



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



**“DESARROLLO DE UNA PRUEBA DE ELISA
DIRECTA PARA EL DIAGNOSTICO DE
PARVOVIRUS CANINO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A
SANDRA LUZ VALDEZ MORALES

ASESOR:
M. EN C. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



INSTITUTO NACIONAL
AUTÓNOMO DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN, A. S. C.
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR FACULTAD DE ESTUDIOS
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Desarrollo de una prueba de ELISA directa para el diagnóstico de parvovirus canino"

que presenta la pasante: Sandra Luz Valdez Morales
con número de cuenta: 250117A-7 para obtener el TITULO de:
 Médica Veterinaria Zootecnista .

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HARÉ LARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlan (México), Edo. de Mex., a 10 de Septiembre de 1992.

PRESIDENTE	<u>MVZ C. Manuel Appendini Tesser</u>
VOCAL	<u>M. en C. Raúl A. Mac Crea</u>
SECRETARIO	<u>MVZ Guillermo Valdivia Ando</u>
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ Gerardo Garza Malacapa</u>
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ Enrique Flores Ganga</u>

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario y en el laboratorio de Investigación Multidisciplinario en Salud Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Parcialmente financiado por el proyecto PAPIME C-II- 8 y por la Catedra Multidisciplinaria "Mecanismos de Patogenicidad Microbiana".

**Y habéis de dar gracias a Dios en el espíritu por cualquier bendición con que seáis bendecidos.
(D y C 46:32)**

A mis Padres:

Por el gran amor con el que siempre han llenado mi vida, porque en los momentos más difíciles de mi vida ustedes han estado para ayudarme dandome animos para seguir adelante, porque sin ustedes nunca habria lograda hacer realidad este sueño.

A mis hermanos:

A Karen por todos sus regaños, a Luis y Miguel a Salome y a Selene por que sin su gran ayuda este trabajo no hubiera podido ser. Por ser los mejores hermanos del mundo.

Al señor Pimentel:

Para usted que ha sido como un segundo padre para mi le dedico este trabajo.

A mis Amigos:

Es muy poco lo que puedo expresar en estas líneas comparado con lo que siento por cada uno de ustedes. Gracias por la amistad que por tantos años me han brindado por que aunque pasen los años este sentimiento nos mantendra unidos .

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	6
Material y Métodos	7
Resultados	18
Discusión	25
Conclusiones	33
Apéndice de soluciones	34
Bibliografía	36

RESUMEN

Diversos tipos de virus pueden causar enteritis viral en caninos. En los caninos existen dos distintos parvovirus autónomos, el más importante de ellos es el parvovirus canino 2 (2,7).

La parvovirus canina es una enfermedad provocada por un virus desnudo. Es extremadamente pequeño y mide solamente 22 nm; cuyo ácido nucleico es de tipo ADN de banda sencilla.

El parvovirus canino tipo 2 depende para su replicación de la división celular, no se replica en tejidos con bajo índice mitótico. En las células infectadas forma cuerpos de inclusión intranuclear (7). El parvovirus posee una característica muy importante para su estudio la capacidad de aglutinar eritrocitos de cerdo y mono Rhesus a una temperatura de 4° C (11).

Para el diagnóstico de esta enfermedad existen varias técnicas como lo son las pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación, aislamiento en cultivo celular, microscopio electrónico, necropsia, aglutinación en látex y ELISA.

En los primeros años de la década de los 80's, las técnicas inmunoenzimáticas (ELISA) comenzaron a ser utilizadas en numerosos laboratorios como método de diagnóstico rutinario (6). Las técnicas inmunoenzimáticas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) ELISA poseen características de alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía. En este método se utilizan anticuerpos conjugados a una enzima (6,34).

La finalidad del presente trabajo fue desarrollar una prueba de ELISA directa para diagnosticar parvovirus canino y correlacionar los resultados de ésta con los resultados de la prueba de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación en heces de canino.

Se recolectaron 29 muestras de heces y suero de caninos de diferentes edades en diferentes zonas del área Metropolitana de la ciudad de México. Para la obtención de un suero hiperinmune se inocularon conejos bajo dos diferentes esquemas de inmunización. El suero de canino positivo a parvovirus se obtuvo de la misma manera. Se realizaron diferentes experimentos buscando las diluciones y concentraciones óptimas para cada uno de los reactivos. Durante la realización de la prueba de ELISA se encontró que el suero de identificación presentaba una unión inespecífica y aunque se realizaron diversos experimentos buscando eliminar este fenómeno finalmente no se pudo lograr

INTRODUCCIÓN

Durante la primera mitad del verano de 1978, repentinamente, apareció en al menos tres continentes, una enfermedad poco conocida en caninos (4). Se presentaron epizootias de gastroenteritis en poblaciones de caninos en Australia, Canadá, Sudáfrica, Nueva Zelanda, etc.; dicha enfermedad con alto grado de infectividad, se caracterizó por producir un severo daño a la pared del intestino (diarrea sanguinolenta) y muerte súbita por afectar células del músculo cardíaco (8). Para 1986 la infección era común en todo el mundo. Las investigaciones serológicas anteriores a 1978 fallaron en reconocer algún anticuerpo contra parvovirus (4).

En México se reportaron los primeros casos en los meses de marzo, abril y junio de 1980. En este año los caninos presentaron un cuadro gastroentérico con vómito blanco espumoso, diarrea profusa y fétida, con frecuencia hemorrágica y fiebre de 39.5 a 41° C. La deshidratación era muy notable y estos animales morían entre 24 y 72 horas después de presentar signos o bien se recuperaban muy lentamente siendo más afectados los pacientes menores de 1 años de edad, con una alta mortalidad y morbilidad (1,4,15).

Durante los meses de agosto y septiembre, los problemas causados por esta enfermedad aumentaron a tal grado que la Dirección General de Sanidad Animal se vio en la necesidad de intervenir para controlar la enfermedad y evitar su diseminación (23).

Esta enfermedad también se conoce como:

- Enteritis viral canina, Parvovirus canina, Enteritis hemorrágica canina,- Gastroenteritis viral canina (24).

El parvovirus canino no a sido bien caracterizado; existe cierta similitud antigenica entre el virus de la parvovirus felina (panleucopenia felina) y el virus de la parvovirus canina. Se postulo que el virus de la parvovirus canina habia surgido como una mutación de aquel (4,25, 32).

El parvovirus canino es un virus extremadamente pequeño midiendo solamente 22 nm , de ADN simple plegado, es un virus epiteliotrópico; para mantener su crecimiento requiere células hospedadoras en división activa. De aquí que las poblaciones celulares con una alta tasa de renovación son afectadas más gravemente y la vulnerabilidad de los tejidos puede variar en las diferentes etapas del desarrollo del parvovirus. (1,8,25).

Este virus posee una característica importante, que es la de aglutinar hemáties de cerdo a una temperatura de 4° C . Los cachorros infectados tienen anticuerpos que inhiben la hemaglutinación por dicho agente (8,21,24).

Básicamente existen dos formas clínicas de la infección por parvovirus:

- 1) Enteritis.
- 2) Miocarditis.

Enteritis.

Se presenta en caninos de todas las edades; pero es más severa en cachorros. Los animales afectados presenta fiebre, depresión, anorexia, vómito y diarrea de severidad variable y sangrado en el tracto gastrointestinal. La necrosis del epitelio de las criptas acarrea la pérdida de la superficie epitelial y un colapso general de la estructura vellosa (4, 13, 24).

Miocarditis.

Se presenta exclusivamente en cachorros, más frecuentemente en cachorros de 3 a 8 semanas de edad. Los signos clínicos aparecen súbitamente y progresan en forma rápida, con subsecuente infarto cardíaco (24).

Se ha visto una forma subaguda en perros de seis a doce semanas de edad, estos animales pueden sucumbir por una falla cardíaca después de varios meses (23).

El diagnóstico presuntivo se establece por antecedentes y la presentación clínica. (13, 23,31).

Para el diagnóstico de laboratorio existen varios métodos:

- Biometría hemática

Al rededor del 33 % de los casos confirmados tienen leucopenia en el momento de la presentación y en el 85 % de los casos se observa leucopenia si se realizan los exámenes seriados (32).

El total de glóbulos blancos suele variar entre 500 y 2,000/ mm³ (24).

- Microscopia electrónica.

Pueden identificarse las partículas virales durante la fase aguda (15). La muestra se centrifuga y se filtra para ser observadas al microscopio electrónico (15,24).

- Aislamiento del virus

Es posible el cultivo en células, a partir de heces, para aislar el virus (32).

- Hemaglutinación de las heces.

Esta prueba se ha utilizado para detectar la presencia del virus aunque no se ha determinado su valor diagnóstico (8, 26).

- Inhibición de la Hemaglutinación

Esta prueba serológica se considera específica para parvovirus canino, ya sea para el diagnóstico de la presencia del virus o para declarar un suero positivo a anticuerpos contra la enfermedad (24).

- Histología

Revela necrosis epitelial, denudación y necrosis de las células e infiltrado inflamatorio en la lámina propia (15,32).

- Inmunofluorescencia

Usando anticuerpos conjugados con un colorante fluorescente se puede detectar antígeno viral en secciones histológicas en una muestra de corazón o intestino delgado.

El aislamiento del virus y la prueba de hemaglutinación combinada con la prueba de Inhibición de la hemaglutinación con un suero hiperinmuno han sido tradicionalmente usados para la detección del parvovirus en heces y en contenido intestinal. Esta prueba es barata y fácil de desarrollar. La mayor desventaja es que se requiere de una continua fuente de glóbulos rojos de cerdo (7,4).

El inmunoensayo enzimático recientemente descrito en el campo biomédico, parece tener un gran potencial para ser utilizado a gran escala en patología clínica veterinaria. Esta técnica combina las ventajas de la Inmunofluorescencia y el radioinmunoanálisis y presenta pocos problemas semejante a los que se encuentran en las técnicas antes mencionadas (26).

El inmunoensayo enzimático, conocido como ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) fue descrito en 1971 por Engvall y Perlman. Al mismo tiempo que Van Weemen y Schuurs en Suecia (1971) describieron la técnica para detectar antígenos o anticuerpos en líquidos corporales como una alternativa del radioinmunoanálisis (27).

En los primeros años de la década de los 80, las técnicas inmunoenzimáticas ELISA, comenzaron a ser utilizadas en numerosos laboratorios como método de diagnóstico rutinario así como en programas de investigación.

Las técnicas inmunoenzimáticas forman parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados. El ensayo inmunoenzimático ELISA, se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática.

Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbante), el complejo antígeno - anticuerpo quedará inmovilizado y, por tanto, podrá fácilmente ser revelado mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro (35).

Existen diversas variantes del método de ELISA, se tienen métodos directos, indirectos, en sandwich, y el método de ELISA competitivo, éstos permiten la determinación de antígenos en fluidos biológicos (8)

Para fines prácticos en el presente trabajo se entenderá por una prueba de ELISA directa aquella en la que se buscan los anticuerpos, y una prueba de ELISA indirecta aquella en la cual se busca al antígeno.

El método de ELISA tiene aplicaciones muy variadas: diagnóstico de las enfermedades infecciosas, virales o parasitarias, cuantificación de hormonas, cuantificación de haptenos, titulación de anticuerpos en bajas concentraciones, determinación de isotipos específicos de anticuerpos.

La técnica de ELISA es un método simple, específico, reproducible y muy sensible (detecta antígeno y anticuerpo en concentraciones del orden de los nanogramos) (5). Sus ventajas pueden ser evaluadas en términos de sensibilidad, especificidad, fiabilidad, facilidad de realización o posibilidad de automatización (35).

ELISA presenta grandes ventajas ya que los reactivos marcados son de alta estabilidad, permiten una completa automatización del sistema, los resultados son objetivos y los antígenos marcados con enzima pueden ser manejados en condiciones normales de laboratorio.

Actualmente los casos de enteritis aguda por parvovirus se limitan en gran medida a cachorros y perros jóvenes, pero la parvovirus canina sigue siendo probablemente la enfermedad infecciosa más importante en la actualidad y seguramente la más común (3,10).

OBJETIVOS

- 1.- Desarrollar una prueba de ELISA directa para diagnóstico de Parvovirus Canino.**
- 2.- Correlacionar los resultados de la prueba de ELISA con los resultados de la Hemaglutinación en heces de canino, en una población abierta.**

MATERIAL Y MÉTODOS

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE ELISA (MÉTODO GENERAL)

Para la sensibilización y el desarrollo de la prueba de ELISA se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pozos marca Costar E.I.A./R.I.A. de mediana adherencia agregándose 100 ul de un suero de captura y 100 ul de solución reguladora de carbonato e incubando 12 horas a 4° C.

En cada placa se desarrollaron dos testigos de la placa (sin suero de captura).

Se eliminó la solución sensibilizante y la placa se lavó con solución de lavado PBS-TWEEN 20 aplicándose 200 ul en cada pozo, repitiéndose el lavado cinco veces con esta solución y dos veces al final con agua destilada.

El bloqueo se realizó saturando los sitios de la microplaca con 200 ul de solución de gelatina al 0.25%, la placa se dejó incubar 4 horas a 37° C.

Se manejó como antígeno viral virus vacunal vivo modificado, marca Solvay con un título entre 64 y 1024 UHA, agregándose 100 ul por pozo e incubándose 1 hora a 37° C. En algunas placas se utilizó virus vivo cepa Cornell 780916 cultivado en células A 72 y en estos casos se agregó un pozo sensibilizado con células A 72 sin infectar.

Para el anticuerpo de identificación se agregaron 100 ul de éste a cada pozo y se incubó durante 30 min.

El conjugado utilizado fue un suero anti inmunoglobulina de canino (IgG) obtenido en conejo y peroxidado (Sigma), agregándose 100 ul por pozo a toda la placa a la dilución óptima obtenida en el presente trabajo y se incubó 1 hora a 37°C.

El cromógeno utilizado fue el O-fenilendiamina (OPD) a una concentración de 4 ug en 10 ml de regulador de citratos, agregándose 100 ul por pozo e incubando 15 min. en oscuridad.

La reacción se paró agregando 50 ul del ácido sulfúrico 1N a cada pozo.

Las placas se leyeron en un lector de placas y policubetas marca Metrolab 970 a 450 nm. anotando las absorvancias obtenidas.

l) Obtención y caracterización de Inmunoglobulinas de Conejo utilizadas como anticuerpo de captura.

Para la obtención de inmunoglobulinas contra Parvovirus canino se utilizaron 4 conejos blancos raza Nueva Zelanda del Centro de Producción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan.

Los conejos se inocularon con virus vacunal Nobi-Vac PARVO-C marca Intervet, siguiendo los esquemas de inmunización de las tablas no I y II.

TABLA No 1
Esquema de Inmunización de los Conejos No. I

DIA	DOSIS DE VIRUS (256 UHA/ml)	VIA
1	1 ml + 0.3 ml adyuvante*	IM
3	1 ml + 0.3 ml adyuvante*	IM
12	1 ml en dos lugares	IM
16	Primera sangría	IC
17	1 ml en dos lugares	IM
22	1 ml	IV
26	1 ml	IV
33	Segunda Sangría	
40	Sangría a Blanco	

* Adyuvante Completo de Freud, marca Sigma.

IM Intramuscular

IC Intracardiaca

IV Intravenoso

Tabla No. 2

Esquema de Inmunización de los Conejos No. II

DIA	Dosis de Virus (256 UHA/ml)	Vía
0	0.5 ml + 0.3 ml adyuvante*	SC.
13	Primera Sangría	IC.
14	0.5 ml	IM.
27	Segunda Sangría	IC.
30	Sangría Blanco	

*Adyuvante Completo de Freud, marca Sigma.

IM Intramuscular

IC Intracardiaca

SC Subcutaneo

Las sangrías se realizaron con tubos tipo Vacutainer de 10 ml y agujas calibre 21, sin anticoagulante marca Becton Dickinson.

Se puncionó por vía intracardiaca obteniéndose de 5 a 10 ml de sangre en cada sangría y la mayor cantidad de sangre posible en la final.

Los tubos con sangre se incubaron de 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, se separó el coágulo antes de incubar con el objeto de facilitar su retracción. El suero se separó mediante centrifugación a 3,500 r.p.m. durante 15 minutos en una centrifuga marca National Health Laboratories.

Posteriormente el suero se almacenó en tubos con tapón de rosca a 4°C hasta su posterior utilización.

Para la obtención de inmunoglobulinas se utilizó la técnica de precipitación con sulfato de amonio saturado (14).

Para la determinación de proteínas se realizaron dos técnicas: la Técnica de Biuret (Bioxon), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y la técnica de Braddfort (16) como se describe a continuación:

El estándar de proteínas se diluyó 1:10 con PBS pH 7.0 ; en seis tubos se colocaron 0.5 ml de PBS pH 7.0. Se adicionaron 0.5 ml de solución de proteína diluida al primer tubo, y se agitó levemente, después se transfirieron 0.5 ml al segundo tubo haciendo lo mismo con los demás tubos.

De cada tubo se otmaron 100 ul y se agregaron 3.0 ml de solución de trabajo. Adicionalmente se agregaron 100 ul de PBS pH 7.0 en un tubo (blanco). Se agitó y se reposó por 15 min. y se leyó contra blanco de reactivos.

La prueba se desarrolló diluyendo la muestra a manera de que entrara en la curva. Se marcaron tres tubos: blanco, estándar y problema y se agregaron 100 ul de PBS pH 7.0, solución estándar y muestra problema respectivamente a cada tubo. A cada tubo se le agregaron finalmente 3.0 ml de la solución de Braddfort de trabajo.

Se reposaron los tubos y se leyeron contra el tubo blanco. Las lecturas del problema y el estándar se interpolaron en la curva.

Títulación de anticuerpos contra Parvovirus.

Para la evaluación de anticuerpos contra Parvovirus canino en el suero y en la fracción de inmunoglobulina de los conejos se realizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación según la técnica de Carmichael (4) bajo las siguientes condiciones:

- Virus a 4 UHA en 50 ul.
- Temperatura de 4°C.
- Globulos rojos de cerdo al 1%.

II Optimización de la Concentración de Inmunoglobulinas y la Concentración de Virus.

La sensibilización se realizó como se mencionó, haciendo diluciones del suero de captura y del virus vacunal.

En este experimento el anticuerpo de identificación usado, obtenido de un canino hiperinmunizado (ver posteriormente), se usó sin diluir.

III Selección del Bloqueador.

En este experimento únicamente se sensibilizaron los pozos testigo en la forma antes mencionada, el resto de la placa no se sensibilizó, después se lavó toda la placa como se mencionó y posteriormente se bloqueó.

En este ensayo los cinco bloqueadores se manejaron disueltos en PBS o en solución reguladora de carbonato como se indica en la siguiente tabla:

PREPARACIÓN DE BLOQUEADORES

	PBS	*SOL. REGL. CARBONATO
Leche 5 % (svelty's)	0.5 g + 10 ml	0.25 ml + 5 ml
Suero fetal bovino 5 % (In vitro)	0.5 ml + 10 ml	0.25 ml + 5 ml
Caldo soya tripticaseína (Bioxon)	200 ul	100 ul + 100 ul
Albúmina 2 % (Organon técnica)	0.2 ml + 1.8 ml	0.2 ml + 1.8 ml
Suero Conejo	200 ul	100 ul + 100 ul

* SOL REG. CARBONATO: Solución reguladora de carbonatos.

Después de incubar y lavar se agregaron a la placa virus diluido 1:4 o células A 72 sin infectar diluidas 1:10; colocándolas por pares. El anticuerpo de identificación se usó diluido 1:32, el resto de la placa se desarrolló como ya se mencionó.

IV Determinación de la concentración óptima de Antígeno Viral.

A) Heces de Canino

Se recolectaron muestras de excremento provenientes de animales de diferentes edades, recolectadas en clínicas particulares de diversas zonas del área Metropolitana de la ciudad de México. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de Diagnóstico Integral Veterinario (DIVET)

A las muestras recolectadas se les realizó la prueba de hemaglutinación en heces para determinar la presencia de virus como se indica en seguida:

Prueba de Hemaglutinación en Heces

La muestra de heces se diluyó 1:10 con PBS-S pH 6.8 y se centrifugó a 2,000 r.p.m. durante 10 min. y posteriormente se separó el sobrenadante, el cual se inactivó 15 minutos a 56 °C.

- 1.- En una microplaca de fondo en U se agregaron 50 ul de PBS-S pH 6.8 a 12 pozos.
- 2.- Se agregaron 50 ul de heces inactivadas y diluidas al primer pozo y se realizaron diluciones hacia la derecha desechando los últimos 50 ul.
- 3.- Se agregaron 50 ul de PBS-S pH 6.8 a los doce pozos.
- 4.- Se agregaron 100 ul de glóbulos rojos de cerdo al 1 %.
- 5.- Se incubó a 4°C.
- 6.- Se leyó la placa a las cuatro horas de incubación.

Testigos

Testigo negativo	100 ul PBS-S pH 6.9 + 100 ul de glóbulos rojos al 1 %
Testigo de heces	100 ul heces sospechosas + 100 ul de glóbulos rojos
Testigo positivo	100 ul de virus + 100 ul de glóbulos rojos
Testigo de placa	100 ul de glóbulos rojos.

A las heces que fueron positivas por hemaglutinación se les realizó la prueba de Inhibición de la hemaglutinación.

Inhibición de la Hemaglutinación en Heces.

1.- Se tomaron 0.5 ml de las heces positivas y agregaron 0.5 ml de suero hiperinmune.

2.- Se incubaron durante 30 min. a 37°C.

3.- Con esta muestra se volvió a montar la prueba de hemaglutinación. La muestra se consideró positiva a Parvovirus Canino si se inhibía la hemaglutinación.

Testigos

Testigo negativo de glóbulos rojos: Solo 100 ul de glóbulos rojos al 1 %.

Testigo positivo 100 ul de virus diluido a 8 UHA + 100 ul de glóbulos rojos.

Testigo negativo de suero hiperinmune: suero hiperinmune diluido 1:10 + 100 ul de globulos rojos.

B) Dilución de la vacuna en heces negativas.

Un gramo de alguna de las heces que resultaron negativas a Parvovirus en el experimento anterior se disolvió en 4 ml de PBS pH 7.0 se homogenizó y se centrifugó a 3,500 r.p.m. Con el sobrenadante se prepararon las heces positivas y negativas.

Heces positivas: 1ml del sobrenadante de las heces negativas más 1 ml del virus vacunal.

Heces negativas: 1 ml del sobrenadante de las heces negativas más 1 ml de PBS p H 7.0.

Se incubaron 1 hora a 37°C.

C) Desarrollo de la prueba

Para la determinación óptima del antígeno viral se desarrollaron pruebas sensibilizando con suero de captura como se menciona anteriormente y se probaron las heces preparadas como positivas y las negativas realizando diluciones dobles de estas y utilizándolas como antígeno en la prueba de ELISA.

En otro experimento se sensibilizó la mitad de la placa de la misma forma general pero ahora el virus vacunal se diluyo en PBS pH 7.0 y en sobrenadante de otras heces negativas. En esta ocasión se agregaron otros testigos:

- Un pozo con PBS Negativo
- Un pozo con sobrenadante de heces Negativo
- Un pozo con sobrenadante de heces negativas + células A 72 diluidas 1:10
- Un pozo con PBS pH 7.0 + Células A72 diluidas 1:10

V Obtención del Suero de Identificación

1) Inmunización.

Para la obtención de suero de canino positivo a Parvovirus se inoculó un canino, hembra, criollo de cuatro meses de edad resguardado por el Centro Antirrábico de Cuautitlan México.

Se utilizó virus vacunal marca Solvay con un título de 320 UHA . Se realizó un sangrado previo al inicio de la inoculación como referencia y posteriormente una sangría cada que se inoculaba como se muestra en el siguiente esquema:

Esquema de Inmunización

Día	Dosis Virus (256 UHA/ml)	Vía
0	1ml	IM
7	1 ml	IM
14	1 ml	IM
21	No se inoculó	
28	-	
35	2 ML	IM.IV
42	No se inoculó	
49	SANGRIA	
54	SANGRIA	

IM Intramuscular
IV Intravenoso

Las sangrías finales se realizaron con punzocat calibre 18, sangrando por vena yugular. La sangre se recolectó en frascos de vidrio de 250 ml llenando hasta la mitad del recipiente, se taparon y se inclinaron. Se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas y después se recolectó el sobrenadante y se centrifugó durante 15 min en refrigeración. Los coágulos se refrigeraron a 1°C doce horas y posteriormente se separó el suero por decantación y se centrifugó.

El suero recolectado se almacenó en recipientes de plástico con 10 ml cada uno y se congeló hasta su utilización.

Para la obtención de inmunoglobulinas inicialmente se utilizó la técnica de precipitación con sulfato de amonio saturado (14); pero se modificó la concentración original de 33% de saturación a un 60 % de saturación.

La determinación de proteínas se realizó con la técnica de Bradford (16) y la técnica de Bioxon.

Para la evaluación de anticuerpos se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación según la técnica de Carmichael (4).

2) Selección de otros sueros de Identificación.

Para la selección de otros sueros de identificación se obtuvieron cuatro caninos de propiedad particular de diferentes edades, que ya tenían su calendario de vacunación, identificados como Dana, Misha, Max y Parila. A éstos se les muestreo y se tituló el suero por la técnica de Inhibición de la hemaglutinación.

Dos de estos sueros además del suero del canino del antirrábico y sus inmunoglobulinas se evaluaron por la técnica de ELISA indirecta que a continuación se describe.

La ELISA indirecta se desarrolló de la siguiente forma: la sensibilización se realizó agregando virus vacunal a diferentes diluciones y células A 72 diluidas 1:10 sin infectar. El resto de la placa se realizó de la misma forma que ya se menciona.

3) Determinación del tipo de Inmunoglobulina presente en el suero de Identificación.

Para conocer el tipo de inmunoglobulina presente en los sueros de los caninos convencionales se les realizó un tratamiento con Rivanol de la siguiente manera (9,19):

Se inactivó el suero calentándolo 15 min. a 56°C, después se agregaron glóbulos rojos de cerdo previamente lavados, volumen a volumen, y se incubo 1 hora a 4°C con agitación constante.

Se colocaron 0.5 ml del suero de identificación más 0.5 ml de reactivo de Rivanol al 1 % (10,20).

Se incubaron 30 minutos a 37°C, después se centrifugaron a 3,500 r.p.m. Del sobrenadante se tomaron 100 ul para montar la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Al mismo tiempo se metió el suero del mismo animal sin ser tratado con Rivanol diluido 1:2 con PBS-S pH 6.8 como testigo.

4) Optimización del Suero de Canino para la prueba de ELISA.

La fracción inmunoglobulina del suero de canino del antirrábico y el suero de Dana se utilizaron como sueros de identificación para realizar una prueba de ELISA directa buscando la dilución óptima de éste. La placa se sensibilizó con suero de captura y agregando virus vacunal a diluciones dobles iniciando con virus directo y células A 72 diluidas 1:10. El resto de la placa se desarrolló como ya se mencionó.

Se realizaron las siguientes variaciones:

- Diluciones dobles de las inmunoglobulinas del suero de identificación y del virus vacunal.

- Diluciones dobles del suero de identificación iniciando con el suero directo.

El resto de la placa se desarrolló como ya se menciono.

VI Optimización del Conjugado

Para conocer la dilución óptima de trabajo del conjugado anti-IgG canino se sensibilizaron dos columnas manejando ocho diferentes diluciones iniciando con la dilución 1:5000, 1:10000, 1:20 000, 1:40 000, 1:80 000, 1: 160 000, 1:320 000 y 1:640 000.

Otras placas se sensibilizaron con virus y células A 72 de la forma antes mencionada. Se manejaron cuatro diferentes diluciones del conjugado:

1:2,500
1:5,000
1:10,000
1:20,000

El resto de la placa se desarrolló como se menciona anteriormente.

VII Eliminación de la reacción inespecífica (ruido de fondo).

Para la eliminación de la reacción de ruido de fondo se realizaron varios experimentos con las siguientes variaciones:

1.- Se realizó un tratamiento del suero de identificación con un suero de conejo normal, el tratamiento se hizo de la siguiente manera:

Al suero de identificación se le agregó un volumen igual de suero de conejo normal, se incubó 15 min a 37°C, posteriormente se realizaron diluciones dobles de este suero tratado. La placa se desarrolló de la misma forma agregando virus vacunal diluido 1:4 y células A72 diluidas 1:10.

El suero tratado y el suero sin tratamiento se probó bajo diferentes tiempos de incubación.

2.- Modificando el pH de la reacción e inactivando la peroxidasa endógena.

En este caso se probaron cuatro sueros de identificación. Esta placa se sensibilizó con virus vacunal y células A72 diluidas 1:10, el suero de identificación se manejó a diluciones dobles. Para la inactivación de la peroxidasa endógena se agregaron 100 ul de metanol + H₂O₂ al 3% y se incubó 30 min. a temperatura ambiente.

3.- Diluyendo el suero de identificación 1:100 en PBS pH 7.0

A partir de ésta se realizaron diluciones dobles. La placa se sensibilizó con virus diluido 1:2, 1:8, 1:32, 1:128. Un suero negativo a Parvovirus por inhibición de la hemaglutinación se corrió junto con uno de los sueros de identificación, la mitad de la placa se utilizó para un suero y la otra mitad para el otro suero.

4.- Modificando la temperatura.

La sensibilización se hizo como se mencionó en la prueba anterior pero en este caso el lavado y el bloqueo se realizaron en frío a 4°C. El suero de identificación positivo y el suero negativo se diluyeron en PBS pH 7.0 a 4°C iniciando con la dilución 1:100 y a partir de ésta se hicieron diluciones dobles y se agregaron a la placa la que se mantuvo a esta misma temperatura incubándose con el suero toda la noche a 4°C.

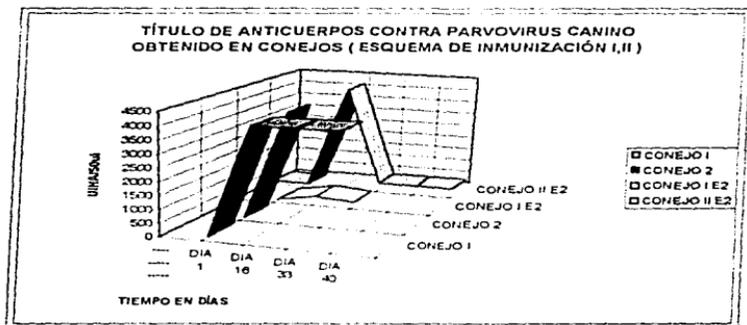
5.- Cambiando el diluyente del suero.

La placa se sensibilizó con virus diluido 1:2, 1:8 y con células A72 diluidas 1:10. En este experimento el suero de identificación y el suero negativo se diluyeron en PBS-TWEEN 20 más dos gotas de albúmina bovina, con esta solución se hicieron diluciones dobles iniciando con la dilución 1:100 y se incubaron ambos sueros a 37°C durante 90 min. El resto de la placa se desarrolló de la forma ya descrita agregando 100 ul de las muestras de heces inactivadas y diluidas 1:10 en PBS pH 7.0. El suero de captura se utilizó diluido 1:8.

RESULTADOS

Los títulos de anticuerpos contra Parvovirus obtenidos en conejos mediante los esquemas de inmunización I y II se observan en la siguiente gráfica.

GRÁFICA 1



Conejo 1 E1: Conejo 1 Esquema de Inmunización I

Conejo 2 E1: Conejo 2 Esquema de Inmunización I

Conejo I E2: Conejo I Esquema de Inmunización II

Conejo II E2: Conejo II Esquema de Inmunización II

UIHA/50ul: Unidades inhibitoras de la hemaglutinación en 50 ul.
Se utilizaron 8 UHA del virus para la prueba.

TABLA No. 3

Determinación de la actividad específica de los anticuerpos contra el parvovirus canino en suero de conejo.

	PROTEÍNA		ANTICUERPOS			
	SUERO (mg/100 ml)	Inmunoglo (mg/100ml)	SUERO *UIHA/ 50 ul	Inmunoglo *UIHA/ 50 ul	SUERO *UIHA mg PROT	Inmunoglo
ESQ I conejo1	6,976	0,952	1,024	256	588,6	2151,2
ESQ I conejo2	5,81	0,243	4,096	1024	1539,8	8462,8
ESQ II conejo 1	8,496	3,175	128	0	30,1	1,58
ESQ II conejo 2	9,324	1,189	64	64	13,73	107,7

ESQ I Conejo 1 : Esquema de Inmunización 1 conejo 1.
 ESQ I Conejo 2 : Esquema de Inmunización 1 conejo 2.
 ESQ II Conejo 1 : Esquema de Inmunización II conejo 1.
 ESQ II Conejo 2 : Esquema de Inmunización II conejo 2.

Proteína: Técnica de Bradford.

*UIHA: Unidades inhibidoras de la hemaglutinación . Se utilizaron 8 unidades aglutinantes.

Al realizar el experimento buscando la dilución óptima de las inmunoglobulinas de captura y la concentración de virus todas las absorbancias fueron iguales.

TABLA No. 4

El resultado del efecto de las diversas proteínas usadas como bloqueador en la prueba de ELISA se observan en la tabla numero 3.

Bloqueador	- PBS	- CBC
	A As	A As
Leche	0,063	0,001
SFB 5 %	0,001	0,001
CST	0,066	0,118
Albúmina	0,031	0,208
Suero conejo	0,056	0,001

*PBS: Proteínas diluidas en solución reguladora de fosfatos.

*CBC: Proteínas diluidas en solución de carbonato bicarbonato.

As: Cambio de Absorbancias.

TABLA No. 5

Determinación de la presencia del Parvovirus en heces de canino.

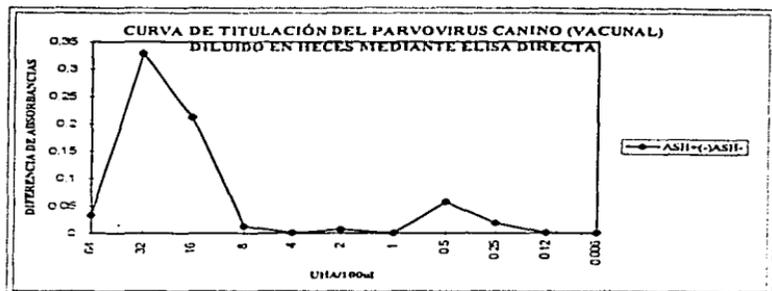
no.identif	* HA	**IHA
1	NEGATIVO	NR
2	NEGATIVO	NR
3	NEGATIVO	NR
4	NEGATIVO	NR
5	NEGATIVO	NR
6	NEGATIVO	NR
7	NEGATIVO	NR
11	NEGATIVO	NR
16	NEGATIVO	NR
17	NEGATIVO	NR
23	NEGATIVO	NR
24	NEGATIVO	NR
25	NEGATIVO	NR
29	NEGATIVO	NR
20	40960	NEGATIVO
12	40960	4096
13	40960	4096
14	40960	20480
15	40960	40960
8	40960	20480
9	40960	20480
10	40960	40960
21	40960	40960
22	40960	40960
26	40960	40960
27	40960	40960
28	40960	40960
18	40960	40960
19	40960	40960

*HA: Prueba de Hemaglutinación con eritrocitos de cerdo.

**IHA: Prueba de Inhibición de la hemaglutinación que se refiere al inverso de la dilución máxima que se inhibió con el suero de conejo conteniendo 128 UIHA/50 ul.contra el Parvovirus.

NR: No realizada.

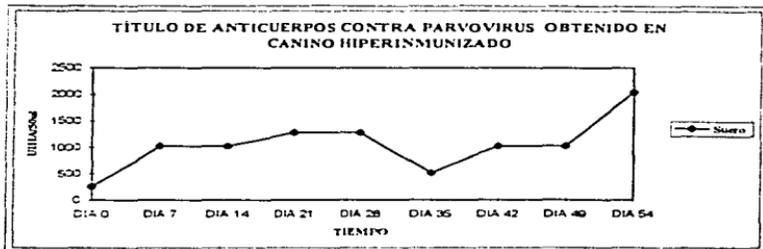
GRÁFICA 2



ASH+(-)ASH-: Absorbancia de heces positivas menos la absorbancia de las heces negativas.

En el experimento en el que el virus se diluyó en PBS y en sobrenadante de otras heces las lecturas obtenidas estuvieron por debajo de 0.00 en toda la placa.

GRÁFICA 3



Suero: Se refiere al suero de canino hiperinmunizado con virus vacunal.

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA CONTRA EL PARVOVIRUS EN
SUERO DE CANINO.**

TABLA No. 6

	Concentración de proteínas		Anticuerpos contra Parvovirus			
	SUERO mg/100 ml	GAMA mg/100 ml	SUERO U/ml x 50 ml	GAMA** U/ml x 50 ml	SUERO U/ml x mg proteína	GAMA
ANTIRRÁBICO 1	10,067	NO	2048	NO	400,9	NO
ANTIRRÁBICO 2	10,675	1,128	4096	0	767,47	0

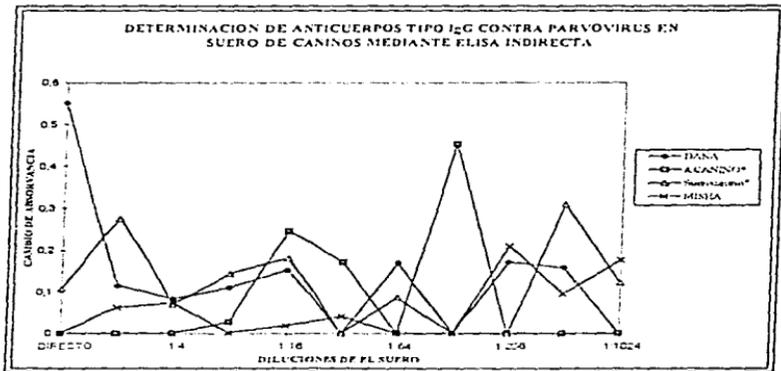
*NO. NO SE OBTUVIERON

**Gama: Precipitado del suero al 60 % de saturación

ANTIRRÁBICO 1: Suero del canino del antirrábico obtenido el 19 de diciembre.

ANTIRRÁBICO 2: Suero del canino del antirrábico obtenido el 27 de diciembre.

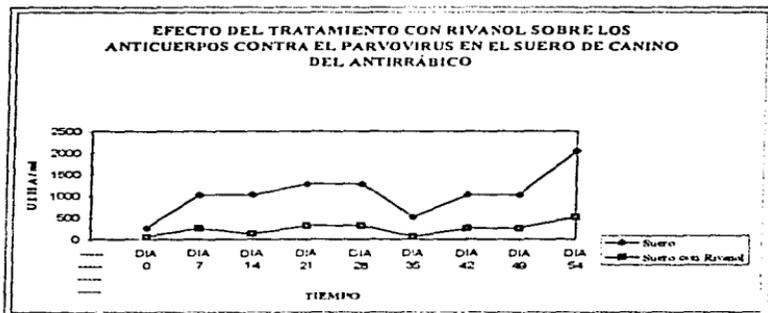
GRAFICA 4



*& canino: Gamaglobulinas del suero de canino del antirrábico obtenidas por precipitación con sulfato de amonio.

Suero de canino: Suero de canino del antirrábico hiperinmunizado.

GRÁFICA 5



GRÁFICA 6



Suero 1 DANA
Suero 4 ANTIRRÁBICO

Suero 2 MISHA
Suero 3 MAX
Suero 5 PARILA

TABLA No. 7

Título de anticuerpos contra parvovirus en suero de caninos tratados con rivanol.

IDENTIFICACION	SUERO SIN TRATAMIENTO	SUERO CON RIVANOL
DANA	1024	512
MISHA	8112	2048
MAX	2048	NEGATIVO
ANTIRRABICO	2048	512
PARILA	1024	NEGATIVO

La placa desarrollada con inmunoglobulinas del suero de canino del antirrábico no desarrolló color. En la prueba desarrollada con suero las lecturas fueron similares para pozos con células que para los pozos con virus.

TABLA No. 8

ELIMINACIÓN DE LA ABSORVANCIA (ESPECÍFICA (RUIDO DE FONDO))	
TRATAMIENTO	ELIMINACIÓN DEL RUIDO DE FONDO
SUERO DE IDENTIFICACIÓN CON SUERO DE CONEJO NORMAL	NO
MODIFICACIÓN DEL pH	NO
INACTIVACIÓN DE LA PEROXIDASA ENDOGENA	NO
DILUCIONES DOBLES DEL SUERO DE IDENTIFICACIÓN 1:100	LEVEMENTE
MODIFICACIÓN DE LA TEMPERATURA	NO
MODIFICACIÓN DEL DILUYENTE DE TRABAJO	NO

DISCUSIÓN

Para el desarrollo de la prueba de ELISA directa se llevaron a cabo varios experimentos buscando establecer las diferentes diluciones y concentraciones óptimas de trabajo de cada uno de los elementos empleados en esta prueba.

Los resultados que se muestran en la gráfica 1 indican que después de realizar dos diferentes esquemas de inmunización en los conejos, ambos son capaces de provocar una respuesta inmune humoral y el desarrollo de títulos de anticuerpos. En el caso del conejo 1, del esquema 2, el cual no logró desarrollar títulos de anticuerpos fue debido a problemas de enfermedad y tuvo que ser sacrificado en los primeros días de iniciado el esquema. Los restantes conejos lograron responder satisfactoriamente, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura donde se menciona la utilización de conejos y la aplicación de adyuvante completo de Freud (37).

Se describe como adyuvante a una sustancia que se mezcla con el inmunógeno para aumentar la respuesta inmune hacia éste. Muchos de los adyuvantes son bacterias o sus productos, tales como Bordetella pertussis o endotoxinas de organismos gram negativos, mientras que otros no lo son (tartrato aluminico de potasio o alumbre, fosfato de calcio, aceite mineral, lanolina, diversos agentes tenso depresores, polinucleótidos y otros (8,25,26,38).

Las micobacterias muertas constituyen adyuvantes especialmente potentes, por ejemplo inoculados junto con antígenos proteicos conocidos, aumentan la respuesta inmune de manera múltiple. Actualmente, el adyuvante de mayor uso es el de Freud. El llamado adyuvante "incompleto" de Freud es una mezcla de un aceite mineral con un detergente en diferentes proporciones.

El adyuvante "completo" de Freud contiene una micobacteria (M. tuberculosis, M. bovis, M. phlei u otros) cuya cantidad es variable. La acción de los adyuvantes, no es debida únicamente a la adsorción del antígeno, lo que hace que el mismo se libere de a poco produciendo un efecto similar al de las reestimulaciones, sino que interviene también el granuloma formado en el punto de inoculación. El modo en que actúan los adyuvantes es complejo: la mayoría aumentan la función fagocitaria de los macrófagos permitiendo la digestión del antígeno y su adecuada presentación a linfocitos T cooperadores (8,25,26, 37).

Posterior a la inmunización de los conejos, la obtención de inmunoglobulinas fue realizada por medio de la técnica de precipitación con sulfato de amonio (14) la que demuestra ser útil para estos fines ya que permitió la concentración de las inmunoglobulinas de conejo.

Cómo se puede observar en la tabla 3 al inicio el suero de conejo contenía una mayor cantidad de proteína y un mayor título por la técnica de inhibición de la hemaglutinación, posterior a la precipitación el título de unidades inhibitorias de la hemaglutinación por miligramo de proteína es mayor en las gamaglobulinas que en el suero, esto concordó con lo realizado por Veijalainen (38) y comprueba la utilidad de la técnica de precipitación con sulfato de amonio a un 33% de saturación para concentrar gamaglobulinas en suero de conejos.

Tras la evaluación de cinco diferentes proteínas, los resultados de la tabla 4 muestran que ninguna proteína logra bloquear la placa ni disminuir la unión de las inmunoglobulinas de canino al soporte, aunque las proteínas se mezclen con PBS o con solución reguladora de carbonatos, éstas continuaron adhiriéndose en forma inespecífica al fondo de la placa.

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos de la prueba de hemaglutinación en las 29 muestras de heces problema. En catorce de estas muestras se obtuvieron resultados negativos. Las 15 muestras restantes tuvieron títulos positivos por arriba de 40,960 UHA, realizada la prueba de inhibición de la hemaglutinación con un suero hiperinmune obtenido en conejo con un título de 128 UHA solo una muestra fue negativa. Es decir que tras realizar la inhibición de la hemaglutinación esta muestra continuo aglutinando eritrocitos de cerdo

Con este resultado que se incluye en la misma tabla 5 podemos demostrar que el realizar una prueba de hemaglutinación en heces como única prueba para diagnosticar parvovirus en un animal sospechoso no es suficiente para confirmar la enfermedad como lo mencionó Martínez M ya que en las heces pueden encontrarse diversos factores que provoquen la hemaglutinación de las eritrocitos sin ser específicamente parvovirus el que lo esté provocando (12).

Por esta razón es necesario realizar conjuntamente con la prueba de hemaglutinación la prueba de inhibición de la hemaglutinación en heces con un suero hiperinmune específico (4) para comprobar que si se logra inhibir la hemaglutinación, esta inhibición esta dada por la inactivación del virus por el suero y a su vez esa primera hemaglutinación es provocada por el virus, de lo contrario no se puede asegurar que la hemaglutinación esté directamente provocada por dicho virus ya que como lo menciona Teramoto (36) la prueba de hemaglutinación puede ser afectada por diversos factores presentes en la materia fecal resultando en aglutinaciones inespecíficas, para lo cual la especificidad de la aglutinación deberá ser confirmada por inhibición de la hemaglutinación.

También se debe considerar que en los resultados existen falsos negativos, en donde el virus infeccioso puede ser eliminado por largos periodos en cantidades que no son detectables por la prueba de hemaglutinación o la eliminación conjunta de anticuerpos secretores específicos. (Carmichael Congreso AMMVEPE 1997, 28).

Para poder titular una muestra de heces por esta técnica se lleva a cabo un tratamiento de las heces, como se menciona en la sección de material y métodos. Simultáneamente con la titulación de las muestras problemas se realizaron dos variantes en este tratamiento, tratando de saber si el omitir dos pasos de dicho tratamiento podría influir en el resultado. Las variables que se manejaron fueron la inactivación de las heces a 56°C y la dilución de las heces en PBS salino. Tres de las veintinueve muestras recolectadas se titularon inactivándose y sin inactivarse, diluidas y sin diluir en el PBS salino. Los resultados vistos en esta prueba demostraron que la inactivación no interfiere con la prueba. Inactivar o no una muestra de heces no modifica el resultado, de la misma manera diluir o no diluir la muestra ya inactiva con PBS salino tampoco modifica el resultado. En un estudio realizado en 1984 se compararon diferentes métodos de extracción de la materia fecal, estas pruebas incluyeron extracción con cloroformo y tratamientos con detergentes iónicos y no iónicos, altos y bajos pH buffers y buffers con pH neutro. Ninguno de los métodos fue más eficiente que la extracción en buffer a pH neutro por su simplicidad y fácil manejo en grandes volúmenes de muestras. De la misma manera el restarle dos pasos al método de preparación de las heces para su posterior titulación ahorran tiempo y no alteran los resultados obtenidos. (37)

Una vez comprobado que esas tres muestras de heces eran negativas, se agregó un volumen igual de virus vivo vacunal con un título de 320 UHA y se volvieron a titular. Solo en dos de estas muestras al agregarse el virus fueron positivas y la otra continuó siendo negativa. Este resultado se atribuyó a la presencia de sustancias en estas heces que fueron capaces de inactivar o inhibir el virus. Este hallazgo se considera muy importante ya que en la práctica cotidiana se puede tener un animal sospechoso de parvovirus y al titularse por esta prueba resultar negativo aunque en realidad tenga el virus en heces pero no pueda titularse por la presencia de factores que lo estén inactivando como por ejemplo los coproanticuerpos (30), al mismo tiempo, esto refuerza lo que se mencionó respecto a realizar una prueba de hemaglutinación como única prueba diagnóstica en un animal sospechoso.

Los coproanticuerpos IgG, IgM e IgA son secretados activamente dentro del intestino en animales con gastroenteritis por parvovirus (30). En un experimento realizado se detectaron los niveles de anticuerpos IgG, IgA, e IgM en heces (coproanticuerpos) de animales con gastroenteritis por parvovirus. Los anticuerpos IgA e IgM fueron los más abundantes en las heces y estos mismos animales tuvieron un bajo título de hemaglutinación en heces. A mayor cantidad de coproanticuerpos los títulos de hemaglutinación en heces fueron menores (30).

Como antígeno para la prueba de ELISA se seleccionaron tres heces problemáticas que fueron negativas por la prueba de hemaglutinación.

Una vez seleccionada una muestra de heces que fuera negativa por la prueba de hemaglutinación y que al agregar virus fuera positiva, la muestra se probó pero ahora por la prueba de ELISA, como se muestra en la gráfica 3 la prueba de ELISA es capaz de detectar entre 64 y 8 UHA de virus en 100 ul.

La prueba de ELISA es altamente sensible y con una alta especificidad. Entendemos por sensibilidad la capacidad de un sistema de medida para detectar pequeñas cantidades de sustancias, y especificidad la capacidad del sistema para medir sólo la sustancia de interés (33). Refiriéndonos al diagnóstico la sensibilidad se refiere a la frecuencia de pruebas positivas en animales enfermos, y la especificidad a la frecuencia de pruebas negativas en animales sanos.

Se han desarrollado diferentes experimentos comparando la sensibilidad de la prueba de ELISA con otras pruebas como la prueba de Aglutinación en Látex y la prueba de hemaglutinación en heces. En estos experimentos (38) se obtuvo que la prueba de ELISA fue la más sensible, detectando 67 (100 %) muestras positivas.

La prueba de hemaglutinación detectó 64 (96 %) muestras positivas, y la prueba de aglutinación en Látex detectó 61 (91 %) muestras positivas (39). En otro estudio se comparó la prueba de ELISA, con las pruebas de Hibridación del DNA, Microscopía Electrónica y hemaglutinación para la detección del parvovirus. Se obtuvo una excelente correlación entre los valores de ELISA y títulos de hemaglutinación en muestras de heces. Aproximadamente el 95 % de las muestras positivas a ELISA fueron positivas por hemaglutinación, la correlación de la prueba de ELISA con hibridación del ADN y el Microscopio Electrónico fue menor. En conclusión se encontró que la prueba de ELISA es más confiable que las otras pruebas (36).

Es importante mencionar que es difícil pensar que pruebas tan sensibles y específicas como la Microscopía Electrónica y la hibridación del ADN hayan sido menos sensibles que la prueba de ELISA en dicho experimento, ya que la prueba de hibridación se basa en el ADN de la partícula viral y la Microscopía Electrónica identifica a la partícula viral como tal. Debido a la tecnología tan avanzada que estas técnicas manejan, dichas pruebas son altamente sensibles y exactas. Sin embargo es posible atribuir esos resultados a que tales métodos, aunque indiscutiblemente deseables puesto que promueven una respuesta en alrededor de una hora, sólo pueden aplicarse a muestras que contienen relativamente grandes cantidades de viriones, o de células infectadas por virus. Además, las técnicas de Microscopía Electrónica e Hibridación del DNA requieren de equipo muy costoso, cuidadosos estándares de control y personal altamente especializado (33,34,35) y cuando alguno de estos requerimientos no es cubierto satisfactoriamente se pueden dar casos como el anteriormente mencionado. Aunque estas técnicas tengan estas desventajas su utilización arroja resultados científicamente gratificantes (36).

Los resultados que se muestran en la gráfica 5 demuestran que el calendario empleado en ese canino para la obtención de anticuerpos contra parvovirus canino fue útil ya que se lograron obtener títulos por arriba de 1024 UIHA.

Después se realizó la precipitación de este suero para obtener la fracción de inmunoglobulinas por la técnica de precipitación con sulfato de amonio y posteriormente se tituló esta fracción por la técnica de inhibición de la hemaglutinación.

Los resultados obtenidos al titular el precipitado obtenido con el sulfato de amonio fueron negativos a la presencia de anticuerpos. Al titular los tres sobrenadantes obtenidos durante este proceso fueron positivos a la presencia de anticuerpos, lo cual demuestra que la técnica de sulfato de amonio para precipitar inmunoglobulinas fue útil en sueros de conejo a un 33% de saturación, no así en sueros de canino ya que las inmunoglobulinas se perdieron y no se concentraron como en el caso del suero de conejo en el que si se logró concentrar las inmunoglobulinas; para tratar de recuperar las inmunoglobulinas se aumentó la concentración de sulfato de amonio llevándose a un 60 % de saturación lográndose obtener un precipitado, pero al titularlo por medio de la prueba de inhibición de la hemaglutinación los resultados fueron negativos.

Esto significó que no hay inmunoglobulinas presentes. Con este porcentaje de saturación se logra obtener un precipitado pero de otras proteínas.

En las muestras de sangre obtenidas con un intervalo de ocho días entre cada toma en el canino del antirrábico, al determinarles la actividad específica, cuyos resultados se observan en la tabla 4, se corroboró nuevamente que no fue posible realizar la concentración de las inmunoglobulinas con la técnica de precipitación con sulfato de amonio a 60 % de saturación.

La tabla 5 muestra los resultados que fueron obtenidos después de realizar el tratamiento con rivanol. Esta prueba se basa en la precipitación de la albúmina y las macroglobulinas por la acción del lactato de 2 etoxi-6-9-diamino acridina (rivanol)(9,19). Se muestran los títulos de los sueros sin ser tratados con rivanol y después los títulos obtenidos tras el tratamiento con este. Considerando la utilidad del rivanol como una inhibición de la reacción de las inmunoglobulinas tipo M, en general todos los sueros presentaron muy poca cantidad de inmunoglobulinas del tipo G. El suero numero 3 perteneció a un canino positivo a parvovirus pero éste no tuvo título tras ser tratado con rivanol, lo que significa que su suero no contenía inmunoglobulinas tipo G. En el caso del canino del antirrábico la gráfica 6 muestra claramente que las inmunoglobulinas del tipo M siempre se mantuvieron muy por encima de las inmunoglobulinas del tipo G.

Las inmunoglobulinas tipo M son inducidas solo durante una infección primaria (13) El suero numero 4, que fue el suero del canino hiperinmunizado, solo un 25 % de las inmunoglobulinas presentes en el suero fueron del tipo G el 75 % restante pertenecieron a inmunoglobulinas del tipo M.

Al realizar un experimento buscando la dilución óptima de inmunoglobulinas de captura y la concentración óptima de virus los resultados (no mostrados) demostraron que las absorvancias para un suero con un título de 256 UIHA es la misma que para un suero con un título menor a 1UIHA, esto se atribuyó a una reacción dada por una unión inespecífica de las inmunoglobulinas de identificación al soporte de la placa de poliestireno ya que al observar los pozos controles de la prueba, los pozos donde no se agrega anticuerpos de identificación, las lecturas estuvieron en cero pero en los pozos donde se agrega el anticuerpo de identificación las lecturas estuvieron por arriba de 1.8. En base a estos resultados se probaron diferentes tipos de placas de mediana, baja y alta afinidad para tratar de evitar este fenómeno y solo al realizar el experimento en placas de alta afinidad se logró reducir levemente la reacción inespecífica, pero no en su totalidad. Esto significa que sigue persistiendo una unión inespecífica a los soportes por las gamaglobulinas del canino.

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA indirecta en los sueros 1 y 2, de canino y su fracción de inmunoglobulinas, se muestran en la gráfica 5. Como se observa, en general todas las lecturas estuvieron por abajo de 0.3 a excepción de un punto en el caso del suero 1 que estuvo por arriba de 0.5 cuando se agregó directo. En otro estudio realizado al respecto (12) se reportan densidades ópticas de 0.2 a 0.3 para un suero positivo y una lectura de 0.02 a 0.03 para el caso de un suero negativo.

En la prueba de ELISA directa que se desarrolló con las inmunoglobulinas obtenidas de la precipitación con sulfato de amonio a partir del suero de canino no se apreció el desarrollo de color. Se evaluaron cada uno de los elementos utilizados para poder saber la causa de la falla. Para evaluar nuestro anticuerpo de identificación primeramente se inactivó y adsorbió con eritrocitos de cerdo el suero, posteriormente se realizó un tratamiento con rivanol. El suero tratado con rivanol y sin tratamiento se tituló por la técnica de inhibición de la hemaglutinación obteniéndose que el 25 % de las inmunoglobulinas presentes en el suero de canino pertenecen a inmunoglobulinas del tipo G, el resto correspondieron a otro tipo de inmunoglobulinas, el conjugado utilizado en este experimento solo reconoce inmunoglobulinas del tipo G.

El virus se tituló por la técnica de hemaglutinación y posteriormente se agregó suero hiperinmune de conejo, volviendo a titular, en esta ocasión el resultado fue negativo lo que indicó la especificidad y utilidad del antígeno y el anticuerpo; el conjugado Anti canino peroxidado se combinó con el cromógeno y se incubó en oscuridad, el conjugado desarrolló color lo cual indicó que el conjugado y el cromógeno trabajaron bien.

La causa principal de que esta placa no desarrollara color se atribuyó a la poca cantidad de inmunoglobulinas del tipo G presentes en el suero. Esto también demostró que el esquema de inmunización empleado en el canino logra desarrollar pocos anticuerpos del tipo G aún utilizando vacunas a virus activo.

Uno de los principales problemas que se presentó durante el desarrollo de este experimento fue el ruido de fondo "background", el suero de canino se unió inespecíficamente a la placa de ELISA sin importar lo que se encontrara en el pozo. Las fuerzas que unen el antígeno con un anticuerpo son interacciones no covalentes. En las reacciones químicas clásicas, las moléculas se estructuran al establecer uniones firmes, covalentes y no reversibles.

Por el contrario, la formación de uniones no covalentes proporcionan una manera rápida y reversible de formar complejos y permite la reutilización de las moléculas de una manera que no sería posible con las uniones covalentes. Estas uniones no covalentes suelen formarse con distancias intermoleculares relativamente pequeñas, y como consecuencia sólo se establecen cuando dos moléculas se aproximan mucho.

Una de las fuerzas más evidentes que unen al antígeno con el anticuerpo es la interacción electrostática (iónica). Sin embargo, la importancia de las uniones electrostáticas no está completamente aclarada, ya que la mayor parte de las interacciones biológicas se produce en soluciones con concentraciones salinas relativamente altas que pueden neutralizar dichas cargas (12,36,37).

Las fuerzas más importantes no covalentes que contribuyen a la interacción antígeno anticuerpo son las uniones hidrófobas. El tercer grupo de fuerzas no covalentes que contribuye a la unión antígeno anticuerpo son los puentes de hidrógeno. Estos se forman cuando un ion hidrógeno unido a un átomo electronegativo interactúa con un segundo átomo que también tenga esta última característica, y de esta manera los une a los dos.

Todas las interacciones explicadas anteriormente requieren que el antígeno y el anticuerpo se acerquen mucho el uno al otro antes que pueda producirse una unión muy estrecha (34,37).

Para tratar de eliminar el problema de adherencia inespecífica por parte del anticuerpo de identificación se llevaron a cabo diferentes experimentos uno de los cuales fue enfocado hacia el suero del canino, pero los resultados que se muestran en la tabla 6 demuestran que el problema de inespecificidad por parte del suero de canino no fue dado por la existencia de una reacción del suero de canino hacia las gamaglobulinas de conejo. La modificación del pH tampoco interviene en este problema ya que aun desarrollando el experimento a tres diferentes pH no se logra evitar la adherencia del suero de canino a la placa en forma inespecífica. Los mismos resultados fueron obtenidos al trabajar el suero a altas diluciones (1:100) , o el inactivar la peroxidasa endógena.

Ni la modificación de la temperatura ni el cambio del diluyente de trabajo fueron capaces de evitar este problema. Lo anterior nos lleva a pensar que la unión entre el antígeno y el anticuerpo es realizada por otras fuerzas que no lograron ser modificadas por ninguno de los experimentos anteriormente mencionados probablemente uniones mas fuertes que atracciones electrostáticas o iónicas.

Existe la posibilidad de que se estén formando complejos insolubles y altamente adherentes a la placa bajo las condiciones de la prueba.

CONCLUSIONES

Los dos esquemas de inmunización desarrollados en los conejos son útiles para obtener inmunoglobulinas ya que se pueden obtener títulos altos.

El uso de los adyuvantes también favorecen el desarrollo de la respuesta inmune. De la misma forma la técnica de precipitación con sulfato de amonio es muy útil en el caso de sueros de conejo en los que si se logra concentrar las inmunoglobulinas.

Ninguna de las proteínas empleadas como bloqueadores es capaz de evitar la unión inespecífica del suero de identificación al soporte.

El valor diagnóstico de la prueba de hemaglutinación en heces para detectar parvovirus está sujeto a que se lleve a cabo la prueba confirmatoria de ésta que es la inhibición de la hemaglutinación con un suero hiperinmune con título conocido ya que de lo contrario la realización únicamente de la prueba de hemaglutinación no se considera definitiva para emitir un diagnóstico positivo o negativo.

La inactivación de las heces para titularse por la prueba de hemaglutinación no se ve afectada si las muestras no se inactivan.

El esquema de inmunización empleado en el canino del antirrábico solo induce el desarrollo de anticuerpos del tipo M.

La técnica de precipitación con sulfato de amonio no se puede emplear para precipitar suero de canino al 33 % de saturación por que no logra precipitar las inmunoglobulinas.

No se logró inhibir la unión inespecífica del anticuerpo de identificación del canino al soporte de la placa por ninguno de los procedimientos mencionados.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

Solución de Aisever's (22)

Dextrosa	20.5 g
Citrato de sodio	8.0 g
Cloruro de sodio	4.2 g
Agua destilada	1000.0 ml

Solución Bloqueadora (16)

Grenetina	0.25 mg
Sol. reguladora de carbonatos .1 M	ml
Agua destilada	100.0 ml

La solución bloqueadora se prepara por separado. Primero se preparan 100 ml de grenetina al 0.25 % y se agregan 100 ul a cada pozo, posteriormente se agregan 100 ul de solución reguladora de carbonatos al 0.1 M pH 9.6

Cromogeno (18)

OPD	4.0 mg
Agua oxigenada	4.0 ul
Sol reguladora de carbonatos .1M	10.0 ml

Solución de Lavado PBS-Tween 20 (8)

PBS 10x concentrado	100.0 ml
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada	800.0 ml
Ajustar pH 7.3	
Aforar con agua destilada hasta	1000.0 ml.

Solución Reguladora de Citratos pH 5.0 (27)

Ácido cítrico 0.1M	24.3 ml
Fosfato dibasico de sodio 0.2 M	25.7 ml
Agua destilada	50.0 ml

Solución de Paro (Ácido Ortho fosfórico) 1 M (34)

Ácido Ortho fosforico	0.337 ml
Agua Destilada	5.0 ml

Solución de Paro (Ácido Sulfúrico) 1 N (20)

Ácido Sulfúrico	0.26 ml
Agua Destilada	0.50 ml

Solución Saturada de Sulfato de Amonio (14)

Sulfato de Amonio	520.0 g
Agua Destilada	1000.0 ml

Al sulfato de amonio se le agregan 600 ml de agua destilada, se calienta hasta disolución del sulfato y se filtra en papel del No. 6 Frio se afora a 900 ml., se ajusta el pH a 7 con NaOH concentrado y se afora hasta 1000 ml. Se guarda en refrigeración.

Solución PBS-Salino pH 7.0 (5)

Cloruro de Sodio	80.0 g
Cloruro de Potasio	2.0 g
Fosfato ácido de Sodio	14.4 g
Fosfato ácido de Potasio	2.4 g
Agua Destilada	1000.0 ml

Esterilizar a 15 Lb 15 minutos a 121°

Solución de PBS-Gelatina (40)

PBS diluido 1:10 pH 6.8	100.0 ml
Cloruro de Sodio	0.85 g
Grenetina	0.25 g

BIBLIOGRAFIA

1. Banacerraf Baroj, Unanue Emil R.: Inmunología. Segunda edición Panamericana, Argentina. 1980
2. Barlough, E. Jeffrey : Manual de las Enfermedades Infecciosas en Pequeños Animales. Panamericana 1982
3. Brent D.J: Gastroenterología Canina y Felina. Interamericana, México, D.F. 1980
4. Carmichael, L.E.; Joubert, J.C; Pollock, R.V. : Hemaglotination by Canine Parvovirus: Serologic Studies and Diagnostic Applications. Am. J. Vet. Res. ; 41: 784-799 1980.
5. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias/INTS: Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico. 1982
6. Chandler, E.A, Thomson, D.J; Sotton, J.B; Price, C.J. : Canine Medicine and Therapeutics. 3rd. Scientific Publications. 1982.
7. Craig E.G.; Saunders W.B.: Infectious Disease of the Dog and Cat. American Book Store. USA 1980.
- 8.. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.: Manual de Laboratorio de Inmunología. Instituto Politécnico Nacional. 1993.
9. Esteinbuch M, Niewiarowski S. : Rivanol in the preparation of plasminogen (Profibrinolysin). Nature Vol. 186 page 87 1960.
10. Ettinger J. Stephen. : Text book of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and cat. 2nd. W.B. Saunders Company."
11. Fenner Frank, White David o. : Virología Médica. Segunda edición. La Prensa Médica Mexicana México D.F. 1976
12. Fiscus S.A., Mildbrand M.M., Gordon J.C., Teramoto Y.A. and Winston S. : Rapid Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay for Detecting Antibodies to Canine Parvovirus. Am. J. Vet. Res. 46 859-863 1985.
13. Florent G. : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Single Serum Diagnosis of Canine Parvovirus Disease. Veterinary Record 119, 479-480 1986.

14. González Espinoza Griselda. : Preparación de antisueros monoespecificos y un conjugado fluorescente para la identificación de Haemophilus pleuropneumoniae. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas 1992.
15. Grant G. W. : Small Animal Gastroenterology. Segunda edición. Stonegate Publishing Company. USA. 1988.
16. Harlow, David Lane. : Antibodies a laboratory Manual. Call Spring Harbor Laboratory USA. 1988
17. Jönsson, Lars, Magnusson Cajser. : Monoclonal Antibodies Applied in an Immunoperoxidase Method for Detection of Parvovirus in Specimens of Small Intestine from Dog and Mink. Journal 1988
18. Kemeny D.M. and Challaconde S. : ELISA and other Solid Phase Immunossays theoretical and Practical Aspects. John Wiley Sons. 1988.
19. Kend D Miller. : Rivanol resin and the isolation of thrombins. Nature Vol. 184 page 450 1959.
20. Kirkegaard & perry Laboratories Inc. Producer of Affiniry Purified Antibodies.
21. Luff P.R., Wood Q.W., Hebert C.N., Thornton D.H. : Canine Parvovirus Serology: A Collaborataive Assay."
22. Margni Anibal Ricardo. : Inmunología e Inmunoquímica y Fundamentos. Tercera edición. Panamericana, Bogotá Colombia. 1980
23. Medina B. W. : Diagnóstico Clínico, Tratamiento Sintomático y Prevención de la Gastroenteritis Hemorrágica Viral Canina. (Revisión Bibliográfica) Tesis de licenciatura. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 1981.
24. Mohanty S. B. Y Dutta S.D. : Virología Veterinaria. Interamericana. MÉXICO, 1988.
25. Montaraz, C. Juan Antonio. : Apuntes de Inmunología Veterinaria. Departamento de Virología e Inmunología. 1989. FES-C UNAM México
26. Morilla ,G. A. y Bautista, G.C. : Manual de Inmunología. Diana, México 1986.
27. Moss A. J., Glen V. Dalry . : Radioinmunoensayo Práctico. Reverte S.A. Barcelona España. 1982
28. Pennington, T. H. y Ritchie D.A. : Virología Molecular. Omega Barcelona España. 1978

29. Pollock, V.H. Roy. James a. Baker Institute for Amino Acid Health. : Experimental Canine Parvovirus Infection in Dogs. New York State College of Veterinary Medicine Cornell University Ithaca, N. Y. 1981.
30. Rice B; Jacquelina, Winters A. Karen, Krekowka Steven, and Olsen G Richard. Comparison of Systemic and Local Immunity in Dogs with Canine Parvovirus Gastroenteritis.1982
31. Richard, B. F. : Signos Clínicos y Diagnóstico en Pequeños Animales. Médica Panamericana. 1986.
32. Rojas William M. : Inmunología. Séptima edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín Colombia. 1988
33. Rojo, J.M., Serna, J. : Microscopía Electrónica. Urmo Bilbao España. 1970
34. Rose, R Noel. : Manual of Clinical Laboratory Immunology. 4th. American Society for Microbiology Washington D.C. 1976
35. Sánchez Viscaino, J.M. y Cambra Alvarez, M. : Técnicas Inmunoenzimáticas ELISA en Patología Animal y Vegetal. Segunda edición. Serie Técnica No. 7 1987.
36. Teramoto, A. Yoshio, Mildbrand, M. Michael, Carlson Jonathan, Collins K Jamkes and Winston Scott. : Comparison of Eenzime-Linked Immunosorbent Assay, DNA Hibridization, Hemagglutination, and Electron Microscopy for Detection of Canine Parvovirus Infections. Journal of Clinical Microbiology. Vol 20 No 3 373-378 1984.
37. Tizard, Ian. :Inmunología Veterinaria. Texto de Iniciación. Tercera edición. Interamericana, 1989.
38. Veijalainen M.L., Neuvonen E., Niskanen A. and Juokstahti I. : Latex Afflutination Test for Detecting Feline Panleukopenia Virus, Canine Parvovirus, and Parvoviruses of Fur Animals. Journal of Clinical Microbiology Vol 23 N 8 556-559 1986.
39. Weir D.M. : Handbook of Experimental Immunology in three volume. Immunochemistry. Vol I. 3rd. Blackwell Scientific Publications. 1970.
40. Williams Curtis A, Chase Merrill W. : Methods in Immunology and Immunochemistry. Vol IV. Academic Press New York. 1977