



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

56  
2ef

"EMPLEO DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA)  
EN LA DETECCION DE PARVOVIRUS, AISLADO A PARTIR  
DE HECES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS Y DE  
PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS"

T E S I S

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

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: M. Sc. RAUL ARTURO MAR CRUZ





## **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

EL PERRO COMO ANIMAL DOMESTICO .....	1
HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD .....	3
ETIOLOGIA .....	4
NOMBRE OFICIAL .....	5
ASPECTOS INMUNOLOGICOS .....	6
A).- Inmunidad pasiva .....	6
B).- Vacío inmunitario .....	8
C).- Falta de respuesta individual .....	9
CARACTERISTICAS CLINICAS .....	12
DIAGNOSTICO CLINICO .....	15
DIAGNOSTICO DE LABORATORIO .....	16
CONFIRMACION DEL DIAGNOSTICO .....	17
A).- Muestras de suero .....	17
B).- Muestras fecales .....	18
C).- Muestras para histopatología .....	18
PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMOAGLUTINACION (IH) .....	19
TRATAMIENTO .....	21
TRANSMISION .....	21
MEDIDAS DE CONTROL .....	22
DESINFECCION .....	23
PROBLEMAS EN EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIROSIS .....	24
PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) COMO ALTERNATIVA - PARA DIAGNOSTICAR LA PARVOVIROSIS CANINA .....	25

<b>MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>PRUEBAS PRELIMINARES .....</b>	<b>29</b>
<b>PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN TUBO .....</b>	<b>31</b>
<b>PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U" .....</b>	<b>32</b>
<b>PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U" CON HECES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS .....</b>	<b>33</b>
<b>PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U" CON HECES DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS .....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
<b>DISCUSION .....</b>	<b>41</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>

## EL PERRO COMO ANIMAL DOMESTICO

El comportamiento del perro ha sido semejante desde la historia hasta nuestros tiempos, siendo una cualidad importante que lo ha caracterizado como el mejor amigo del hombre. Se ha escrito una larga historia - entre el hombre y el perro. Quizás éste fue el primer animal doméstico (33).

La opinión de los especialistas es relativamente precisa; están de acuerdo en situar esta domesticación a principios del Neolítico es decir, unos 10 000 años antes de nuestra era. Sin embargo algunos lo creen más antigua, en el mesolítico (33). Por lo tanto ha existido una armonía - entre el hombre y el perro desde hace mucho tiempo, lo cual poco a poco ha provocado una selectividad en funciones de acuerdo a su grado de inteligencia y habilidad (33).

La población canina ocupa un lugar importante dentro de la sociedad - siendo ésta la que se preocupa por favorecer un bienestar común y - una completa salud del perro, puesto que ésta ha sido víctima de numerosas enfermedades. Esto se ha manifestado en la preocupación por conocer las etiologías, períodos de incubación, cuadros clínicos, tratamientos de las diversas enfermedades y métodos de diagnóstico. (21).

Consideramos que las enfermedades de alguna u otra manera provocan un descontrol en la homeostasis del perro, lo cual ha llamado la atención y para poder corregir este trastorno se han enfocado numerosas investigaciones en el perro. (21)

Dentro de las enfermedades del perro, algunas de éstas son más frecuentes, como son: Rabia, Moquillo, Hepatitis, Gastroenteritis, Hemorrágica Parvoviral, Colibacilosis, Parasitosis externa, Ancylostomiasis, Dipyldiasis, Teniasis, Toxocariasis, Coccidiosis y Micosis. (21).

Existen enfermedades como la Gastroenteritis Hemorrágica Parvoviral, que son consideradas de alto riesgo y por lo tanto en la mayoría de las veces fatal. (21)

## HISTORIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD

### HISTORIA:

La Gastroenteritis Hemorrágica Parvoviral es una enfermedad de reciente aparición, muy contagiosa que afecta al perro doméstico. (3)

Se reporta por primera vez en el año de 1969. (3)

En 1970, Binn y colaboradores tomaron con hisopos muestras rectales de perros sanos, y aislaron un virus del grupo parvovirus al que llamaron "Virus minuto" (21)

En 1976, Slegi basándose en un estudio serológico, estimó que el virus estaba difundido en los perros de Estados Unidos de Norteamérica sin reconocer su patogenicidad. (21)

En 1977, Eugster y colaboradores lograron aislar el parvovirus en heces diarreicas de cachorros sin tratamiento entre los 5 y 10 días posteriores a los primeros signos. (21)

A partir de 1978, se han reportado múltiples brotes de gastroenteritis hemorrágica y miocarditis, causada por parvovirus en Canadá, EE.UU. México, Panamá, Alemania, Bélgica, Francia, Holanda, Inglaterra y Suiza. (21)

Los casos en México se reportaron hasta los meses de marzo, abril y junio de 1980, presentando los perros afectados vómito blanco espumoso, diarrea profusa y fétida con frecuencia y fiebre de 40 a 41°C siendo esto lo primero que se presenta. (21)

La deshidratación era notable y estos animales morfan entre 24 y 72 horas después de presentar los signos, o bien se recuperaban muy lentamente, siendo más afectados los pacientes menores de un año de edad, con una alta morbilidad y mortalidad. (21)

## ETIOLOGIA

Virus DNA llamado parvovirus y por afectar al perro se llama Parvovirus Canino.

En esencia, el parvovirus canino difiere del parvovirus felino en pequeños segmentos de su DNA . Se estudió el DNA de seis cepas "salvajes" de parvovirus canino (PC) aisladas en muy diferentes puntos geográficos ( 2). Cinco parecieron ser idénticos, pero se demostró que la sexta cepa era diferente. (2)

A la vista de los incontables pases de perro a perro sufridas por estos aislamientos, el virus no parecía tener una propensión inherente a mutar, sin embargo no son iguales. (2)

Un perro puede excretar en el pico de la infección  $10^9$  partículas infecciosas por gramo de heces. Teniendo en cuenta esto, junto con la extrema estabilidad del virus quizás no resulte tan difícil imaginar cómo se puede diseminar el agente tan eficazmente. (2)

El género parvovirus contiene alrededor de 20 miembros de los cuales los más importantes en medicina veterinaria son 5.

Parvovirus Canino (PC).

Panleucopenia Felina/virus de la enteritis del visón (PF/VEV)

Parvovirus Porcino (PP)

Parvovirus Bovino (virus haden) ó (PB)

Virus de la Hepatitis del Ganso (VHG) (2)

El parvovirus canino se designa oficialmente CPV-2 para distinguirlo del virus diminuto de los cánidos que no ha sido asociado con enfermedad alguna (VDC). (2)

"PF y VEV no son lo suficientemente distintos como para ser considerados como dos especies distintas VEV se considera como variante de PF en base al hospedador. (Comité Internacional para taxonomía de los virus" (2)

## NOMBRE OFICIAL

Gastroenteritis Hemorrágica Canina, la cual ha recibido otras sinonimias como la Gastroenteritis Viral Canina y Parvovirus Canina entre otras. (21)

Esta enfermedad tiene distribución mundial y en cuanto a México se ha encontrado y diagnosticado clínicamente en la mayoría de los estados de la República Mexicana. (11)

Como especies susceptibles tenemos a los Perros, Lobos, Perros salvajes, Zorros, Visonos y Coyotes. (21)

## ASPECTOS INMUNOLOGICOS

Cabe mencionar que la edad y condición fisiológica tiene vital importancia en la resistencia que pueden tener los perros a la infección de -- Gastroenteritis Hemorrágica Canina. (2) Los cachorros nacidos de ma-- dres Inmunes están protegidos pasivamente durante la primera fase de su vida por los anticuerpos adquiridos de sus madres en el periodo perinatal . (2)

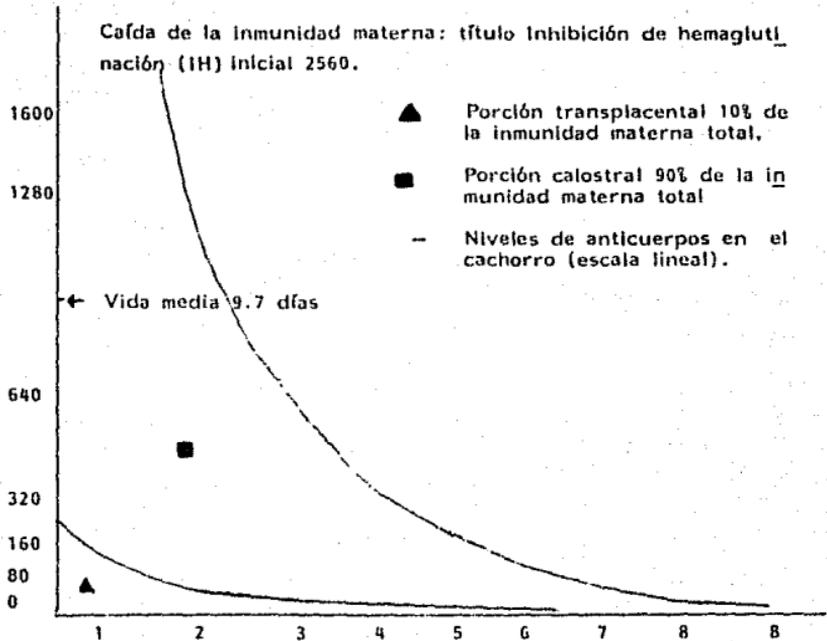
### a).- Inmunidad pasiva:

Se ha calculado que los cachorros reciben aproximadamente el 90% de su inmunidad materna a través del calostro; mientras que la transferencia a través de la placenta supone un 10% de los anticuerpos pasivos totales. (2)

El cachorro tiene poco después del nacimiento un nivel de anticuerpos séricos igual al 50% del de su madre. (2)

Esta inmunidad materna empieza a declinar exponencialmente con una vida media aproximada de 10 días, lo que significa que el título de anticuerpos baja en un 50% cada 10 días. Gráfica 1. (2)

GRAFICA 1



Edad de los cachorros, (en semanas). Información de laboratorios Inter--  
vet. (2)

Los títulos de anticuerpos precolostrales son relativamente uniformes para compañeros de camadas. Sin embargo, se presenta una variación potencial mayor en la fracción colostrale de anticuerpos en función del volumen de colostro ingerido por cada cachorro. (2)

Se han observado títulos de anticuerpos, dentro de una camada de 8 cachorros de 6 semanas, que oscilaban de 20 a 320. (2)

Aunque éste es un caso excepcional, sirve para ilustrar la poca confiabilidad de predecir el momento de vacunación de los cachorros por la extrapolación de una simple toma de sangre obtenida de la madre. (2)

#### b).- Vacío inmunitario

Generalmente se admite que cuando el título de anticuerpos (IH) está por debajo de 80 no habrá protección adecuada frente al desafío virulento. (2)

Las vacunas han sido hasta la fecha poco seguras cuando se administran en presencia de niveles de inmunidad maternos detectables por la prueba (IH). (2)

En la gráfica 2 se representa la inmunidad materno en un cachorro con niveles iniciales altos (10240. (IH) ) en donde los títulos van descendiendo a medida que transcurren las semanas y en la semana 10 a 14 los títulos de (IH) son menores de 80, lo cual indica que el cachorro es susceptible a la infección; pero resulta refractario a la vacunación. Esto se ha denominado "Vacío inmunitario". (2)

El cachorro es refractario a la vacunación debido a que la inmu

inidad pasiva interfiere con el antígeno vacunal nullificado a la -  
respuesta inmune activa, quedando el cachorro totalmente despro-  
tegido. (2)

c).- Falta de respuesta individual.

Como se explicó anteriormente una de las razones por la cual no  
puede existir respuesta a la vacunación es por la presencia de -  
inmunidad materna la cual interfiere con el antígeno vacunal. (2)

Otro problema que se ha identificado es cuando un animal se pre-  
senta como refractario a la vacunación con dosis repetida de va-  
cuna mucho tiempo después de que la inmunidad materna haya de-  
scendido lo suficiente como para permitir la inmunidad activa. (2)

En este fenómeno se hallan involucrados comúnmente, pero no da  
forma exclusiva, algunas razas grandes (especialmente Rottwei-  
lers y Dobermanns) (2)

A menudo se ha hablado de las vacunas basadas en el virus feli-  
no pero se ha visto esta situación también con vacunas homologas.  
(2)

Para explicar esto se tienen varias teorías sobre la falta de res-  
puesta a la vacunación y puede que estén involucradas cualquie-  
ra de ellas o una combinación de las siguientes . (2)

1).- Interferencia parcial.

Es probable que en muchos casos el antígeno sea interferi-  
do parcialmente por la presencia de bajos niveles de inmuni-  
dad pasiva, de modo que dé lugar a una respuesta activa -  
débil y apenas detectable. (2)

## 2).- Receptores celulares

Aunque no se ha comprobado, puede ser que el parvovirus felino sea capaz de replicarse de forma limitada en los tejidos de algunos perros pero no de otros; debido a diferencias en los receptores celulares superficiales al ser incapaz de penetrar en las células, el virus actuaría como una vacuna inactivada dando malos resultados. (2)

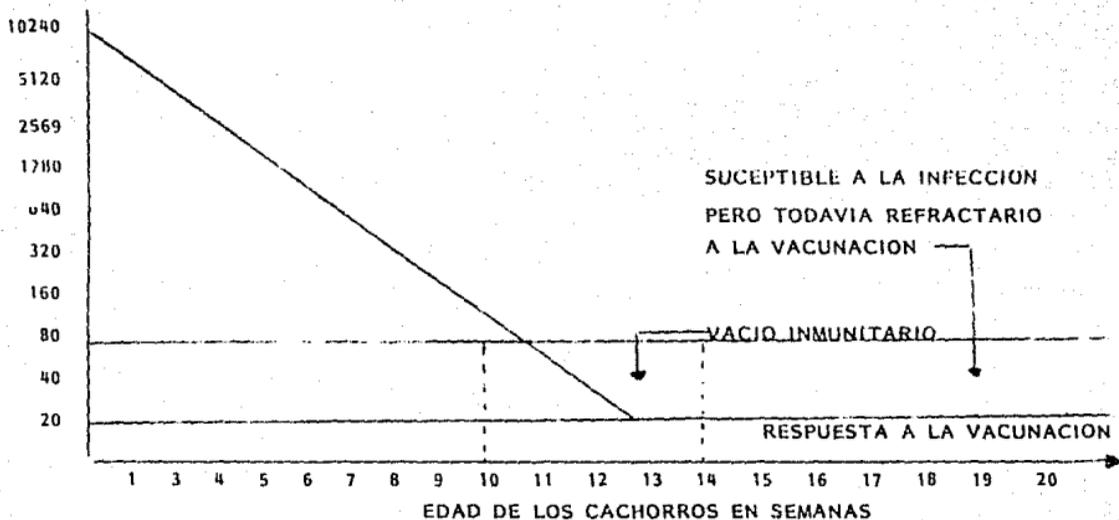
## 3).- Falta de reconocimiento inmunológico.

El sistema inmune de algunos individuos podría simplemente fallar en el reconocimiento de parvovirus felino como no propio.

GRAFICA 2

DESCENSO DE LA INMUNIDAD MATERNA DE PARVOVIRUS CANINO

INMUNIDAD MATERNA (ANTICUERPOS SERICOS III.)



## CARACTERISTICAS CLINICAS

La vía de entrada más común parece ser la oral, iniciándose la reproducción en células con gran actividad mitótica (8), por lo que probablemente esta reproducción se lleve a cabo en tonsilas (4,28). Una vez que se reproduce, comienza una distribución por vía sistemática, en donde dependiendo de la severidad de la infección, el virus se podrá recuperar a partir de tejidos linfáticos, médula ósea, miocardio, hígado y pulmón. (28)

Los primeros signos aparecen a las 24-48 horas postinfección con anorexia y depresión; existe un aumento de temperatura en los animales afectados aproximadamente al día 5, probablemente debido a la circulación de complejos Ag-Ac. (28)

Uno de los principales signos observados es el de una leucopenia de 100-2000 células/mm<sup>3</sup>. (2,4,7). Además de que algunos investigadores mencionan una miocarditis con inclusiones basófilas en miofibrillas cardíacas con infiltración de linfocitos y células plasmáticas con dilatación cardíaca y lesiones más marcadas en ventrículo izquierdo. (2)

Se considera que existen 2 presentaciones: la forma Gastrointestinal y la forma Cardíaca.

La presentación de esta enfermedad en forma sistemática antes que intestinal se confirma con la aparición de una viremia el día 3 postinfección y excreción por heces el día 5 (28).

Se pueden observar lesiones en el bazo con ligera disminución linfoplasmática en la pulpa roja con hemorragias marcadas y necrosis linfoides-folicular, las áreas paracorticales y los cordones nodulares se muestran hipocelulares: (12).

Las lesiones más características se localizan en el intestino delgado, - con atrofia de vellosidades y necrosis en las criptas con colapso de - la lámina propia. Las criptas de Lieberkhun se encuentran disminu- - das en número, conteniendo tejido necrótico; los enterocitos de las - criptas muestran un citoplasma ligeramente eosinofílico y núcleo vesi- - cular picnótico o fragmentado (26).

Las lesiones más marcadas se encuentran en el ileon (12). Sin embar- - go, pueden aparecer incluso en el colon proximal (2).

Los signos que aparecen en este estadio de la enfermedad son vómito, - diarrea y deshidratación: las heces tienen un color grisáceo-amarillen - to, son fluidas y en ocasiones con sangre (25).

Las lesiones de la enfermedad alcanzan su máxima severidad aproxima - damente el día 7 postinoculación experimental, aunque las lesiones a - nivel timo y vellosidades intestinales pueden permanecer hasta el día - 13. Dependiendo de la dosis infectante, la enfermedad se resuelve - en la mayoría de las veces con la muerte, principalmente en animales - jóvenes (27).

La respuesta inmunológica de un animal no inmune aparece a los 3 - días postinfección (16,25,28).

La clase de inmunoglobulina sérica predominante es IgM con moderadas - cantidades de IgG. Asimismo, se detectan coproanticuerpos de la cla - se IgA, por lo que la respuesta de un animal infectado incluirá un - componente secretos en la mucosa infectada y uno sistémico (25).

Existen además factores predisponentes, como son: la inmunosupresión - por corticosteroides y la presencia de Giardia sp que produce altera - ciones en las vellosidades (28).

## MIOCARDITIS

Para que el (PC) produzca enfermedad miocárdica en cachorros, se debe establecer la infección en las primeras semanas de vida, cuando las células del músculo cardíaco continúan dividiéndose. Dado que verticalmente casi todos los cachorros nacen actualmente de madres inmunes y reciben por tanto protección por Ac' pasivos durante la primera edad, la miocarditis por parvovirus es rara (23).

## DIAGNOSTICO CLINICO

En la presentación gastrointestinal, los primeros signos que indican la enfermedad son: anorexia, depresión, vómito súbito y espumoso, frecuente al inicio y que después puede contener pequeñas estrías de sangre, fiebre de 39.4 al 41°C y diarrea profusa y fétida de color grisáceo, que puede posteriormente ser sanguinolenta y deshidratación (10,24,29,31,32)

Otros virus y bacterias pueden complicar más el cuadro clínico o confundirlo.

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

Se disponen de varias pruebas para la estimación de anticuerpos séricos frente al (PC) que incluyen: Seroneutralización, Inhibición de la hemoaglutinación (IH) y la prueba de Elisa (Enzyme-linked Immunosorbent assay). La más ampliamente utilizada es la prueba IH que proporciona un medio rápido y adecuado para titular gran número de sueros. Aunque la prueba de seroneutralización se considera más sensible y, por ello más seguro para la medición de títulos muy bajos de Ac'. En términos prácticos ésta tiene probablemente pocas ventajas sobre los métodos más simples. (2).

El diagnóstico de la gastroenteritis por parvovirus se puede hacer en base a la identificación de virus en heces o tejidos o a la cuantificación de anticuerpos, la cual es indirecta porque solo arroja información sobre el nivel inmunológico del animal y por otra parte, la ausencia de anticuerpos no indica que el animal esté libre de la infección. (13).

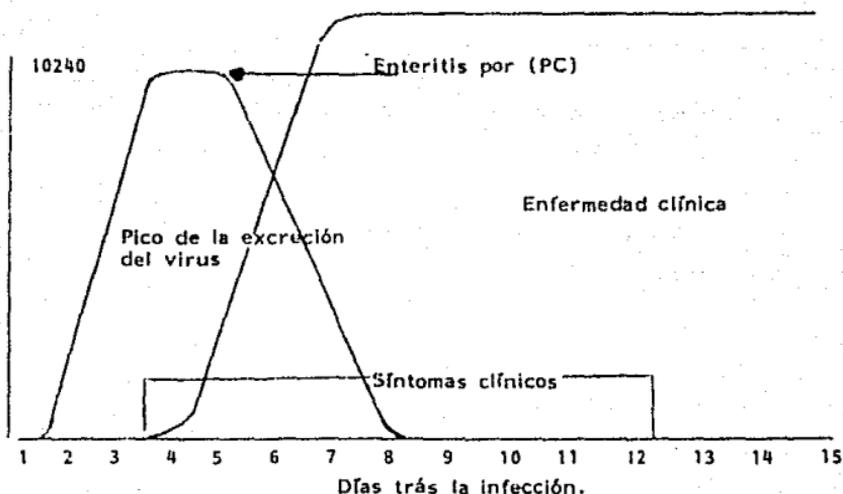
## CONFIRMACION DEL DIAGNOSTICO

A).- Muestras de suero:

### GRAFICA 3

En la enteritis por (PC) la excreción del virus es posible y la respuesta de anticuerpos en relación con los síntomas clínicos es aparente. (2).

Títulos (IH)



Como se puede apreciar en la gráfica 3, los niveles de anticuerpos (PC) son a menudo altos en el momento de la consulta, llegando a títulos de - 10240 en prueba de (IH). (2).

Mientras que los títulos de Ac<sup>s</sup> sugieren una infección reciente, para esto - por sí solo no constituye una prueba de infección activa (Laboratorios - (Intervet). (2).

### B).- Muestras fecales

Se puede detectar el virus por análisis de hemaglutininas o aislamiento en cultivo celular. (2).

Por otra parte, a menos que se haya obtenido la muestra precozmente, las cantidades de anticuerpos en las heces pueden ser altas, de modo que los resultados de aislamiento son negativos o equívocos. (2).

### C).- Muestras para histopatología

La histopatología puede ser útil junto al diagnóstico post-mortem. Los tejidos más adecuados como muestras para el diagnóstico de laboratorio son: (2).

Nódulos linfáticos mesentéricos y pequeños segmentos del intestino delgado. (2).

Se deberán conseguir los tejidos lo más pronto posible tras la muerte del animal y deben fijarse inmediatamente en un volumen abundante de formol al 10%. (2).

Los cortes intestinales se deberán abrir longitudinalmente y se agitarán suavemente en el fijador para desprender el material adherido a la superficie mucosa. (2).

Un método práctico que impide la deformación de la muestra intestinal consiste en pinchar el segmento abierto del intestino, con la mucosa hacia arriba, en una pequeña pieza de corcho. Posteriormente se coloca flotando sobre el fijador. Los tejidos sólidos no deberán ser mayores de 1 cm. de grosor para permitir una rápida penetración del fijador. (2).

## LA PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IH)

Esta prueba utiliza la capacidad de (PC) para aglutinar glóbulos rojos de cerdo bajo condiciones específicas de temperatura y pH. Los perros que se han recuperado de la infección por (PC) tienen niveles de anticuerpos séricos altos y sostenidos y son inmunes a la infección, probablemente de por vida. Las respuestas vacunales en general dan lugar a niveles algo inferiores de Ac' séricos y la inmunidad puede ser de menor duración. (2).

La prueba de inhibición de la hemaglutinación IH es la más comúnmente empleada, obteniéndose aparentemente mejores resultados si se utilizan eritrocitos de cerdo. (4) pero se ha sugerido que se deben emplear por lo menos dos pruebas, la de seroneutralización SN y la de IH para establecer un diagnóstico más exacto y que cuando los títulos de SN son más altos que los de IH, debe existir evidencia de infección clínica. (19).

Sin embargo podemos utilizar otras pruebas para el diagnóstico de Parvovirus canino, entre las cuales se pueden mencionar:

- a).- Seroneutralización.
- b).- Hemaglutinación con eritrocitos de ovino tratados con glutaraldehído y ácido tánico sensibilizados con suero antiparvovirus de conejo purificado en donde los títulos de hemaglutinación pasiva se incrementan de acuerdo al desarrollo de los signos clínicos y se encuentra una correlación entre títulos séricos y fecales (16).
- c).- Inmunofluorescencia en muestras de tejidos se obtienen mejores

resultados intentando el aislamiento de virus en cultivo y la prueba de inmunofluorescencia mantiene buena correlación con esa técnica siendo preferible utilizar homogenizados de yeyuno y bazo. (19).

d).- Elisa, para identificación del virus en heces se ha simplificado gracias a la producción de anticuerpos monoclonales en células de rata (6) y con esta técnica se han encontrado correlaciones de 88,94,95 y 96% con la prueba de hemaglutinación. En tejidos fijados con formol y cortes congelados, la prueba de Elisa ha permitido una identificación más clara de antígeno que la prueba de inmunofluorescencia, pero la técnica es aparentemente más sencilla en ésta última (17).

e).- Algunas otras pruebas como la de aglutinación en látex (más sencilla) o hibridación con sondas de ácido ribonucleico (más sofisticada) han resultado menos exactas que la prueba de Elisa (91 y 73.3% respectivamente) y en ambas se obtienen resultados falsos positivos. (19).

El pretratamiento de las heces con cloroformo y el empleo de un conjugado monoclonal ha mejorado los resultados de la prueba de Elisa. (19).

El uso de estos anticuerpos permite detectar cantidades infinitesimales de virus en solo 15 minutos de incubación. (19).

De cualquier manera, dadas las tremendas variaciones obtenidas entre las técnicas más comúnmente empleadas tanto serológicas de IH, inmunofluorescencia indirecta y seroneutralización como la identificación de virus en heces con inmuno-electro-microscopía, cultivo de células y hemaglutinación (9), es preferible recurrir en todos los casos o por lo menos dos pruebas. (9).

## TRATAMIENTO

Hasta la fecha no existen drogas antivirales efectivas para el tratamiento de las enfermedades, por lo que se debe proporcionar al paciente un tratamiento sintomático de soporte con la finalidad de controlar la deshidratación, emesis y diarrea e infecciones secundarias. (21).

## TRANSMISION

La gran cantidad de casos reportados en tres continentes desde la aparición del primer brote registrado, sugiere que el método de transmisión de perro a perro sea muy rápida, llegando la infección por vía oral.

La excreción del virus por heces se detecta aproximadamente el día 3 postinfección, alcanzando su máximo el día 5, llegando a encontrar en un estado agudo más o menos de  $10^9$  partículas virales por gramo de heces. (19,28).

El siguiente cuadro nos muestra la duración del virus en heces mantenidas a temperatura ambiente (28).

<u>TIEMPO</u>	<u>CULTIVOS DE TEJIDOS DOSIS INFECTANTE (CTD!) CTDI 50/ HECES</u>
Frescas	10 6.2
1 mes	10 5.2
3 meses	10 3.2
6 meses	10 2.2

La cantidad y duración del virus en heces explica el alto contagio detectado entre la población canina (28).

## MEDIDAS DE CONTROL.

Se demostró que las vacunas inactivadas de (PF) proporcionaban una respuesta baja de anticuerpos (PC) y de poca duración en perros sero negativos, de tal forma que la duración de la protección podría ser solo de unas semanas. (19) Además la cantidad de antígeno necesaria para inducir una inmunidad duradera en el perro utilizando vacunas de (PF) vivo, es al menos 1000 veces superior a la que contiene la mayoría de las vacunas felinas. De modo que dichos productos resultaban, probablemente, de poco valor en el control de la difusión de la infección por (PC). (2).

Dentro de las medidas de control; el uso de sueros hiperinmune en perros jóvenes en dosis repetidas, no previene la mortalidad (15).

El tratamiento de animales enfermos con sueros hiperinmunes, 24 Hrs., después de la inoculación oral impide el desarrollo de signos y síntomas (1,22).

Aparentemente el uso de sueros hiperinmune ha sido poco efectivo, porque el virus se sitúa y migra en forma intracelular desde el principio, ya que siendo el suero sanguíneo pobre en IgA no impide la entrada del germen al organismo. (14,18).

Desafortunadamente, la fase de viremia casi siempre procede a la aparición de síntomas clínicos y si el tratamiento se hace cuando se detecta físicamente la enfermedad, hay poco que se puede hacer porque el tejido linfoide ya ha sido dañado (14,18).

### Control de la enfermedad en situaciones endémicas.

Una vez establecida en un ciclo endémico, la Parvovirus Canina es -

fácil de erradicar de un lugar específico. (2).

Las perreras pueden sufrir graves pérdidas en cachorros que sucumben a la infección a medida que la protección maternal desaparece. (2).

Cuando existe un problema, un método eficaz de control es la combinación de las siguientes medidas:

- Reducción del desafío con virus virulento. En la medida de lo posible, los cachorros susceptibles se deberán mantener en lugares separados que pueden ser adecuadamente desinfectados entre cada grupo. (2).
- Vacunación.

El mantenimiento de una inmunidad alta en los perros de cría asegura que los cachorros reciban un alto nivel de inmunidad maternal que debería proporcionar alguna protección en el período crítico del destete. (2).

### DESINFECCION

Solo el formol y el hipoclorito de sodio son altamente efectivos contra el PC, las áreas contaminadas deberán lavarse primero, ya que la eficacia de los desinfectantes se reduce mucho en presencia de materia orgánica. (2).

Otra manera de desinfectar es usando una parte de lejía por 30 de agua aplicando la solución en superficies previamente limpias. (2).

## PROBLEMAS EN EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIROSIS

El diagnóstico clínico de esta enfermedad contempla una serie de signos que son característicos de la enfermedad; pero no son patognómicos, puesto que hay otras enfermedades con signos similares de los cuales - solo mencionaremos algunas:

### - Forma entérica

- a).- Agentes virales como: coronavirus, rotavirus, calicivirus, adenovirus tipo 1 y virus del moquillo canino. (5).
- b).- Agentes bacterianos como: *Corynebacterium* sp. *Salmonella* sp. *Campilobacter* sp. *Pseudomona*, *E. coli* . *Clostridium welchii*, novy y perfringens. (5).
- c).- Agentes parasitarios como: el *Ancylostoma caninum*, *Toxocara canis*, *Dipylidium caninum* y *Coccidia* sp. (5).
- d).- Intoxicaciones con Warfarina, Plomo y Arsénico.
- e).- Neoplasia intestinal: Linfoma, Adenocarcinoma y Fibrosarcoma.
- f).- Otras: Pancreatitis aguda, Colitis, Gastroenteritis Hemorrágica inespecífica (5).

### - Forma cardíaca

Electrocución, anomalías congénitas, herpes virus, hepatitis canina, moquillo canino e insuficiencia cardíaca (5).

LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) COMO ALTERNATIVA PA-  
DIAGNOSTICAR LA PARVOVIROSIS CANINA.

Se considera la prueba de hemoaglutinación viral como una prueba específica de laboratorio contra el Parvovirus, ya que este virus aglutina glóbulos rojos de cerdo y del mono *Macacus rhesus* (20) con mayor facilidad a 4°C.

Aunque recientemente, investigadores japoneses han desarrollado una técnica mejorada para aglutinación tanto de 4°C como a 37°C de glóbulos rojos de caballo, ratón, hamster, gato, ovino y perro (2,30)

## MATERIAL Y METODOS

Gracias al apoyo brindado por Médicos Veterinarios de Cuautitlán Izcalli, de Romero Rubio y de Echegaray se obtuvieron 20 muestras de heces - de perros clínicamente enfermos de Parvovirus Canino. De los cuales se seleccionaron 10 muestras para poder correr la prueba de hemaglutinación, seleccionadas en base a su historia clínica.

Todos los perros tenían de 3 a 4 meses de edad (Samoyedo, Boxer, - Doberman, Bull terrier e indefinidos, en los cuales las muestras fueron tomadas antes de algún tratamiento, posteriormente se conservaron en refrigeración.

Para dicha prueba se obtuvo el apoyo del laboratorio de la Facultad - de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Campo I y IV.

- 1).- Se utilizaron 10 cachorros clínicamente enfermos a Parvovirus canino y 1 perro adulto clínicamente sano.
- 2).- Agujas y jeringas estériles.
- 3).- Tubos de ensaye de 10 ml.
- 4).- Equipo y reactivos para la prueba de hemoaglutinación.
  - a).- Antígeno.- Se utilizó como antígeno la vacuna de Parvovirus - Canino cepa NL-35 D propagada en línea celular canina ----- NL-DK-1; laboratorios Norden de México y vacuna Newcastle - cepa BI.
  - b).- Solución buffer de fosfatos (SBF) "A" con un pH de 7.3  
NaCL ..... (8) gr.

KCl .....	(0.2) gr.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12 H <sub>2</sub> O .....	(2 ) gr.
Si no está hidratado se usará .....	(1.15) gr.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	(.2 ) gr.
Agua bidestilada .....	(800) ml.

c).- Solución buffer de fosfatos (SBF) "B" completa

CaCl <sub>2</sub> .....	(.1 ) gr.
MgCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O .....	(.1 ) gr.
Agua bidestilada .....	(200) gr.

Después de mezclarse bien cada una, se mezclarán las 2 a 4°C.

d).- Solución de Alsevers pH 6-6.2

Dextrosa .....	20.59 gr.
Acido cítrico .....	0.55 gr.
Cloruro de sodio .....	4.20 gr.
Aforado a un litro de agua desionizada.	

e).- Glóbulos rojos de cerdo al 0.25, 0.5, 0.75% y también de ave.

f).- Anticoagulantes, Heparina ó Acido Etilen Diamino Tetra-Acético (EDTA).

g).- Centrífuga clínica y tubos de centrífuga.

h).- Matraz de 100 ml.

i).- Tubos de ensaye

j).- Pipetas graduadas.

- k).- Gradilla
- l).- Refrigerador
- m).- Potenciómetro
- n).- Botella de difusión de leche con tapón de rosca.
- o).- Charola para hielo
- p).- Microdilutores
- q).- Microplaca con fondo en "U"
- r).- Estufa
- s).- Micropipetas
- t).- Solución salina fisiológica

## PRUEBAS PRELIMINARES

Con el objeto de familiarizarse con la prueba de HA se realizaron ensayos de HA con glóbulos rojos de ave al (.5) % y la vacuna de Newcastle cepa B.1; utilizando como solvente solución salina fisiológica al (.85)%. Esta prueba se realizó varias veces; no reportando los datos puesto que esto se realizó como prueba preliminar.

Posteriormente la prueba de HA se realizó con glóbulos rojos de cerdo; los cuales fueron seleccionados después de un monitoreo de varios cerdos de una granja, en la cual se obtuvo un donador de glóbulos rojos.

Después de haber concretado esta prueba se realizó la hemoaglutinación con Parvovirus canino vacunal con el objeto de ensayar e introducirse en la técnica de HA.

En esta prueba se tomaron en cuenta las 3 temperaturas 4,25 y 37°C, de acuerdo al protocolo para comparar o diferenciar los resultados, - Después de correr varias pruebas de HA, se observaron que existen varios factores que pueden alterar los resultados de la prueba y estos factores son:

- 1).- Lavado de material
- 2).- Eritrocitos de cerdo.
- 3).- Concentración de glóbulos rojos.
- 4).- pH de la solución de Alsever's.
- 5).- Lavado de glóbulos rojos, en cuanto a número de veces.
- 6).- Temperatura de conservación de glóbulos rojos.
- 7).- Tiempo de conservación, aproximadamente no más de 24 horas.
- 8).- Concentración de la solución salina fisiológica.
- 9).- Tipo de virus, es decir si es virus vivo o muerto.
- 10).- Temperatura de conservación de virus vacunal.

Después de analizar todos estos factores; se logró estandarizar la técnica de hemoaglutinación la cual mencionaremos a continuación:

- 1).- Se preparó solución salina al (.85)% esterilizada por autoclave.
- 2).- Se preparó solución de Alsever's con un pH de 6 - 6.3.
- 3).- Después de una prueba de selección, se obtuvo al donador único de glóbulos rojos, los cuales eran tomados asépticamente en la vena marginal del cerdo, los cuales eran mezclados con heparina o E.D.T.A. para evitar su coagulación. Posteriormente fueron lavados 3 veces con solución de Alsever's con un pH de 6 -6.2, centrifugado a 1500 RPM/5' para que finalmente se preparara la solución de glóbulos rojos al (.75)%; cabe señalar que la solución de glóbulos rojos eran usados al mismo día de la toma de muestra.
- 4).- El virus vacunal de Parvovirus canino fue conservado en refrigerador (4-7°C), hasta el momento de correr la prueba.
- 5).- Todo el material de laboratorio fue lavado con detergente Extran para que posteriormente se enjuagara una sola vez con agua de llave y 3 veces en agua desionizada.
- 6).- Secada al aire libre.

## PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN TUBO

### CUADRO I

- 1).- Se tomaron asépticamente 5 ml. de sangre los cuales eran mezclados con .5 - 2 mg/ml. de E.D.T.A. ó con .1 - .2 mg/ml. de heparina. Posteriormente se suspendieron en solución Alsever's - con un pH de 6 - 6.2, fueron lavados 3 veces en la centrífuga a 1 500 RPM por 5 minutos en cada lavado.
- 2).- Se preparó una solución de glóbulos rojos al .75%
- 3).- Una vez preparada la solución de glóbulos rojos al 0.75% se colocaron 12 tubos de ensaye de 10 ml. por hilera en la gradilla, a los cuales.
  - a).- Se colocó primero 1 ml. de SBF "B" a cada tubo.
  - b).- Se agregó 1 ml. de virus vacunal al tubo # 1 y los demás tubos se les agregó virus vacunal en diluciones dobles, - excepto el tubo # 12 el cual nos sirvió como control.
  - c).- Se agregó 1 ml. de glóbulos rojos al 0.75% a cada tubo.
  - d).- Los tubos se incubaron por 20 horas promedio a 4,25 y - 37°C y después se realizó la lectura.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U"

CUADRO 2

Se realizó esta prueba como alternativa, en la cual se procedió de la siguiente manera:

- 1).- El lavado del material fue de la misma manera al lavado del material para la prueba de HA en macro.
- 2).- Se colocó en la microplaca 0.025 ml. de SBF "B" en cada pozo.
- 3).- Se agregaron 0.025 ml. de virus vacunal y posteriormente se realizaron diluciones dobles hasta el pozo # 11 puesto que el 12 sirvió de control.
- 4).- Se agregaron 0.025 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 0.75% a cada pozo.
- 5).- Se incubaron a 4.25, 37°C por 4 horas para posteriormente realizarse las lecturas.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U" CON HECES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

CUADRO 3

Después de estandarizar la técnica de HA en macro y micro se realizaron pruebas de HA en microplaca pero con heces de perro artificialmente contaminadas con virus vacunal.

- 1).- Se recolectó la muestra fecal en un perro clínicamente sano el cual tenía 1,5 años de edad y su última vacunación contra Parvovirus Canino había sido aproximadamente de más de un año.
- 2).- La muestra fecal se recolectó con un guante al momento de defecar.
- 3).- Se conservó la muestra fecal en refrigeración.
- 4).- Se tomó 1 gramo de la muestra fecal y en un tubo de ensayo se mezcló en 8 ml. de SBF "B" con una varilla de vidrio.
- 5).- A la muestra, una vez homogénea, se le agregó un mililitro de virus vacunal mezclándose una vez más.
- 6).- La muestra fue centrifugada a 3000 RPM/10' de 3 a 5 veces hasta obtener su sobrenadante, el cual fue utilizado en la prueba de HA.
- 7).- Después de tener preparado esto, se colocaron 0,025 ml. de SBF "B" a cada pozo de la microplaca.
- 8).- Se agregaron 0,025 ml. del sobrenadante centrifugado y posteriormente se realizaron diluciones dobles hasta el pozo #11 puesto que el 12 nos sirvió de control.

9).- Se agregaron 0.025 ml. de glóbulos rojos al 0.75% a cada pozo.

10).- Se incubaron por 4 horas a 4, 25 y 37°C.

**PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION (HA) EN MICROPLACA CON FONDO EN "U" CON HECES DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS.**

**CUADRO 4**

Finalmente se realizaron pruebas de HA en microplaca pero con heces de perros clínicamente enfermos de Parvovirus Canina.

- 1).- De las muestras diarreicas con o sin sangre de los perros clínicamente enfermos se tomó un milímetro para mezclarse en 8 milímetros de SBF "B"
- 2).- Esto se realizó por cada muestra, obteniéndose así 10 muestras preparadas.
- 3).- Fueron centrifugadas a 3000 RPM/10' de una a dos veces para obtener claro el sobrenadante el cual fue utilizado en la prueba de HA.
- 4).- Se colocaron 0.25 ml. de SBF "B" a cada pozo de la microplaca.
- 5).- Se agregaron 0.025 ml. de sobrenadante centrifugado y posteriormente se realizaron diluciones dobles hasta el pozo 11 puesto que el 12 nos sirvió de control.
- 6).- Se agregaron 0.025 de glóbulos rojos al 0.75% a cada pozo.
- 7).- Se incubaron por 4 horas a 4,25 y 37°C.

### RESULTADOS DE CUADRO 1

**PRUEBA DE HA a 4°C. CON VIRUS VACUNAL SIN HECES, REALIZAN-  
DOSE POR 4 VECES.**

	<u>T U B O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X	X							
PRUEBA # 2	X	X	X	X	X							
PRUEBA # 3	X	X	X	X								
PRUEBA # 4	X	X	X	X								

---

**PRUEBA DE HA a 25°C CON VIRUS VACUNAL SIN HECES, REALIZAN-  
DOSE POR 4 VECES.**

	<u>T U B O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X								
PRUEBA # 2	X	X	X									
PRUEBA # 3	X	X	X									
PRUEBA # 4	X	X	X									

---

**PRUEBA DE HA a 37°C. CON VIRUS VACUNAL SIN HECES, REALIZAN-  
DOSE POR 4 VECES.**

	<u>T U B O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X	X	X	X					
PRUEBA # 2	X	X	X	X	X							
PRUEBA # 3	X	X	X	X								
PRUEBA # 4	X	X	X	X								

NOTA: El signo X indica hasta donde se realizó la hemaglutinación.

## RESULTADOS DE CUADRO 2

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA a 4°C. CON VIRUS VACUNAL SIN HE-  
CES, REALIZANDOSE POR 4 VECES.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X	X	X	X	X				
PRUEBA # 2	X	X	X	X	X	X	X					
PRUEBA # 3	X	X	X	X	X	X	X					
PRUEBA # 4	X	X	X	X	X	X						

---

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA a 25°C. CON VIRUS VACUNAL SIN HE-  
CES, REALIZANDOSE POR 4 VECES.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X								
PRUEBA # 2	X	X	X									
PRUEBA # 3	X	X	X									
PRUEBA # 4	X	X	X	X								

---

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA a 37°C CON VIRUS VACUNAL SIN HE-  
CES REALIZANDOSE POR 4 VECES.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X	X	X						
PRUEBA # 2	X	X	X	X	X							
PRUEBA # 3	X	X	X	X								
PRUEBA # 4	X	X	X	X								

### R E S U L T A D O S D E C U A D R O 3

Prueba de HA en microplaca a 4°C, con heces artificialmente contaminadas con virus vacunal, realizándose por 4 veces.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X	X	X	X					
PRUEBA # 2	X	X	X	X	X	X	X					
PRUEBA # 3	X	X	X	X	X	X						
PRUEBA # 4	X	X	X	X	X	X						

---

Prueba de HA en microplaca a 25°C, con heces artificialmente contaminadas con virus vacunal, realizándose por 4 veces.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X									
PRUEBA # 2	X	X	X									
PRUEBA # 3	X	X	X									
PRUEBA # 4	X	X										

---

Prueba de HA en microplaca a 37°C, con heces artificialmente contaminadas con virus vacunal, realizándose por 4 veces.

	<u>P O Z O S</u>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PRUEBA # 1	X	X	X	X								
PRUEBA # 2	X	X	X	X								
PRUEBA # 3	X	X	X									
PRUEBA # 4	X	X	X									

## R E S U L T A D O S D E C U A D R O 4

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA A 4°C CON HECES DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS A PARVOVIRUS CANINO.

LOS PERROS FUERON ORDENADOS EN FORMA ASCENDENTE PARA PODER INTERPRETAR MAS RAPIDO LOS RESULTADOS.

### P O Z O S

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PERRO #												
1.-	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
2.-	X	X	X	X	X	X						
3.-	X	X	X	X	X	X						
4.-	X	X	X	X								
5.-	X	X	X	X								
6.-	X	X	X									
7.-	X	X	X									
8.-	X	X										
9.-	X	X										
10.-	X	X										

---

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA A 25°C CON HECES DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS A PARVOVIRUS CANINO.

### P O Z O S

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12 (control)
PERRO #												
1.-	X	X	X									
2.-	X	X										
3.-	X	X										
4.-	X	X										
5.-	X	X										
6.-	X											
7.-	X											
8.-	-											
9.-	-											
10.-	-											

## R E S U L T A D O S D E C U A D R O 4

PRUEBA DE HA EN MICROPLACA A 37°C CON HECEs DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS A PARVOVIRUS CANINO.

### P O Z O S

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 (control)

PERRO #

1.-	X	X	X	X	X	X						
2.-	X	X	X	X								
3.-	X	X	X	X								
4.-	X	X	X									
5.-	X	X										
6.-	X	X										
7.-	X											
8.-	X											
9.-	X											
10.-	X											

NOTA:

X = SIGNIFICA HASTA DONDE SE PRESENTO LA HEMAGLUTINACION.

## DISCUSION DE LA PRUEBA DE HA, EN TUBO

Se observó que los resultados de la prueba de HA en tubo, probablemente variaron de una temperatura a otra, debido a que la capacidad de aglutinante de virus es afectada por la temperatura.

Esto lo demuestran los resultados obtenidos en la prueba de HA en tubo en donde al volumen manejado fue de 1 ml. de PBS, 1 ml. de virus vacunal y 1 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 0.75%.

Lo único que varió fue la temperatura ya que las muestras manejadas fueron las mismas.

Al observar los resultados se nota que la mejor aglutinación fue a los 4°C, siguiéndole la de 37°C y por último la de 25°C.

Cabe señalar que los resultados favorables obtenidos a 37°C coincidieron con los resultados de estudios japoneses los cuales fueron a 37°C, trabajándolos con eritrocitos de caballo, ratón, hamster, gato, ovino y perro. (Referencia bibliográfica) 33,59.

El tiempo necesario para realizar las lecturas fue en un promedio de 20 horas, esto no fue porque realmente tardara tanto sino por la disposición del laboratorio para llevarlas a cabo.

El volumen utilizado si influye, debido a los posibles factores.

- 1).- Tiempo necesario para que el volumen en total alcanzara las temperaturas señaladas anteriormente.
- 2).- Tiempo necesario para lograr la precipitación del glóbulo rojo.

- 3).- Tiempo necesario para que el virus suspendido lograra aglutinar a los eritrocitos.
- 4).- La influencia directa de la temperatura sobre las hemaglutininas ví-  
rales, ya que éstas son las que forman los puentes entre los eri-  
trocitros.

## DISCUSION DE LA PRUEBA DE HA. EN MICROPLACA

Se observó que los resultados de la prueba de HA en microplaca tuvie ron un similar comportamiento al de los resultados obtenidos en la --- prueba de HA en tubo.

Esto indica que la prueba de HA en microplaca es más exacta y rápida puesto que el material biológico fue el mismo lo que varió simplemente fue la técnica de macro a micro.

El tiempo necesario para realizar las lecturas fue en un promedio de 4 horas lo cual demuestra la rapidez de la prueba.

El volumen manejado fue 0.025 ml. de SBF de virus vacunal y 0.025 - de glóbulos rojos de cerdo al 0.75%.

Las razones por las cuales se obtuvieron resultados más rápidos son - las mismas que se mencionaron anteriormente.

Con esta técnica también se demuestra que la prueba funciona bien a 4°C, siguiéndole la de 37°C y por último la de 25°C.

Al demostrarse que la prueba de HA en microplaca nos proporciona va rias ventajas como son: tiempo en que se corre la prueba, cantidad - de material biológico, tiempo en efectuar la técnica, realización de va rias pruebas en un mínimo de tiempo, etc.

Se decidió utilizar esta técnica para correr la prueba de HA con he-- ces artificialmente contaminadas y la de perros clínicamente enfermos.

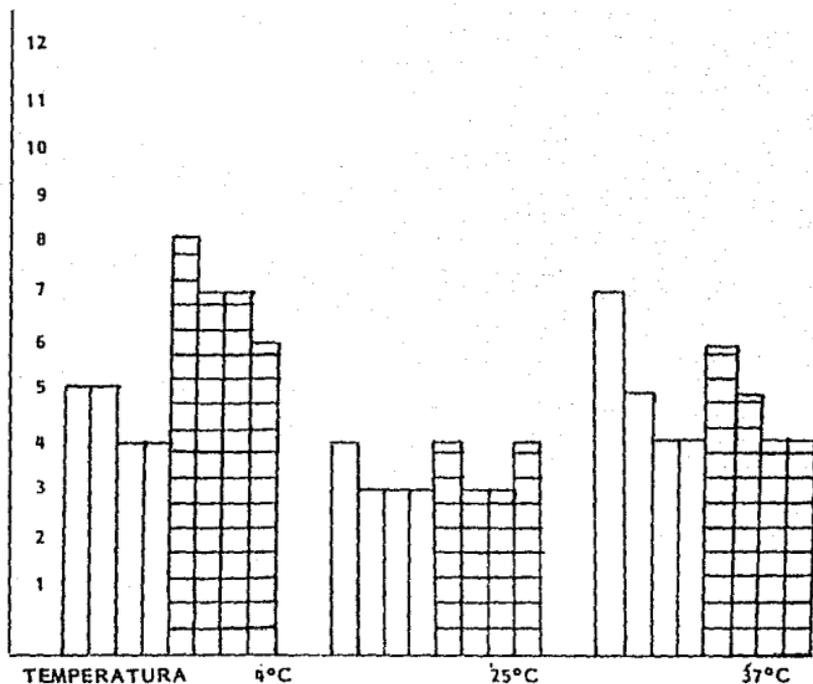
Pero antes de pasar a discutir los resultados obtenidos en la prueba -

de HA con heces artificialmente contaminadas y de perros clínicamente enfermos, graficaremos los resultados obtenidos en la prueba de hemaglutinación en tubo y de microplaca pero sin heces. Gráfica 4.

GRAFICA DE RESULTADOS DE HA EN TUBO Y DE MICROPLACA

GRAFICA 4

DILUCIONES DOBLES



 PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION EN TUBO

 PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION EN MICROPLACA.

- Cada barra indica el resultado por muestra obtenida por cada temperatura y por técnica.
- Los resultados están en la página (36). y (37).

Después de observar la gráfica No. 4 se nota lo siguiente:

- a).- Los títulos alcanzados en la prueba de HA en tubo son menores a 4°C y 25°C debido a los factores mencionados anteriormente página No. 41
- b).- La temperatura donde se hemaglutinó mejor fue a 4°C. debido a que es la temperatura ideal para el funcionamiento de las hemaglutininas.
- c).- La temperatura donde menos se hemoaglutinó fue 25°C, debido a que la temperatura afecta a la hemoaglutinina.
- d).- Por las ventajas que ofrece la técnica de hemoaglutinación en microplaca se decidió trabajarla con heces artificialmente contaminadas y de perros clínicamente enfermos.

## DISCUSION SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE HA CON HECES ARTIFICIALMENTE CONTAMINADAS.

Como se mencionó anteriormente la técnica empleada para esta prueba fue la microplaca con fondo en "U"

Con los resultados obtenidos en esta prueba se observa lo siguiente:

- 1).- La prueba que mejor funcionó fue a 4°C.
- 2).- La prueba que obtuvo resultados muy bajos fue la de 25°C.
- 3).- Sin embargo todos los resultados obtenidos a 4, 25 y 37°C. fueron comparativamente menores a los resultados obtenidos en la prueba de HA sin heces.

La posible razón por la cual se obtuvieron estos resultados fue a que la materia fecal absorbe partículas virales, dando como consecuencia una menor cantidad de virus libre el cual al ser sometido a diluciones dobles, disminuye más la cantidad de virus libre y por ello son menores los títulos alcanzados a las tres temperaturas.

Cabe señalar que en la prueba de hemaglutinación con heces artificialmente contaminadas con virus vacunal los volúmenes manejados fueron los siguientes, 0.025 ml. de (SBF) 0.025 ml. de virus vacunal y 0.025 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 0.75%.

En esta prueba conjuntamente con la prueba de HA en microplaca sin heces contaminadas se manejaron los mismos volúmenes.

Al observar los resultados obtenidos en la prueba de (HA) con heces artificialmente contaminadas los títulos son menores a los obtenidos en la prueba de HA sin heces y que dicha observación se presentó en sus tres temperaturas.

Lo cual indica que la materia fecal absorbe partículas virales dando - como consecuencia menos cantidad de virus libre y por lo tanto menores títulos de hemoaglutinación.

#### DISCUSION SOBRE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION CON HECES DE PERROS CLINICAMENTE ENFERMOS

En esta prueba los volúmenes manejados fueron los siguientes 0.025 ml. de (SBF) 0.025 ml. de heces de perros clínicamente enfermos y -- 0.025 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 0.75%.

En esta prueba también se obtuvieron los títulos más altos a 4°C si--- guiéndole los de 37°C y por último los de 25°C.

Lo cual indica que la temperatura ideal para este tipo de prueba es de 4°C debido a que las hemoaglutininas al ser proteínas son más estables a 4°C permitiendo la formación de puentes entre eritrocitos mientras que con las otras temperaturas se afecta la hemoaglutinina y por lo tanto la capacidad de aglutinar glóbulos rojos.

CONCLUSIONES

- 1).- Por la facilidad y el uso de poco material con reactivos es mejor trabajar la prueba de HA en microplaca.
- 2).- La temperatura ideal para correr esta prueba es de 4°C aunque a 37°C también se obtienen resultados positivos a los cuales solo se podrán tomar como referencia.
- 3).- El dominio de la técnica (microplaca) es básico para obtener menor margen de error y así mejores resultados positivos, es decir para no obtener resultados falsos positivos.
- 4).- A nivel de clínica de pequeñas especies si es posible usar la prueba de HA como alternativa de diagnóstico, ya que el tiempo ocupado en la realización y toma de la lectura es de aproximadamente 4 horas siendo los resultados confiables.
- 5).- Quizás para algunos Médicos el inconveniente sea el uso de material un poco sofisticado, (microditutores, microplaca y reactivos).
- 6).- Debido a la gran variedad de factores que pueden alterar la hemaglutinación se recomienda realizar otra prueba serológica paralela a ésta. La prueba a elegir va a depender de los medios de quien lo realice.
- 7).- La HA en tuvo es factible usarla como alternativa de diagnóstico considerando el manejo de la técnica, tipo de material, cantidad de reactivos y el tiempo de realización.

- 8).- Aunque hay reportes de que es posible usar glóbulos rojos de hamster, mono rhesus, etc. se recomienda usar glóbulos rojos de cerdo.
- 9).- La prueba de HA es posible adaptarla a consultorios particulares, ya que no requiere de aparatos sofisticados para poderlo emplear.
- 10).- Existen numerosos factores que determinan la susceptibilidad a la infección clínica por parvovirus, la restricción de alimento, inducida o voluntaria, parece ser determinante, la presentación de parasitosis y otras infecciones virales también pueden exacerbar el cuadro.
- 11).- Los perros callejeros son la fuente más común de contagio, por lo que los hábitos a los que se ha sometido el animal son determinantes en que exista o no exposición al virus.
- 12).- Una gran cantidad de casos por parvovirus son diagnosticados clínicamente, sin embargo es indispensable realizar diagnósticos más precisos con objeto de conocer más a fondo el comportamiento y epidemiología de esta enfermedad.
- 13).- La prueba de HA tiene la ventaja de ser rápida, sensible y relativamente fácil de montar.
- 14).- En caso de elegir una prueba paralela a ésta se sugiere que sea una biometría hemática, la cual al reportar una leucopenia de 1500 a 3000 leucocitos por mililitro de sangre existiría mayor seguridad de que el problema infeccioso es por parvovirus.

## B I B L I O G R A F I A

- 1).- Andrese, U. "Practical Experience of Prophylaxis and Treatment of Canine Parvovirus Enteritis". *Praktische Tierarz.*, 1981. 62.- (12). 1052-1058.
- 2).- Anónimo Artículo "Parvovirus Canina" *Laboratorio Intervet* - Mayo 1988 Pág. 3-20.
- 3).- Appel, M.J. Canine Enteritis, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1973. - 1078. 1516-1518.
- 4).- Black, J.M. Parvoviral Enteritis and Panleucopenia in Dogs. *Vet. Med. Small Animal Clinician*, Jan. 1979.
- 5).- Bringas Estrada Fernando. Análisis Comparativo de la Respuesta Inmune en Cachorros vacunados contra Parvovirus Canino. Tesis de Licenciatura. F.E.S.- Cuautitlán U.N.A.M. 1985.
- 6).- Burtonboy, G. Bazin, H. Delferriere, N. "Rat Hybridoma Antibodies Against Canine Parvovirus" *Archives of Virology*. 1982. - 71. (4). 291-302.
- 7).- Celer, V. Hejlicek, K. "Serological Demonstration of Canine Parvovirus Infection by the Haemagglutination Inhibition Test" *Veterinarni Medicina*, 1984. 29 (6).
- 8).- Cooper, B.J. Carmichael, L.E. Appel, M.G. Greisen, E. Canine Viral Enteritis II. Morphologic lesions in Natural Occurring Parvovirus Infection. *Cornell, Vet.* 1979. 134-143.
- 9).- Danner, K. Weber, S. "Laboratory Diagnosis of Canine Parvovirus"

- rus" Fortschritts des Veterinar Medizin, 1983. 37. 121-127.
- 10).- Eugster, A.K. Bendele, R.A. Jones, L.P. Parvovirus Infection in Dogs. J.A.V.M.A. (10). 1978.134.
  - 11).- Federación Canófila Mexicana, A.C. Miembro Federado de la Federación Cynologique Internationale. Malaya 44 Sur. México 19, D.F.
  - 12).- Fletcher, I.A. Tofit, J.B. and Gray, R. Histopathological Evidence for Parvovirus Infection in dogs Connell. 1982.72.16-35.
  - 13).- Gordon, J.C. Angrick, E.J. "Stray Dogs as Sentinels for Canine Parvovirus" Preventive Veterinary Medicine. 1985,3, (3) - 311-316'
  - 14).- Haesebrouck, F. Pensaert, M.B. "Parvovirus Infection in Dogs. I.A. Review of Pathogenesis and Immunity. II. Serum Prophylaxis for Puppies". Veams Diergenees Kindig Tijdschrift.1983. 52 (6). 391-398.
  - 15).- Haesebrouck, F. Pensaert, M.B. Nelissen, L. "Parvovirus Infections in Dogs III. A Field trial of Serum Prophylaxis in Pups" Veams Dieggeneeskinding Tijdschrift, 1985. 54. (2), -- 104-107.
  - 16).- Johnson, B.J. Castro, A.F. Isolation of Canine Parvovirus from a Dog Brain with severe necrotizing vasculitis and dencephalomalacia. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1984. 184. 1398-1399.
  - 17).- Macartney, L. Macartney. C.M. "Canine Parvovirus Development of Immunofluorescence and Immunoperoxidase Techniques", Research in Veterinary Science, 1986. 40. (2). 201-208.

- 18).- Macartney, L. Mc Candlish, L.A.P. Thompson, H. Cornwell, H.J.G. "Canine Parvovirus Enteritis. 2. Pathogenesis" The Veterinary Record. 1984. 115. (18) 453-460.
- 19).- Martínez A.A. "Parvovirus Canino 1º, 2º, 3º parte. Avances en Medicina Veterinaria 1987 Pág. 94-99, 149-155, 264-271, respectivamente.
- 20).- Mathys, A. Mueller, R. Pedersen, N.C. Theilen, G.H. Hemagglutination with Formalin-Fixed Erythrocytes for Detection of Canine Parvovirus. American Journal of Veterinary Research. 1983. 44 (1). 150-151.
- 21).- Medina Barrera, W.F. Diagnóstico Clínico, Tratamiento sintomático y prevención de la Gastroenteritis Hemorrágica Viral Canina. Tesis Profesional a nivel Licenciatura. F.E.S.- Cuautl-tlán, U.N.A.M. 1981
- 22).- Meunler, P.C. Cooper, B.I. Appel, M.J.G. Lanieu, M.E. Stau-son, D.O. Pathogenesis of Canine Parvovirus Enteritis; Sequen-tial Virus Distribution and Passive Immunization Studies, Veterinary Pathology. 1985. 22 (6). 617-624.
- 23).- Mc Candlish, L.A.P. Thompson, H. Fisher, E.W. Cornwell, - H.J.G.; Mac Cartney L. Walton, I.A. 1982. In Practice. 3.3; 5-14.
- 24).- Myron Molscher, D.U.M. Parvovirus Canine, Canine Practice. - November 1981. Vol. 7, No. 6 Pag. 51-53.
- 25).- Nara, P.I. Winter, K. Rice, J.B. Olsen, R.G. Krakowka, S. - Systemic and local intestinal response in dogs given both infec-tive and inactivated Canine Parvovirus. Am. J. Vet. Res. 1983. 44. 1989-1995.

- 26).- Nelson, D.T. Eustoo, S.L. Adaragh, J.O. Statz, I. Lesions of Spontaneous Canine viral Enteritis. Vet. Pathol. 1979.16. 680, 686.
- 27).- O. Sullivan, G. Durham, P.J. Smith. J.R. Campbell, R.S. Experimentally Induced severe Canine Parvoviral Enteritis. Vet. Pathol. 1984. 680 - 686.
- 28).- Polocte, R.U. Experimentally, Canine Parvovirus Infection in Dogs. Cornell Vet. 1982. 72. 103 - 117.
- 29).- Pollok, R.U.H. Carmichael. LE. Appel, M.J. Canine Viral Enteritis Update 72 nd. Annual Conference for Veterinarians. Cornell, January 1980.
- 30).- Senda, M. Hirayama, N. Yamamoto. H. Kurata, K. An Improved Haemagglutination Test for Study of Canine Parvovirus. Veterinary Microbiology. 1986. 12. (1). 1-6.
- 31).- Stephano, H.A. Epizootia de Enteritis Viral Canina en México, - posible infección por Parvovirus. Revista Xolo. Organó oficial - de la Federació Canofila Mexicana, A.C. Año VI. Junio 1981. - Pág. 14-20.
- 32).- Thompson, C.A. Gagnon. An. Canine Gastroenteritis Associated. With Parvovirus Like Agent. Can. Vet. Jour. 1978. (19) (12) 346.
- 33).- Torre López Martín Roberto, De la' "Bases del Comportamiento Canino y Beneficios en la Relación con el propietario. Tesis de Licenciatura. F.E.S.- Cuautitlán. U.N.A.M. 1986.