudios serológicos demostraron una gran relación antigénica entre el nuevo parvovirus canino y el virus de la panleucopenia felina (23,24,25), por lo que fueron las vacunas contra esta última enfermedad las primeras en utilizarse en los perros (9,20,23). En la actualidad, existen cuatro tipos diferentes de vacunas; vacunas de virus vivo modificado e inactivado de panleucopenia felina (2,6,20) y vacunas de parvovirus de origen canino modificado e inactivado (6,7,9).

Los Anticuerpos Maternos y su Interferencia con la Vacunación:

Diversos estudios sobre la eficacia de las vacunas existentes indican que el principal problema es la interferencia de los anticuerpos maternos, cuando no han disminuido suficientemente impidiendo una respuesta inmune satisfactoria (5,7,9,20).

Algunos autores reportan que los anticuerpos derivados de la madre pueden ser detectados a bajos títulos en los cachorros a las once semanas (13); trece semanas (5); dieciseis semanas (16); e incluso, hasta las dieciocho semanas (7).

Existen evidencias en el sentido de que al haber títulos de anticuerpos maternos inferiores a 1:80, en la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI), los cachorros pueden sufrir una infección natural por parvovirus. En esta fase, cuando los anticuerpos maternos son insuficientes para preve-

nir la infección, los cachorros entran e lo que se denomina "período crítico", puesto que la presencia de anticuerpos maternos, si bien no protegen contra la enfermedad, si son capaces de bloquear la inmunización activa que se pretende lograr mediante la vacunación (7,9,12,13,16). Este período, en muchos casos, coincide con la edad de mayor susceptibilidad a la enfermedad: entre las seis y once semanas de edad (13).

Lo anterior ha llevado a algunos investigadores a producir suero hiperinmune contra la parvovirus para usarlo como profiláctico o como parte del tratamiento.

Para llevar a cabo la inmunidad pasiva es preciso producir anticuerpos en un animal donador mediante inmunización activa (10,27), procedimiento conocido como hiperinmunización (17); luego, los anticuerpos parcialmente purificados se aplican a los animales a los cuales se les quiere conferir una protección inmediata (10,27). La protección que confiere este tipo de inmunidad es de corta duración (19,17,27).

Oliver y Noble (1982). Ante la imposibilidad de poner la vacuna por la interferencia de los anticuerpos maternos cuando éstos están presentes pero no son suficientes para proteger contra un ataque natural de virus, decidieron prolongar la inmunidad pasiva derivada de la madre -en un criadero donde la enfermedad era enzoótica- mediante la administración de suero inmune, con títulos 1:4000 y 1:2000 medidos por la prueba de HI, obtenido de dos donadores del mismo criadero, logran

do controlar la enfermedad (21).

Haesebrouck, et.al. (1983). Inocularon el parvovirus virulento con adyuvantes de Freund en perros vacunados o que se habían recuperado de la infección natural, obteniendo así suero con títulos HI. 1:2560; luego inyectó 2 ml. por Kg. de peso vivo (p.v.) en cachorros a las 5 semanas de edad, y en algunos casos, nuevamente a las 7 y 9 semanas. Una semana después infectó a los cachorros con virus virulento y notaron que la enfermedad fue menos severa en los animales inoculados con el suero, en comparación con los no protegidos (14);

Ishibashi, et.al. (1983). Obtuvieron suero inmune con títulos HI. 1:8192 y lo utilizaron en el tratamiento de perros infectados con parvovirus, en forma natural y experimentalmente, encontraron que los perros tratados con el suero tuvieron signos menos severos y se recuperaron de la enfermedad, mientras que en los no tratados los signos fueron más marcados y la mayoría de ellos murió (18);

Haesebrouck, et.al. (1985). Nuevamente realizaron una prueba de campo, inyectando 49 cachorros con suero inmune a las 6 y 11 semanas de edad y repitiendo a los 7 y 14 días después. La proporción de cachorros que murió por parvovirus no fue diferente de los cachorros no tratados (37% contra 41%) (15);

Maunier, et. al. (1985). En un estudio sobre la patogénesis del parvovirus canino, aplicaron suero inmune con título HI. 1:10240 en perros que un día antes habían sido inocula-

dos por vía oral con el virus virulento. Al hacer la necropsia, encontraron que la distribución del virus fue menor, que no hubo leucopenia ni signos clínicos y que las lesiones fueron menos severas en los perros tratados con el suero; incluso, no hubo cambios en el contenido intestinal (18).

OBJETIVO:

Conocer el título de Anticuerpos del suero hiperinmune contra la parvovirus canina producido en un lote de perros en el Bioterio del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Regional "20 de Noviembre", I.S.S.S.T.E., por medio de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación. El suero será utilizado en un programa de inmunización pasiva en hembras gestantes y en cachorros de la misma institución, partiendo de la hipótesis de que se espera encontrar en él un alto nivel de anticuerpos contra parvovirus canino.

HIPOTESIS:

Se espera que el título de anticuerpos contra parvovirus canino sea alto en el suero de los perros después de la aplicación de varias dosis de vacuna.

MATERIAL Y METODOS

El presente es un estudio de tipo observacional, prospectivo, longitudinal y descriptivo, que se llevó a cabo en 2 fases: La primera, denominada fase de hiperinmunización, consistió en la aplicación de dosis repetidas de vacuna virus vivo modificado de parvovirus canino, en un lote de 10 cáñidos, para la producción de suero hiperinmune. Se realizó en el Bacterio del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Regional "20 de Noviembre", I.S.S.S.T.E. Se utilizaron 10 perros porque se consideró que serían suficientes, ya que a partir de este momento su función será la de servir únicamente como animales donadores de suero y permanecerán por lo menos un año sin ser sometidos a otro tipo de estudio. Durante este tiempo los perros estarán alojados en una jaula colectiva de 4 x 4 mts. con asoleadero, cobertizo, comedero y bebedero colectivo, su alimentación será a base de carne y alimento comercial balanceado.

La segunda fase fue la titulación de anticuerpos en el suero empleando la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación efectuándose en el laboratorio No. 1, pabellón No. 11, Área de Inmunología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (I.N.E.R.), S.S.

Fase de Hiperinmunización:

Se escogieron 10 perros criollos -machos y hembras de talla media- de buena consistencia física, entre 6 meses y 3 años de edad, clínicamente sanos, previamente vacunados contra parvovirus o sospechosos de tener anticuerpos contra la enfer

medad. Los animales fueron bañados, desparasitados, identifi
cándose con números del 1 al 10; posteriormente se les tomó
una muestra de sangre y se colocaron como lote único, en una
jaula colectiva.

Los perros identificados con los números del 2 al 10 re-
cibieron un total de 4 dosis de vacuna cada uno, por vía sub-
cutanea, en un período de 5 semanas. La vacuna utilizada fue
la de parvovirus de origen canino, cepa L-85 vivo y modifica-
do en cultivos celulares. Laboratorio Litton de México, S.A.
de C.V. Esta cepa fue aislada en México en 1979, a partir de
heces de perros beagle que formaban parte de una colonia per-
teneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias
(I.N.I.P.). Estos animales no mostraban signos clínicos de
gastroenteritis parvoviral, pero tenían títulos elevados de
anticuerpos en la prueba de HI. en el suero. La cepa fue a-
tenuada después de ser sometida a 85 pases (lo que le da deno-
minación de cepa L - 85) en cultivos celulares, utilizando mo
noestrato de células de pulmón de mink. Las características
de antigenicidad, inmunogenicidad y estabilidad de esta cepa
fueron investigadas en el Instituto James A. Baker, de la U-
niversidad de Cornell, en Nueva York. Para esto utilizaron
perros beagles libres de patógenos específicos (SPF), los cua-
les fueron sometidos a pruebas de potencia mediante desafíos
experimentales.

El esquema de hiperinmunización fue como sigue:

Primera dosis: Al iniciar el programa.

Segunda dosis: 14 días después de la primera.

Tercera dosis: 14 días después de la segunda; esto es,
28 días después de la primera dosis.

Cuarta dosis: 7 días después de la tercera; es decir
35 días después de la primera dosis.

El perro número 1 se mantuvo como testigo, sin vacunar para detectar cualquier exposición accidental al virus.

Se obtuvieron muestras de sangre de los perros, en forma periódica durante el programa de hiperinmunización, para medir los anticuerpos alcanzados en el suero:

Primera muestra.- Un día antes de la primera inoculación de la vacuna.

Segunda muestra.- 7 días después de la primera dosis.

Tercera muestra.- 7 días después de la segunda dosis; esto es, 21 días después de la primera.

Cuarta muestra.- 14 días después de la segunda dosis y un día antes de la tercera.

Quinta muestra.- 7 días después de la tercera dosis; es decir, 35 días después de la primera.

Sexta muestra.- 7 días después de la cuarta inoculación.

Séptima muestra.- 14 días después de la cuarta vacuna.

En todos los casos, se obtuvieron 5 ml. de sangre de la vena cefálica o de la vena safena, dejándose reposar durante una hora y centrifugando después a 2000 rpm., durante 15 mi-

nutos, para separar el suero y congelarlo en alícuotas hasta el momento de su uso.

Fase de la titulación de anticuerpos en el suero, por medio de la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación. (HI)

Material:

- a) Suero problema procedente de los perros hiperinmunizados.
 - b) Suero testigo negativo.- Suero fetal bovino.
 - c) Suero testigo positivo.- Suero canino previamente titulado.
 - d) Antígeno.- El mismo antígeno vacunal fue utilizado (parvovirus de origen canino, cepa L-85 vivo y modificado en cultivos celulares, Laboratorio Litton de México, S.A. de C.V.
 - e) PBS (Na_2HPO_4 0.015 M, NaCl 0.9%, pH.7)
 - f) Albúmina sérica bovina, fracción V.
 - g) Glóbulos rojos de cerdo.
 - h) Solución Alsever's:
 - Dextrosa 2.05 gramos.
 - Citrato de sodio 0.80 gramos.
 - Cloruro de Sodio 0.42 gramos.
 - Agua destilada 100 ml.
- Ajustada a pH. 6.1 con 10% de Acido Cítrico, esterilizándose en autoclave a 10 libras de presión por 15 minutos y adicionando un antibiótico como aureomicina, a 5 mg. por 100 ml.

- l) Centrífuga.
- j) Potenciómetro.
- k) Microplacas de 96 pozos, fondo "U"
- l) Pipetas.
- m) Tubos de ensayo.
- n) Refrigerador.

Obtención y preparación de glóbulos rojos de cerdo:

Se tomaron muestras de sangre de cerdos clínicamente sanos en el Rastro Municipal de Ecatepec -Estado de México- y se colocaron en proporción 1:1 en solución Alsever's, conservándose en refrigeración.

Para la preparación de eritrocitos, se lavaron con PBS pH. 7 en tres tiempos, centrifugando a 2000 rpm. durante 10 minutos en cada ocasión para -posteriormente- preparar una suspensión de eritrocitos al 1% y otra al 50% en PBS, conteniendo 0.1% de albúmina sérica bovina (PBS "A").

Titulación del Antígeno por Hemaglutinación en Placas:

- 1.- Se ponen 0.05 ml. de PBS "A" en los pozos de la placa, numerados de 1 al 12.
- 2.- En el pozo 2, se colocan 0.05 ml. del antígeno que se quiere titular.
- 3.- Se realizan diluciones dobles, con 0.05 ml. partiendo del pozo 2; dilución 1:2. El primer pozo queda como control negativo.
- 4.- Se agregan 0.05 ml. de la suspensión de eritrocitos de cerdo al 1% a todos los pozos, se mezclan y se in

cuban a 2-4 grados centígrados.

- 5.- La lectura se realiza cuando se haya formado el botón de sedimentación en el pozo utilizado como control negativo, lo que normalmente ocurre entre 2 y 4 horas.

En todos los casos, el título obtenido en la vacuna fue de 1:32, considerada como la dosis mínima aglutinante, por lo que las cuatro unidades hemoaglutinantes (UHA) se obtuvieron diluyendo el virus 1:8.

El virus estandarizado a 4 UHA., quedó listo para su utilización en la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.

Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación en placa:

- 1.- Se preparan diluciones 1:10 de los sueros problema y se inactivan a 56° C por media hora.
- 2.- A cada dilución de suero se le adiciona 0.1 ml. de una suspensión de eritrocitos de cerdo al 50% y se dejan reposar 2 horas, a temperatura ambiente o bien toda la noche a 4°C.
- 3.- Los eritrocitos son removidos, centrifugando los sueros a 1500 rpm., durante 15 minutos.
De esta manera, el suero a una dilución inicial de 1:10 queda listo para la prueba de anticuerpos contra parvovirus.
- 4.- De cada suero problema se realizan diluciones dobles partiendo de la dilución 1:10, incluyendo un pozo que contenga PBS y suero, sin antígeno.

- se ponen 0.025 ml. de PBS "A" en los pozos 1, 3 al 12.
- Se adicionan 0.025 ml. del suero problema en el pozo 1.
- Se ponen 0.05 ml. del mismo suero problema en el pozo 2.
- Se realizan diluciones dobles con 0.025 ml. del pozo 2 al 12.
- Se adicionan 0.025 ml. del antígeno ya titulado y que contiene 4-8 UHA del pozo 2 al 12, incubándose después una hora a temperatura ambiente para permitir una reacción antígeno anticuerpo.
- Posteriormente, se adicionan 0.05 ml. de la suspensión de eritrocitos de cerdo al 1% a todos los pozos, se mezclan y se incuban a 4° C de 2 a 6 horas.

La lectura se realiza cuando se haya formado el botón de sedimentación en los pozos que quedaron como testigos negativos.

El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación de cada suero fue la dilución más alta que consiguió inhibir completamente la hemaglutinación, considerando negativo la presencia de la misma.

En cada prueba se incorpora un suero testigo positivo y otro negativo.

Los resultados se expresan en cuadros y gráficas.

RESULTADOS

El título hemaglutinante obtenido en la vacuna fue de 1:32, lo que se considera como la dosis mínima aglutinante, por lo que para estandarizarlo a 4 unidad hemaglutinantes (UHA), se diluyó la vacuna 1:8 (cuadro No. 1).

En el cuadro No. 2, se representa el nivel de anticuerpos HI. contra parvovirus canino en el suero de cada uno de los perros hiperinmunizados, indicando el momento en que se tomaron las muestras de sangre.

La media aritmética del comportamiento de los títulos de anticuerpos que se desarrollaron en los perros hiperinmunizados muestra una ligera disminución en el nivel de anticuerpos presentes después de haber aplicado la primera dosis, en relación con los anticuerpos detectados antes de iniciar el programa, pero luego hay una clara recuperación. Este fenómeno probablemente se debe al hecho de que al aplicar la vacuna en animales con anticuerpos ya presentes, hay una caída inicial de los títulos producto de la reacción que ocurre entre el virus y los anticuerpos circulantes y después se disparan (cuadro No. 2, gráfica No. 1).

El perro No. 1 permaneció sin vacunar, el nivel de anticuerpos no tuvo variación durante las primeras seis semanas (quinta muestra); sin embargo, después se observa un aumento de una dilución en la séptima semana (sexta muestra). Este ligero aumento registrado pudo deberse a la sensibilidad mínima de la prueba, aunque existe la posibilidad de que los perros vacunados eliminaran el virus vacunal en las heces que-

dando expuesto de esta manera el perro testigo, ya que siempre permanecieron juntos (cuadro No. 3, gráfica No. 2).

El nivel de anticuerpos encontrados en los perros 2,4,8, 9 y 10, está por abajo de la media aritmética, sin embargo, en la mayoría de ellos hubo tendencia al aumento en el título después de cada vacuna, solo los perros 8 y 10, registraron el nivel de anticuerpos más bajo en relación con los demás, probablemente se debe al hecho de que ya habían alcanzado el pico máximo puesto que tenían antecedentes de haber sido vacunados dos veces antes de entrar en este programa, además de que se trata de los perros más jóvenes, aproximadamente seis meses. Los perros 3, 5, 6 y 7, tuvieron buena respuesta a la vacuna y desarrollaron un alto título de anticuerpos (gráficas Nos. 2, 4 y 5).

CUADRO No. 1

INTERPRETACION DE LA REACCION DE HEMAGLUTINACION
DEL VIRUS VACUNAL

DILUCION	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	TESTIGO
REACCION DE HA	●	●	●	●	●	⊙	⊙
INTERPRETACION	+	+	+	+	+	-	-
UHA EN VACUNA	16	8	4	2	1	0	0

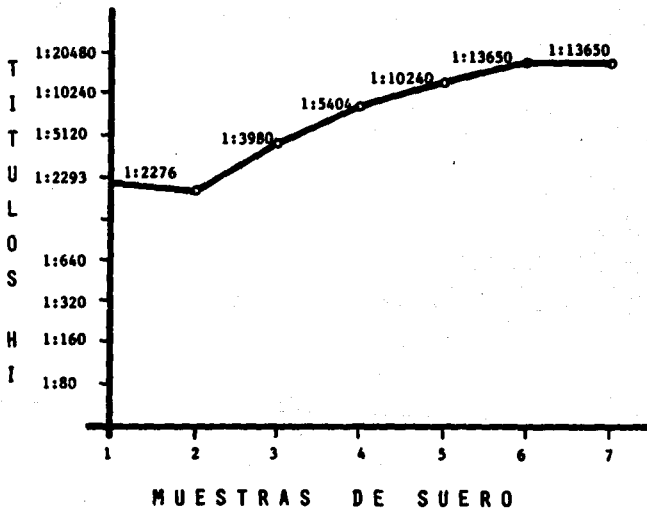
CUADRO No. 2
NIVEL DE ANTICUERPOS HI. EN EL SUERO DE LOS PERROS VACUNADOS

Número de Muestra	1	2	3	4	5	6	7
CANIDOS	1 DIA ANTES DE LA 1a. DOSIS	7 DIAS DESPUES DE LA 1a. DOSIS	14 DIAS DESPUES DE LA 2a. DOSIS.	14 DIAS DESPUES DE LA 2a. DOSIS	7 DIAS DESPUES DE LA 3a. DOSIS	7 DIAS DESPUES DE LA 4a. DOSIS.	14 DIAS DESPUES DE LA 4a. DOSIS.
No. 2	1:1280	1:640	1:2560	1:5120	1:10240	1:10240	1:10240
No. 3	1:2560	1:2560	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480
No. 4	1:160	1:1280	1:1280	1:2560	1:10240	1:10240	1:10240
No. 5	1:2560	1:1280	1:1280	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480
No. 6	1:2560	1:5120	1:10240	1:10240	1:20480	1:20480	1:20480
No. 7	1:5120	1:2560	1:5120	1:5120	1:10240	1:20480	1:20480
No. 8	1:2560	1:640	1:1280	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120
No. 9	1:1280	1:1280	1:2560	1:5120	1:5120	1:10240	1:10240
No. 10	1:2560	1:5120	1:1280	1:2560	1:2560	1:5120	1:5120
\bar{x}	1:2293	1:2276	1:3980	1:5404	1:10240	1:13650	1:13650

\bar{x} = MEDIA ARITMETICA.

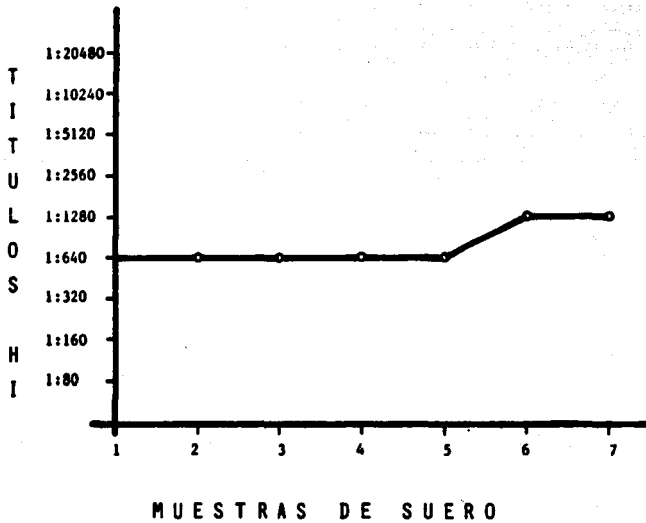
GRÁFICA No. 1

MEDIA ARITMETICA DEL COMPORTAMIENTO DE LOS
TITULOS DE ANTICUERPOS DESARROLLADOS EN LOS
PERROS HIPERINMUNIZADOS



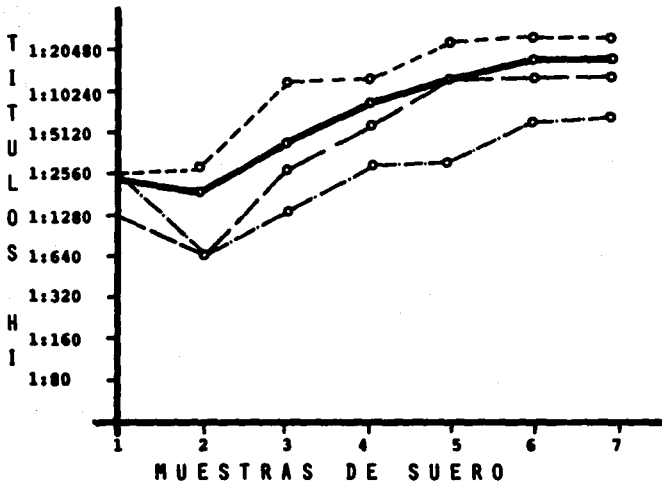
GRÁFICA No. 2

CURVA DE COMPORTAMIENTO DE LOS TITULOS DE
ANTICUERPOS EN EL PERRO TESTIGO



GRÁFICA No. 3

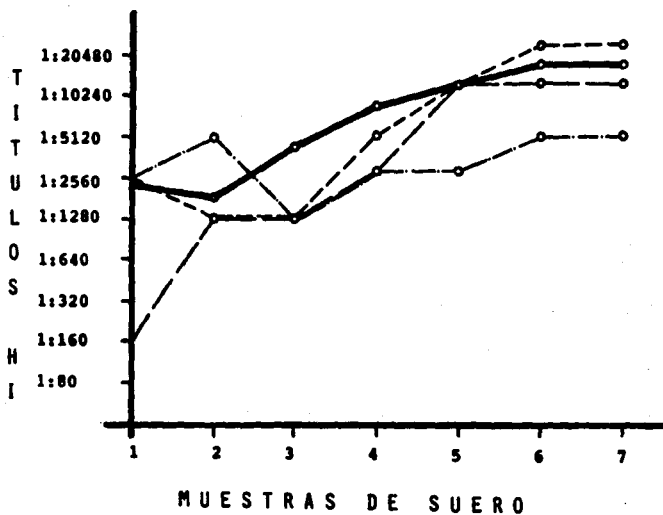
CURVA DE COMPORTAMIENTO DE LOS TITULOS DE
ANTICUERPOS EN LOS PERROS 2, 3 Y 8
EN RELACION CON LA MEDIA



- X ARITMETICA.
- - - PERRO No. 2
- - - PERRO No. 3
- . - PERRO No. 8

GRÁFICA No. 4

CURVAS DE COMPORTAMIENTO DE LOS TITULOS DE
ANTICUERPOS EN LOS PERROS 4, 5 Y 10
EN RELACION CON LA MEDIA

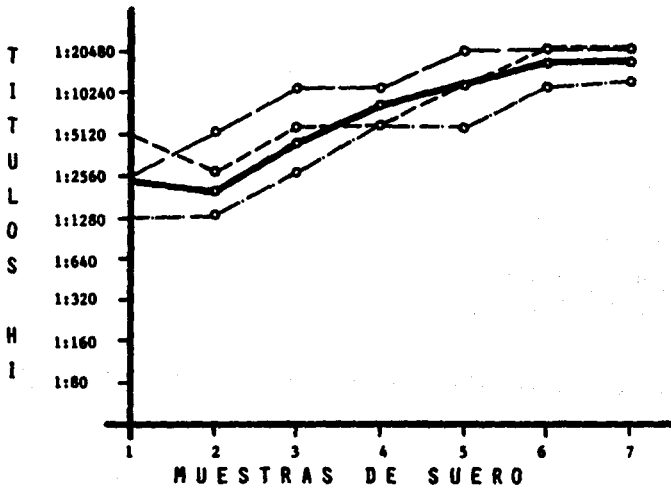


———— \bar{x} ARITMETICA.
- - - - PERRO No. 4
- - - - PERRO No. 5
- - - - PERRO No. 10

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

GRÁFICA No. 5

CURVAS DE COMPORTAMIENTO DE LOS TITULOS DE
ANTICUERPOS EN LOS PERROS 6, 7 Y 9
EN RELACION CON LA MEDIA



— X̄ ARITMETICA.
- - - PERRO No. 6
- · - PERRO No. 7
— PERRO No. 9

DISCUSION

Los resultados obtenidos nos indican que los perros utilizados presentaron anticuerpos antes de la administración de la primera dosis de vacuna. De éstos, los perros 7, 8, 9 y 10 habían sido vacunados antes de iniciar el programa, mientras que los perros 1, 2, 3, 4, 5 y 6 no tenían antecedentes de vacunación contra parvovirus, esto nos hace suponer que probablemente estuvieron expuestos al virus de calle y desarrollaron anticuerpos.

Después de la primera dosis, se detectó una disminución en los niveles de anticuerpos en los perros 2, 5, 6 y 8, este fenómeno se manifiesta en la media aritmética del comportamiento y probablemente se debe al hecho de que al aplicar la vacuna en animales con anticuerpos ya presentes, hay una caída inicial de los títulos, producto de la reacción que ocurre entre el virus y los anticuerpos circulantes y después se desaparecen.

En cuatro de los perros vacunados no hubo diferencia en el nivel de anticuerpos alcanzados entre la tercera y la cuarta dosis y en los otros cinco, el aumento registrado fue de una dilución; esto se debe a que la cifra total de anticuerpos en el suero obedece a una regulación bastante fija y tiende a alcanzarse una meseta a un nivel constante, incluso después de que el animal quedó expuesto a muchas dosis de antígeno.

La razón por la cual se utilizó un solo testigo es porque no se pretendía hacer una comparación con los perros va-

cunados y solo debía mantenerse con ellos sin vacunar para detectar cualquier cambio en su nivel de anticuerpos y aunque se observó un ligero aumento en la última semana del estudio, ésta no es muy significativa ya que solo fue una dilución y pudo deberse a la sensibilidad misma de la prueba, aunque existe la posibilidad de que los perros vacunados eliminaran el virus vacunal en las heces, quedando de esa manera expuesto el perro testigo, provocando en él una respuesta inmune ya que se trata de un virus vivo, sin embargo, carece de patogenicidad.

Al inicio del estudio no se pensó en un planteamiento estadístico por medio del cual pudieran representarse los resultados obtenidos, por esta razón no se pudo adaptar alguno, apropiado al esquema del trabajo.

En general, todos los perros hiperinmunizados tuvieron altos títulos de anticuerpos contra parvovirus canino; sin embargo, no sabemos si el suero es efectivo como profiláctico, por lo que queda el espacio para dar cabida a un posterior estudio en cachorros o en hembras gestantes.

CONCLUSIONES

El nivel de anticuerpos presente en el suero de los perros hiperinmunizados es alto; de acuerdo a lo anterior, puede ser utilizado para probar su efectividad en cachorros o en hembras gestantes.

Diferentes autores reconocen la existencia de un período crítico, en el cual hay un alto riesgo de infección por parvovirus. Para disminuir este riesgo, recomiendan vacunar a los cachorros a las 6, 9, 12, 16 semanas y continuar a los 7, 10 y 13 meses revacunando cada 6 meses. En el Bioterio resulta incosteable y poco práctico llevar a cabo un programa de este tipo, debido a que se maneja un gran número de cáñidos procedentes de diferentes centros antirrábicos, estos animales pasan por un período de cuarentena, posteriormente son bañados, desparasitados y alojados en jaulas colectivas en donde se les hace una inspección clínica para determinar si son aptos para ser sometidos a estudio. Con mucha frecuencia se detectan hembras gestantes las cuales son separadas y alojadas en maternidades individuales, se les suministra una dieta a base de carne, leche vitaminada y alimento comercial.

Después del parto se sigue la evolución de las camadas buscando la viabilidad de las mismas, para lo cual se elaboran programas de medicina preventiva que incluyen la vacunación contra las enfermedades virales más comunes que afectan a los cachorros como moquillo, hepatitis, rabia y parvovirus.

Estos programas cada vez son más caros y en consecuencia en determinados momentos no se realizan, por esta razón, se están buscando otras alternativas aplicables al Bioterio, como lo es la inmunización pasiva.

La inhibición de la hemaglutinación es una prueba ciertamente sencilla y relativamente rápida. Su costo no es elevado y no requiere de un equipo sofisticado para su realización por lo que puede montarse en cualquier laboratorio no especializado y puede ser de gran ayuda para conocer el estado inmune de los perros, antes y después de un programa de vacunación contra la parvovirus canina.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aguila, T., H.M.: (1982) Determinación de anticuerpos contra el varvovirus canino en suero de perros en México. Tesis de Licenciatura, Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D. F.
- 2.- Appel, M.J.G.: Scott, F.W. and Carmichael, L.E.: (1979). Isolation and immunisation studies of canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. Vet. Rec. 105: 156-159.
- 3.- Azetaka, M.: Hirasawa, T.: Konischi, S. and Ogata, M.: (1981), Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serologic survey. Jpn. J. Vet. 43: 243-255
- 4.- Bringas, E., F.: (1985) Análisis comparativo de la respuesta inmune en cachorros vacunados contra parvovirus canino. Tesis de Licenciatura, Fac. de Est.Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- 5.- Buonavoglia, C.: Nardo, P. De.: Reitano, M. and Orfel, E. (1985). Persistence of maternal antibody to canine parvo virus in puppies and interference with vaccination.

- Clin. Vet. 108: 19-23.
- 6.- Carmichael, L.E.: (1983). Canine parvovirus immunization canine Paractice. 10:4-6.
- 7.- Carmichael, L.E.: Joubert, J.C. and Pollock, R.V.H.: (1983) A Modified Live canine parvovirus vaccine. II immune response. Cornell Veterinarian 73: 13-29
- 8.- Carmichael, L.E.: Joubert, L.C. and Pollock, R. V. H.: (1980) Hemagglutination by canine parvovirus: Serological studies and diagnostic applications. Am. J. Vet. Res. 41: 784-791.
- 9.- Carmichael, L.E.: Pollock, R.V.H. and Joubert, J.C.: (1984) Response of puppies to canine-origin parvovirus vaccine. Mod. Vet. Prac. 65: 99-102
- 10.- Carpenter, P.L.: (1982). Immunología y serología. segunda ed. Editorial Prensa Médica Mexicana, México.
- 11.- Fiscus, S.A.: Mildbrand, M.M.: Gordon, J.C.: Teramoto, Y.A. and Wiston, S.: (1985). Rapid Enzyme-Linked immunosorbent assay for detecting antibodies to canine parvovirus. Am. J. Vet. Res. 46: 859-863.

- 12.- Flores, C., R.: (1987). La infección por parvovirus en perros.
Ciencia Veterinaria. 4: Editorial UNAM. 131-159.
- 13.- Gooding, G.E. and Robinson, W.F.: (1982). Maternal antibody vaccination and reproductive failure in dogs with parvovirus infection.
Aust. Vet. J. 59: 170-174.
- 14.- Haesebrouck, F. and Pensaert, MB.: (1983). Parvovirus infection in dogs. I.- A review of pathogenesis and immunity. II.- Serumprophylaxis for puppies.
Vlaams Diergeneeskunding tijdschrift. 52:
- 15.- Haesebrouck, F.: Pensaert, MB. and Nelissen, L.: (1985) Parvovirus infection in dogs III.- A field trial of serumprophylaxis in pups.
Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift. 54:
- 16.- Harper, D.G. and Barnard, L.: (1984). Canine parvovirus vaccination efficacy.
Vet. Rec. 114: 151-152.
- 17.- Herbert, W.J.: (1974). Veterinary Immunology. Cap. 26
Blackwell Scientific Publications.

- 18.- Ishibashi, K.: Maede, Y.: Oshugi, T.: Onuma, M. and Mikami, F.: (1983). Serotherapy for dogs infected with canine parvovirus.
Jpn. J. Vet. Sci. 45: 59-66.
- 19.- Neunier, P.C: Cooper, B.J.: Appel, M.J.G.: Laniew, M.E. and Slauson, D.O.: (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis. Sequential virus distribution and passive immunization studies.
Vet. Pat. 22: 617-624.
- 20.- O'briens, S.E.: Roth, J.A. and Hill, B.L.: (1986). Response of pups to modified-live canine parvovirus component in a combination vaccine.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 188: 699-701
- 21.- Oliver, A.C. and Noble, R.J.: (1982). Passive immunity to parvovirus.
Vet. Rec. 110: 111.
- 22.- Pedraza, M., M.E. y Gallégo, S., M.A.: (1982). Estudio clínico y serológico de la gastroenteritis hemorrágica parvoviral canina. (Presentación de algunos casos). Tesis de Licenciatura. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

- 23.- Pollock, R.V.H.: (1982). Canine parvovirus Host-response and immunoprophylaxis.
Dissertation Abstract International. 42: 3154.
- 24.- Shultz, R.D.: (1982). Theoretical and practical aspects of an immunization program for dogs and cats.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 181: 1142-1149.
- 25.- Smith, J.R.: Farmer, T.S. and Jhonson, R.H.: (1980). Serological observations on the epidemiology of parvovirus enteritis in dogs.
Aus. Vet. J. 56: 149-150.
- 26.- Stephano, H., A.: (1980). Epizootia de enteritis viral canina en México, Posible infección por parvovirus.
Veterinaria Méx. 11: 141-148.
- 27.- Tizard, I.: (1984). Inmunología Veterinaria. Segunda Ed. Nueva Editorial Interamericana, México.
- 28.- Walker, S.T.: Feilen, C.P.: Sabien, M.: Love, D.N. and Jones, R.F.: (1980). A serological survey of canine parvovirus infection in New South Wales, Australia.
Vet. Rec. 106: 324-325.
- 29.- Weir, D.M.: (1967). Handbook of Experimental Immunology cap. 21. Blackwell Scientific Publications.