



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"

"Análisis comparativo de la respuesta inmune
en cachorros vacunados contra parvovirus
canina"

T E S I S

Que para obtener el Título de
Médico Veterinario Zootecnista

P r e s e n t a

FERNANDO BRINGAS ESTRADA

Asesor: Raúl Arturo Mar Cruz





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE.

	Pág.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
I.1 ANTECEDENTES CIENTIFICOS.....	5
I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACION	
Y FINALIDAD	9
I.3 HIPOTESIS	12
I.4 OBJETIVO	15
I.5 BREVES NOTAS SOBRE LA GASTROENTERITIS	
HEMORRAGICA VIRAL CANINA	17
II. MATERIAL Y METODOS	47
III. RESULTADOS	54
IV. DISCUSION	62
V. CONCLUSIONES	65
VI. BIBLIOGRAFIA	68

RESUMEN

Con el objeto de conocer cual produce una mayor y más rápida respuesta inmune, se hizo un analisis comparativo de dos vacunas usadas para prevenir la parvovirosis canina. Las vacunas utilizadas fuerón la de virus vivo modificado de panleucopenia felina y la de virus vivo modificado de parvovirus canino.

De una colonia de perros mestizos de propiedad particular de la Unidad Morelos primera sección de Coacalco de Berriozabal del estado de México, se eligieron 12 cachorros de un promedio de edad de 3 a 6 meses y de 4 a 10 kilogramos de peso.

De éstos se formaron tres grupos de 4 cachorros cada uno, constituyendo el grupo A, B y testigo. Los animales fuerón bañados, desparasitados e instalados en jaulas comunales por grupo, se les proporciono alimentación comercial y 10 días despues fuerón sangrados con el proposito de determinar la presencia de anticuerpos en el suero contra el parvovirus canino por medio de la prueba de la inhibición de la hema - glutinación.

Comprobando que no hay anticuerpos; los animales del grupo A fuerón vacunados con dos dosis y teniendo 14 días de inter - valo con la vacuna designada con el numero 1 (virus vivo modificado de panleucopenia felina).

El grupo B fue vacunado con dos dosis y teniendo 14 días de intervalo con la vacuna designada con el numero 2 (virus vivo modificado de parvovirus canino).

El grupo testigo permaneció sin vacunar para detectar cualquier exposición accidental al virus, lo que pudiera alterar la prueba.

Los tres grupos fueron sangrados los días 1, 7, 14, 21 y 28 de iniciada la prueba para determinar los anticuerpos circulantes en el suero. Estas pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Virología de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.

La vacuna de virus vivo modificado de parvovirus canino produjo una rápida respuesta inmune, cuyos títulos permanecen elevados desde el séptimo día de iniciada la vacunación y que continúa incrementándose en comparación con los producidos con la vacuna de origen felino.

El promedio de anticuerpos formados por la vacuna de origen felino fue de 1:56, en comparación con los producidos con la vacuna de origen canino que alcanzaron un nivel de 1:20 480 a los 28 días de efectuada la vacunación inicial. La reacción de esta vacuna fue 365 veces más alta que la lograda con la vacuna de origen felino.

Es importante señalar que en ausencia de la vacuna viva modificada de origen canino, al hacer uso de la vacuna de origen felino se debe evitar el contacto de los perros con el virus, ya que esta vacuna empieza a desarrollar nivel de anticuerpos protectores aproximadamente entre 14 y 17 días de iniciada la vacunación.

El hecho podría explicarse por la baja capacidad de multiplicación de la partícula viral en una especie para la cual no es altamente específica, y por lo tanto la concentración de antígeno no se considera altamente estimuladora.

Finalmente la vacuna de origen canino al producir una respuesta mucho más alta; al comprobar que no se inhibe en presencia de anticuerpos maternos y que su uso se recomienda en perras preñadas, se considera uno de los biológicos ideales para prevenir la enfermedad.

I. INTRODUCCION

I.1 ANTECEDENTES CIENTIFICOS

Los parvovirus asociados con enteritis hemorrágica y miocarditis en perros han sido aislados en varios laboratorios en el mundo.

En el año de 1970 Binn, Lazar, Bddy y Kajima aislaron un virus de perros clínicamente normales y al que llamaron "Virus Minúsculo de Canideos" (1, 2, 3, 5, 7, 13, 17, 19, 37, 44, 49, 54).

En 1976 Siegl en un estudio serológico estimó que el virus estaba ampliamente difundido en los Estados Unidos sin reconocerle acción patógena (49).

En 1976 Eugster y Nairn observaron el virus en heces diarréicas en perros que se habían recuperado 5 y 10 días posteriores a los primeros signos.

En 1978 violentas infecciones fueron reportadas en el estado de Texas y de varios estados de los Estados Unidos de Norteamérica. En ese mismo año la enfermedad fue reconocida en Canadá, Australia, Bélgica e Irlanda.

En 1979 también fué reconocida en Alemania y múltiples brotes se han desarrollado en varias partes del mundo (5, 15, 17, 20, 25, 37, 49, 52).

En ese mismo año Appel, Carmichael y Scott hacen estudios de inmunización utilizando la vacuna inactivada y la viva modificada de panleucopenia felina, así como la inactivada de parvovirus canino para prevenir la enfermedad. En este estudio se encuentran resultados satisfactorios con las vacunas de --

origen felino siendo recomendadas.

El uso de estas vacunas es debido a la cerrada relación antigénica encontrada entre el virus de panleucopenia felina y el virus de parvovirus canino que produce una inmunidad cruzada (5). Los brotes en México se observaron por primera vez en el Distrito Federal y en diferentes ciudades de provincia a partir del mes de junio de 1980 (44, 49).

En 1980 Pollock reporta la vacuna de virus inactivado de panleucopenia felina como la primera quea obtenido la licencia para ser usada en perros para prevenir el parvovirus canino en los Estados Unidos. Dicha vacuna es eficaz en perros de todas las edades y en perras preñadas (45).

En ese mismo año Carmichael, Joubert y Pollock encuentran la atenuación de la vacuna de virus vivo modificado de parvovirus canino despues del pasaje numero 80. Siendo esta recomendada para su uso en perras en gestación y cachorros, ya que desarrolla anticuerpos protectores a los cuatro días despues de la primera inoculación (9).

En 1981 Ruth y Emery determinan la eficacia y la aceptabilidad de la vacuna de virus vivo modificado de parvovirus canino combinada con la vacuna de Distemper-Hepatitis-Parainfluenza. En el 100% de los perros vacunados se desarrollaron niveles de anticuerpos protectores contra estas enfermedades (48).

En 1982 Edwards, Fulker, Acree y Bandy comprueban la efectividad y protección inmediata contra el parvovirus canino con la vacuna -

de virus vivo modificado de parvovirus canino. Siendo esta efectiva en cachorros con anticuerpos de origen materno (14, 21). En 1983 Black hace un estudio de comparación serológica con vacunas contra el parvovirus que estan comercialmente registradas. En este estudio encuentra que la vacuna de virus vivo modificado de parvovirus canino tiene una reacción 65 veces mayor que la vacuna inactivada de parvovirus canino y 660 veces mas alta que la lograda por las vacunas inactivada y viva modificada de panleucopenia felina (6).

I.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACION Y FINALIDAD

Desde 1978, año en que hubo un brote mundial de enteritis y miocarditis por parvovirus canino, no hay otra enfermedad canina que haya recibido tanta importancia. La enfermedad ha causado gran pérdida económica a los criadores de perros y continúa causándola, aun con la disponibilidad de vacunas para prevenirla.

Siendo esta pérdida económica, importante, ya que se considera una industria porque proporciona fuentes de empleo. A nivel de Estado las diferentes asociaciones caninas y antiviviseccionistas. A nivel educacional a médicos veterinarios y pasantes. A las diferentes industrias como la del cuero, alimenticia y del acero con la fabricación de elementos relacionados con la explotación canina, como lo son: Collares, pecheras, alimentos, jaulas, comederos, bebederos, material quirúrgico etc.

Esta enfermedad también tiene importancia social, ya que las diferentes actividades zootécnicas que ha venido desarrollando el perro, como son: de trabajo, cacería, compañía, salvamento, guarda y protección, se han visto afectadas debido a la alta mortalidad que presenta.

Las infecciones por parvovirus canino son más severas y mortales en los cachorros. Y como en otras infecciones de origen viral, se presenta el problema de la vacunación de animales jóvenes.

La finalidad de este trabajo es conocer cuál de las dos vacunas produce una mayor y más rápida respuesta inmune para ser recomendadas para su uso.

I.3 HIPOTESIS

La alta capacidad de la respuesta inmune siempre se ha caracterizado por propiciar una protección en forma humoral o celular en forma altamente específica; este es que los antígenos proporcionados a un sistema inmunocompetente casi siempre darán como resultado una respuesta a la estimulación por ese antígeno.

En el caso de inmunógenos que comparten ciertos grupos antigénicos determinantes, la respuesta puede presentarse en una forma heterófila, sin que este signifique que los determinantes antigénicos sean exactamente iguales o idénticos.

Hay que recordar que la estructura terciaria de estos determinantes pudiera ser parecida, sin que la estructura primaria o secundaria sea similar.

Debido a esto, en ocasiones la respuesta inmune puede reaccionar con ciertos "mosaicos antigénicos" parecidos, pero en una forma no total o completa.

Uno de los puntos a considerar en la hipótesis de este trabajo es que los antígenos virales de ambos inmunógenos son parecidos pero no idénticos, y por lo tanto existe reacción cruzada, que desde luego será más específica para el antígeno para la cual fué creada.

Lo que se espera en este trabajo y otros similares, es determinar el grado de comparación o similitud de la respuesta inmune de acuerdo a antígenos diferentes inoculados por la misma vía, bajo condiciones similares, para poder integrar -

un análisis de resultados que en la mayoría de los casos es -
esperado debido a los comentarios anteriormente citados.

Sin embargo hay que recordar que no todo tipo de respuesta
puede ser positivo en el mismo grado o nivel, ya que diferen-
tes circunstancias podrían desequilibrar o inclusive anular
una respuesta definida.

La proyección de una respuesta inmune está condicionada prin-
cipalmente a las características del inmunógeno y a la capaci-
dad del organismo que responde, pero son muchas las limitacio-
nes individuales y por lo tanto las variaciones irán en el
mismo grado o nivel.

I.4 OBJETIVO

Comparar la respuesta humoral en cachorros vacunados con virus vivo modificado de parvovirus canino, con la respuesta humoral en cachorros vacunados con virus vivo modificado de panleucopenia felina; utilizando pruebas in-vitro con ambos antígenos. Con el objeto de conocer cual de las dos produce una mayor y más rápida respuesta inmune para ser recomendada para su uso.

**I.5 BREVES NOTAS SOBRE LA GASTROENTERITIS HEMORRAGICA VIRAL
CANINA**

DEFINICION: La gastroenteritis hemorrágica viral canina es -- una enfermedad altamente contagiosa caracterizada principal-- mente por vómito, diarrea sanguinolenta y de mal olor, deshi-- dratación, miocarditis y muerte. Afecta a los caninos domésti-- cos de todas las edades, teniendo predilección por los cacho-- rros menores de seis meses.

La morbilidad alcanza un 100% y la mortalidad de un 80 a un - 90%, sobre todo en animales muy jóvenes o muy viejos (44).

CARACTERISTICAS DE LA FAMILIA PARVOVIRIDAE: Esta familia con-- siste en dos géneros: el género ~~parvovirus~~ y género virus -- Adeno-Asociados.

1.- MORFOLOGIA.

Son los virus más pequeños. Partículas desnudas isométricas - de 18 a 26 nanómetros de diámetro con simetría icosaédrica - y probablemente 32 capsómeros de 3-4 nanometros de diámetro. Las médulas miden de 14 a 17 nanómetros. Posee una cápside cú-- bica que encierra un genoma viral compuesto por una banda sim-- ple de DNA (2, 18, 23, 28, 32, 36, 38).

2.- PROPIEDADES DE LA PARTICULA VIRAL.

ACIDO NUCLEICO: DNA de cadena sencilla de peso molecular de - 1.5 a 2.2 millones de daltons. Contenido de guanina 41% más citosina 53%. En algunos géneros las cadenas sencillas de vi-- riones son complementarias y después de la extracción se reu-- nen para formar una doble cadena.

PROTEINAS: Generalmente pueden demostrar tres polipéptidos - en viriones maduros de los géneros parvovirus y adeno-asociados que probablemente son todos derivados de una secuencia - común.

LIPIDOS: Ninguno.

CARBOHIDRATOS: Ninguno.

3.- PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

PESO MOLECULAR: De 5.5 a 6.2 millones de daltons, 110-122 S. Los viriones maduros forman una banda a una densidad de 1.39 a 1.42 g/cm³ en CsCl. Partículas con densidades mayores que 1.42 g/cm³ son probablemente partículas precursoras "densas". La partícula es estable a pH de 3 a 9, a 56 grados centígrados por lo menos durante 60 minutos, así como en presencia - de disolventes de lípidos. Son inactivadas por la formalina, cloro, betapropiolactona, hidroxilamina, agentes oxidantes y radiaciones ultravioleta (18, 23, 28, 32, 38).

4.- PROPIEDADES ANTIGENICAS.

Los polipéptidos del virión son inmunológicamente distinguibles están sin embargo, antigénicamente relacionados. En general, los sueros contra los polipéptidos no causan neutralización ni reacciones contra los viriones intactos por medio de la inhibición de la hemaglutinación, fijación de complemento o immuno-electroforesis.

El parvovirus canino tiene muchas características en común -- con el virus de la panleucopenia felina. Una cerrada relación antigénica puede ser revelada por seroneutralización, inhibición de la hemaglutinación y por inmunofluorescencia. Hemaglutina globulos rojos de cerdo y mono Rhesus a 4 y 25 grados -- centígrados.

Debido a la relación antigénica entre los dos virus se ha utilizado la vacuna de panleucopenia felina para la prevención, de la enfermedad (1, 2, 11, 31, 36).

Los parvovirus aislados de muestras fecales y de tejidos de perros con enteritis, todos son de singular morfología, aproximadamente de 20 nanómetros en tinción negativa para su observación en el microscopio electrónico.

Los virus aislados pueden ser similares al virus minúsculo de canidos (MVC) descrito por Binn, aunque la estructura antigénica, rango de cultivo celular y el espectro hemoaglutinante difiere marcadamente de las propiedades reportadas para el MVC (2).

Todos los virus adeno-asociados comparten un antígeno común, que puede demostrarse por medio de la prueba de anticuerpos fluorescentes (28).

5.- REPLICACION.

La replicación del parvovirus ocurre en el núcleo celular, --

donde se acumula tanto estructuras capsidales vacías como virus infeccioso de progenie. Los parvovirus requieren para su replicación que se genere una o más funciones celulares durante la división celular (1, 28, 32). Esta característica es debida a los requerimientos del virus de DNA para su crecimiento y que es desarrollado por las células en su fase de mitosis (11). Tejidos de rápida proliferación como los de la mucosa intestinal, tejido linfoide, tejido cardíaco o tejidos fetales son atacados. Por esta razón el virus tiene una aparente selección en las miofibrillas del tejido cardíaco - en cachorros de 4 a 6 semanas de edad. (27).

En su crecimiento los virus producen un efecto citopático en células de riñón de perro, así como en células que no son de origen canino. En el laboratorio su crecimiento generalmente no se acompaña de este efecto, pues aproximadamente el 70% de los cultivos presentan este efecto (36, 41).

Células derivadas de tejido de gato y mustélido han sido encontradas apropiadas para su crecimiento (2).

Los virus adeno-asociados requieren de las funciones del virus asociado ya sea un herpesvirus o un adenovirus para que ocurra su multiplicación. Los miembros del género parvovirus no necesitan la asistencia de otro virus (1, 18, 23, 27, 28, 31, 37).

FAMILIA PARVOVIRIDAE, GENERO PARVOVIRUS.

ESPECIE ANIMAL	NOMBRE COMUN DEL VIRUS	ENFERMEDAD QUE PRODUCE
Ratón	Virus minúsculo del ratón	Enfermedad natural no conocida.
Rata	Virus Kilham de rata	Enfermedad natural no conocida.
	Virus X14 de ratas.	Enfermedad natural no conocida.
	Virus LU3 de roedores	Enfermedad natural no conocida.
	Virus RV.	Enfermedad natural no conocida.
	Virus H3	Enfermedad natural no conocida.
	Virus de la encefalopatía hemorrágica de la rata.	Encefalopatía hemorrágica.
Conejo	Parvovirus del conejo.	Enfermedad natural no conocida.
Hámster	Virus osteolítico del hámster.	Osteolisis.
Gato	Virus de la panleucopenia felina	Leucopenia, enteritis e hipoplasia cerebelar.

ESPECIE ANIMAL	NOMBRE COMUN DEL VIRUS	ENFERMEDAD QUE PRODUCE
Visón	Virus de la enteritis del visón	Enteritis.
	Virus del visón aleutiano.	Enfermedad progresiva fatal.
Cerdo	Parvovirus porcino	Muerte fetal, aborto e infertilidad.
Perro	Parvovirus canino.	Leucopenia, enteritis y miocarditis.
	Virus minusculo de caninos.	Enfermedad natural no conocida.
Bovino	Parvovirus bovino.	Muerte fetal, enteritis y miocarditis
Ave	Parvovirus aviar.	Enfermedad natural no conocida.
Ganso	Parvovirus del ganso	Enteritis.
Hombre	Parvovirus humano.	Gastroenteritis.

* Tomado de: (1, 2, 18, 23, 28, 37).

FAMILIA PARVOVIRIDAE, GENERO VIRUS ADENO-ASOCIADOS.

ESPECIE ANIMAL	NOMBRE DEL VIRUS
	Virus Adeno-asociado Tipo 1
	Virus Adeno-asociado Tipo 2
	Virus Adeno-asociado Tipo 3
	Virus Adeno-asociado Tipo 4
Ave	Virus Adeno-asociado Aviar
Bovino	Virus Adeno-asociado Bovino
Perro	Virus Adeno-asociado Canino
Equino	Virus Adeno-asociado Equino

* Tomado de : (1, 2, 18, 23, 28, 37)

TRANSMISION: La infección ocurre primariamente por ingestión y contacto directo de un animal enfermo a otro susceptible. La cantidad de virus arrojado en heces es alarmante, perros infectados pueden excretar tanto como un billón de viriones - infecciosos por gramo de heces despues de 5-6 días de enfermedad (4).

El virus es eliminado en el excremento del perro por dos semanas despues de infectado. también es eliminado en la orina, - saliva y vomitó (44). El virus es extremadamente resistente a la destrucción por el medio ambiente, el calor y desinfectantes comunes (8, 16, 29, 32, 38, 44). Este puede sobrevivir fuera del organismo por un año o más (36, 44).

La infección durante la gestación no causa aborto, muerte neonatal, malformaciones o hipoplasia cerebelar (4). Algunos casos de miocarditis son resultado de la ingestión del virus inmediatamente después del nacimiento, pero es conocido que los parvovirus pueden atravesar la placenta, por esta razón, algunos de estos casos pueden ser resultado de la infección en útero después de la segunda mitad de gestación (36).

Los perros ya no se consideran transmisores sanos después de cuatro meses (32). También hay evidencia de transmisión indirecta por contacto entre los perros susceptibles con objetos contaminados como ropa, zapatos, perreras y otros artículos - (32, 36).

Perros recuperados a la infección son inmunes aproximadamente dieciocho meses después y está en estudio que esta inmunidad sea de por vida (3, 4, 23).

PATOGENESIS: Esta enfermedad tiene un período de incubación de dos a doce días (38, 43, 44). El mayor índice de mortalidad se produce entre las 48 y 72 horas de haberse incubado el proceso, y si bien, en algunos casos se recuperan rápidamente, en algunos otros la recuperación es gradual (44). La ocurrencia de las dos distintas manifestaciones entérica y miocárdica depende de dos factores.

Primero: El parvovirus canino sólo se replica en células en división, como la base de las vellosidades intestinales.

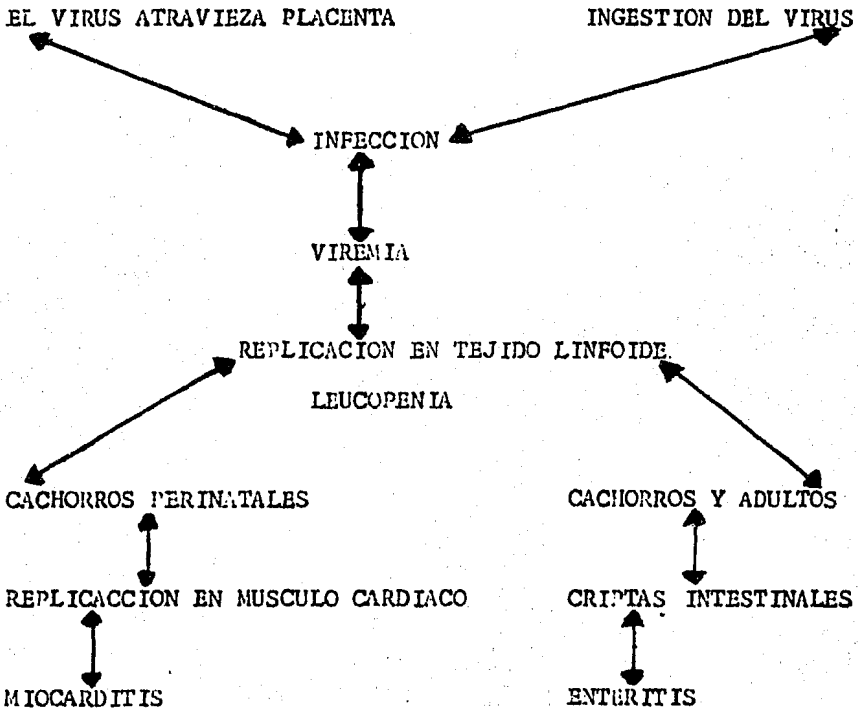
Segundo: Los diferentes tejidos celulares se multiplican a diferente ritmo en un animal en desarrollo. Consecuentemente la susceptibilidad de los diferentes tejidos depende del estado de edad cuando la infección es producida. Tempranamente en la vida, tanto en el período prenatal o durante las primeras semanas de edad, el tejido cardíaco tiene un rápido crecimiento, pero en los intestinos el crecimiento es relativamente bajo. Por lo tanto, la infección en este período resulta en una miocarditis y por eso es tan grave. Cerca de las cuatro semanas de edad la multiplicación de las células cardíacas tiene un límite, mientras que las células intestinales tienen un incremento en su crecimiento, por consecuencia la infección en cachorros a esta edad y de animales viejos resul

ta en una enteritis. En su fase inicial de la infección hay - una replicación viral en tejido linfoide, médula ósea con linfocitólisis y una marcada leucopenia (4, 35, 36, 47).

ENTERITIS: En cachorros y animales viejos, la exposición oral provoca el desarrollo de una enteritis en la mayoría de los casos, de la ingestión del virus resulta una invasión en el organismo desarrollando un período inicial de viremia. La localización y multiplicación del virus en los órganos linfoides ocurre entre los tres y seis días post-infección. Las placas de Peyer en intestino, son los sitios más afectados - con el desarrollo de las lesiones entéricas ocurrido de cinco a diez días post-infección. El rápido crecimiento celular de la base de las criptas intestinales son atacadas habiendo una distorsión de ella, en severos casos la aplasia de las criptas y colapso total de la mucosa son producidas (4, 35, 36, 47)

MIOCARDITIS: En contraste, la patogénesis de esta forma de presentación es relativamente oscura. La infección oral de cachorros privados de calostro desarrolla una fase inicial de viremia y linfopenia, teniendo el virus una localización en - miocardio. En este tiempo la actividad mitótica es prominente. El virus persiste en músculo cardíaco aproximadamente en las tres o tres y media semanas de edad, desarrollándose una miocarditis no supurativa. Dependiendo de la severidad y extensión de la miocarditis, los cachorros afectados pueden morir por una aguda falla cardíaca o pueden desarrollar una falla -

cardíaca sub-aguda que aparente mente no puede manifestarse -
clínicamente por muchos meses (4, 35, 36, 47).



En la mayoría de los casos, la muerte es probablemente el re-
sultado de complicaciones, incluyendo deshidratación, desba -
lance electrolítico, endotoxemia, neumonía, bacteremia y fa -
lta cardíaca (10, 31, 39, 54).

SIGNOS CLINICOS DE LA PRESENTACION GASTROINTESTINAL: Los principales signos de la gastroenteritis hemorrágica viral canina son vómito intermitente que puede ir acompañado de sangre, severa postración, anorexia, diarrea y rápida deshidratación. Las heces son de color amarillo grisáceo que en algunas ocasiones llegan a contener sangre o son francamente hemorrágicas; la diarrea persiste hasta la resolución favorable del padecimiento o bien, hasta la muerte. Uno o dos días de iniciado el problema la temperatura desciende y ocasionalmente baja de treinta y ocho grados centígrados (1, 2, 3, 7, 8, 13, 22, 23, 24, 31, 32, 36, 37, 38, 42, 43, 44, 47, 49, 53, 54)*.

Es común observar leucopenia en los primeros cinco días de la enfermedad. El conteo de las células blancas indica un decremento hasta 100 células/mm³; pero conteos de 500 a 2000 células/mm³ deben ser considerados sugestivos de parvovirus (1, 2, 7, 23, 31, 37, 44).

Los animales presentan dolor a la palpación abdominal, las membranas de las mucosas están pálidas y los ojos se encuentran hundidos (44). Se encuentran hipotérmicos y pierden peso progresivamente (49). La repentina muerte se manifiesta entre las 24 y 72 horas de la presentación de los primeros signos (1, 2, 3, 8, 13, 23, 36, 49).

En algunos casos menos severos la recuperación puede ser rápidamente pero se ha visto que en algunos perros requieren tratamiento por varias semanas (36).

* Carlos Appendini
Med. Vet. Zoot. Comunicación personal.

SIGNOS CLINICOS DE LA PRESENTACION ENFERMA: La infección miocárdica ocurre en cachorros provenientes de perras que no tuvieron anticuerpos contra parvovirus durante la gestación (35). Se caracteriza por afectar cachorros de tres a seis semanas de edad (27, 31), o de cuatro a doce semanas (3). Puede ocurrir la muerte súbita sin la presentación de los signos; esta ocurre por falla cardíaca en los cachorros. Algunas veces se ha visto en perros que aparentemente se habían recuperado de la presentación entérica (1, 23, 31, 35, 47).

Los signos más sobresalientes son: taquicardia, disnea severa, edema pulmonar, llanto, vómito, intolerancia al ejercicio, palidez o cianosis de la mucosa y muerte súbita antes de que la terapia pueda ser iniciada (2, 3, 8, 10, 23, 27, 30, 31, 32, 36, 37, 38, 47).

Los antígenos parvovirales y los cuerpos de inclusión intranuclear pueden ser demostrados del músculo cardíaco de los cachorros afectados (1, 8, 23, 31, 47).

LESIONES: A la examinación post-mortem de fatales casos de parvovirus una marcada deshidratación y mala condición general han sido encontradas (36, 49).

En el estómago se observa petequias y equimosis en la serosa, congestión de la mucosa y presencia de líquido claro espumoso (49). También se observan úlceras de aproximadamente 3mm. de diámetro (15).

En el intestino delgado las lesiones usualmente afectan yeyuno e íleon; el duodeno y colon no son comúnmente afectados (2, 15, 39, 54). Se pueden observar denudación de la mucosa con pérdida de las vellosidades, en ocasiones estas se encuentran pequeñas y atrofiadas con epitelio aplanado o ausencia de éste. Las criptas generalmente se encuentran dilatadas con contenido de restos celulares. Algunas veces puede haber regeneración del epitelio. Los núcleos de las células epiteliales pueden estar vesiculados y los nucleolos prominentes (2, 3, 8, 39, 49, 50). La lamina propia se observa prominente, como resultado de la desaparición de muchas criptas, conteniendo algunas células inflamatorias. Ocasionalmente cuerpos de inclusión intranuclear eosinofílicos son vistos en área de necrosis epitelial acusada (2, 7, 8, 15, 23, 31, 39, 47, 54).²

Un factor sobresaliente de la enfermedad es la depresión y necrosis del tejido linfoide, especialmente es evidente en las placas de Peyer, nódulos linfáticos, bazo y timo (2, 3, 11, 23, 36, 37, 38, 49, 54).

El pulmón presenta una neumonía intersticial que puede ser difusa o local. Algunas veces tiene una necrosis focal hemorrágica o exudado fibrinoso en los alveolos como resultado de una infección secundaria.

Es común la bronconeumonía secundaria, posiblemente como resultado de la aspiración de vómito (31).

El hígado se encuentra congestionado, hemorrágico y con múltiples focos de necrosis (38, 54, 57).

En secciones de médula hematopoyetica hay una disminución en las células rojas y blancas (2).

En la presentación cardíaca se presenta una miocarditis no supurativa cuyos signos pueden ser vistos al microscopio (27, 31).

Esta caracterizada por edema y pérdida de miofibrillas con una extensa infiltración de linfocitos, células plásmáticas, histiocitos y algunos neutrófilos (3, 8, 27, 31, 36, 37, 38, 47, 49). Son encontrados en las células del miocardio cuerpos de inclusión intranuclear basófilos; además de una fibrosis difusa (8, 31, 36, 37, 49). una de las lesiones más prominentes es la dilatación del ventrículo izquierdo (3). Es probable ver aunado a ésto una cardiomegalia, hidropericardio, hidrotórax, ascitis con hepatomegalia y congestión (8, 27, 36, 37):

DIAGNOSTICO: El diagnostico presuntivo está basado en la historia clínica, signos clínicos y hallazgos post-mortem (8, 23, 37, 42). La evaluación de la temperatura, pulso, respiración, palpación de los ganglios linfáticos regionales y del abdomen son esenciales (31).

El diagnóstico definitivo solo puede ser hecho por demostración del virus en tejidos o heces, por aislamiento del virus, inmunofluorescencia, seroneutralización, hemaglutinación, histopatología, microscopía electrónica o por inhibición de la hemaglutinación (2, 3, 8, 37).

Existe una gran cantidad de agentes que nos pueden provocar cuadros similares a la infección por parvovirus. Se debe de

Diferenciar de:

1.- VIRUS

Coronavirus.

Rotavirus.

Virus de la hepatitis canina.

2.- BACTERIAS

Salmonela sp.

Campilobacter sp.

E. coli.

Clostridium;(welchi y perfringes).

3.- PARASITOS

Toxocara canis.

Ancylostoma caninum.

Coccidia sp.

4.- INTOXICACIONES

Warfarina.

Plomo.

Arsénico.

5.- OTRAS CAUSAS

Pancreatitis aguda.

Obstrucción por objetos traumáticos.

Colitis bacterianas y traumáticas.

Anomalias congénitas.

Vólvulo.

Invaginación intestinal.

Neoplasias en el aparato digestivo.

* Tomado de: (2, 23, 27, 30, 31, 37, 38, 43, 49).

DIAGNOSTICO CONFIRMATIVO:

1. MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Este metodo de diagnóstico es sumamente eficaz, ya que es posible encontrar diversas partículas virales (20 a 26 nanómetros de diametro) se encuentran en muestras fecales de perros infectados. Estas son centrifugadas a 10000 rpm. por 30 minutos, el sobrenadante es recentrifugado a 100000 rpm. por una hora. A continuación se disuelven en un mililitro de agua destilada, para después ser teñidas con ácido fosfotúngstico al 1% y ser examinadas (11, 13, 17, 31, 33).

2. AISLAMIENTO VIRAL

El virus ha sido aislado y preparado en una variedad de cultivos celulares, pero eso resulta demasiado problemático (2, 8, 31). Células derivadas de tejidos de canídeo, felino y mustelido han sido encontradas adecuadas para el crecimiento del virus bajo condiciones adecuadas (2, 5, 17).

Las muestras se toman en forma aséptica y utilizando frascos estériles, se seleccionan éstas de intestino delgado, contenido intestinal, ganglios mesentéricos, bazo, corazón y pulmón.

PROCESO: Manteniendo una temperatura de aproximadamente 4 grados centígrados y utilizando morteros estériles, se realizan triturados independientes al 10%, utilizando como diluyente Medio Esencial Mínimo (MEM) con un pH de 7-7.2 y adicionando

una mezcla de antibióticos, penicilina-estreptomicina en concentración al 2%.

Los triturados son sometidos a centrifugación refrigerada durante 15 minutos, manteniendo una velocidad de 5000 rpm; con el propósito de eliminar las partículas gruesas presentes. El sobrenadante se obtiene con pipetas estériles y es sometido a una nueva centrifugación refrigerada durante 15 minutos manteniendo una velocidad de 11 000 rpm. usando el sobrenadante para infectar cultivos celulares.

REPLICACION VIRAL IN-VITRO:

Cultivos primarios de células de riñón canino, crecidos en botellas de dilución de leche con tapón de baquelita, se infectan cinco días posteriores a la siembra con el sobrenadante proveniente de contenido intestinal, realizando los siguientes pasos:

1. Extracción del medio de crecimiento en forma estéril.
2. Infección con un mililitro del sobrenadante.
3. Incubación a 37 grados centígrados por 90 minutos en atmósfera húmeda y con 5% de CO₂.
4. Adición de 15 mililitros de medio de mantenimiento.
5. Observación diaria durante 4 días.
6. Cosecha y ruptura celular por tres tiempos de congelación y descongelación.
7. centrifugación a 2 000 rpm. durante 15 minutos a 4 grados centígrados.

8. División del sobrenadante en alícuotas y almacenaje del mismo a -70 grados centígrados. Este proceso, denominado paso ciego, se realiza en tres ocasiones por cada una de las muestras.

CULTIVOS CELULARES:

Con el sobrenadante obtenido se procede a infectar cultivos secundarios de riñón canino realizando los siguientes pasos:

1. De cuatro a cinco días posteriores a la siembra (tiempo suficiente para la formación del monoestrato) se procede a extraer en forma estéril el medio de crecimiento de cada una de las cajas, excepto la utilizada como control negativo.
2. Las cajas de petri conteniendo un cubreobjeto se infectan con .5 mililitro del sobrenadante obtenido al centrifugar los triturados a 11 000 rpm.
3. Se procede a incubar a 37 grados centígrados en atmósfera húmeda y con 5% de CO_2 durante 90 minutos, realizando agitaciones periódicas.
4. Pasando este tiempo se adiciona medio de mantenimiento en cantidad de 4 mililitros por caja.
5. Se realizan observaciones diarias durante 4 días, con el fin de observar el posible efecto citopático.
6. Cinco días post-infección se extraen las laminillas y se fijan en acetona durante 10 minutos.
7. Se procede a realizar la tinción de hematoxilina-eosina con el fin de observar los corpúsculos intranucleares basó-

filos causados por parvovirus (29).

3. PRUEBA DE HEMAGLUTINACION (H.A.)

1. Se sangra un cerdo sano asépticamente empleando como anti-coagulante solución Alseaver's en proporción 1:1
2. Los glóbulos rojos se lavan en PBS "A" en tres tiempos, centrifugando durante 10 minutos a 2 000 rpm.
3. El paquete de hematíes se diluye al 1% en PBS "A".
4. En una serie de tubos pequeños se colocan 0.25 mililitros de PBS "A" a cada uno.
5. Al primer tubo se le adiciona 0.25 mililitros del antígeno.
6. Se realizan diluciones dobles partiendo de 1:2 hasta 1:64 dejando un tubo control.
7. Posteriormente se adiciona 0.25 mililitros de la suspensión de hematíes a todos los tubos, se agitan y se incuban a 4 grados centígrados por cuatro horas.
8. Se realizan dos lecturas, una a los treinta minutos y la otra a las cuatro horas (2, 5, 17, 26, 29, 38, 52).

4. INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (H.I.)

El suero de los perros para esta prueba puede ser tratado con 0,1 mililitros de glóbulos rojos de cerdo al 50% en PBS "A". La absorción con globulos rojos se realiza por la presencia de isoaglutininas en el suero de algunos perros (5, 52). Algunas veces este tratamiento se puede omitir ya que la presencia de éstas es infrecuente (5).

1. Se diluye en forma seriada el suero tratado con PBS "A" en microplacas con 0.025 ml.
2. Se le agrega igual cantidad de virus ya titulado, en este caso puede contar con 4-8 unidades de hemaglutinación.
3. Se incuban las placas a temperatura ambiente por una hora.
4. Se adiciona 0.05 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 1% y se ponen a incubar a 4 grados centigrados por dos horas.
5. En cada prueba se incorpora un control positivo y otro negativo.
6. El título de anticuerpos se obtiene multiplicando la dilución más alta de suero que consiguió inhibir la hemaglutinación por el numero de unidades hemaglutinantes del virus causal (5, 20, 25, 26, 31, 38, 51).

5. PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTO.

Esta prueba es una de las más rápidas y seguras, siguiendo estos pasos:

1. Montar pequeñas fracciones del órgano en platinas y congelar dentro del criostato.
2. Realizar cortes de 4 micras de espesor.
3. Fijar en acetona durante 10 minutos. (La acetona puede estar fría o a temperatura ambiente).
4. secar al aire.
5. Delimitar el corte con lápiz graso y adicionar conjugado en cantidad suficiente para cubrir todo el corte.
6. Incubar durante 60 minutos a 37 grados centigrados en atmósfera húmeda.

7. Lavar en agua destilada en 3 tiempos de 10 minutos cada uno.
8. Secar al aire.
9. Colocar una gota de glicerina tamponada y montar un cubre-objetos.
10. Observar al microscopio de luz ultravioleta, con objetivo de 40x (2, 13, 29, 31).

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA SOBRE CULTIVO CELULAR.

1. Poner un cubreobjetos conteniendo monoestratos celulares de líneas de riñón canino o felino infectadas con 0,5 ml. del sobrenadante del procesamiento de una muestra.
2. Incubar durante 72 horas a 37 grados centígrados en atmósfera húmeda.
3. Fijar en acetona 10 minutos.
4. Secar al aire.
5. Delimitar el corte y adicionar el conjugado.
6. Incubar a 37 grados centígrados durante 1 hora.
7. Lavar en tres tiempos.
8. Secar y montar.
9. Observar (2, 8, 17, 29).

PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

Esta prueba sirve para identificar y medir los anticuerpos en el suero, o los antígenos en los tejidos o los cultivos de células. Cuando se busca un anticuerpo, el antígeno se usa bajo

forma de un frotis, corte o un cultivo de células.

1. El antígeno se incuba en presencia de un suero que pueda contener anticuerpos contra él, por 1 hora a 37 grados centígrados y finalmente toda la noche a 40 grados centígrados.
2. El suero se lava luego, dejando los anticuerpos unidos al antígeno
3. Es posible observar estos anticuerpos fijados incubando el frotis con un suero antiglobulina marcado con fluoresceína.
4. Se lava y se observa.
5. la fluoresceína indica la presencia de anticuerpos en el suero (31, 38, 51).

6. HISTOPATOLOGIA.

1. Se realizan cortes de tejidos a estudiar de 4 micras de espesor.
2. Se procede a realizar la tinción de hematoxilina-eosina y se observa al microscopio.

Las lesiones consisten en degeneración, necrosis e hipoplasia del epitelio intestinal, dilatación de las criptas de Lieberkuhn con contenido celular y atrofia de las vellosidades intestinales y ocasionalmente está presente una involución de las placas de Peyer en el duodeno con pérdidas de los centros germinativos de los linfocitos.

El timo y bazo están difusamente congestionados, así como una depresión y necrosis de los linfocitos. Muchos epitelios celulares pueden contener cuerpos de inclusión intranucleares

basófilos (10, 11, 13, 15, 38, 41, 47, 49).

7. PRUEBA DE SUERONEUTRALIZACION.

El nivel de anticuerpos de parvovirus canino puede ser determinado por esta prueba. Utilizando una modificación del método de anticuerpos fluorescentes directo.

Como sustrato se utiliza una suspensión de cultivo de células Crandall de riñón de gato. Se mezcla una cantidad de suero en diluciones crecientes con una mezcla igual de virus, conteniendo aproximadamente de 100-300 FAID 50/0.1 ml. Esta mezcla de suero-virus se incuba a 37 grados centígrados por una hora.

Una vez incubada la mezcla se agrega al sustrato, utilizando 4 pozos de la placa de microtitulación, se incuban a 37 grados centígrados en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ por 4 días.

Los monoestratos expuestos al virus se lavan con una solución buffer de fosfatos (PBS) con un pH de 7.2 y se fijan con acetona. Una vez fijados, las placas se tiñen con anticuerpo marcado con fluorisotiocianato (CVP) y el punto final de neutralización se calcula con una dilución 50% punto final (6, 14, 21).

PREVENCIÓN Y CONTROL: Existen 4 tipos de vacunas que son usadas regularmente para prevenir esta mortal enfermedad.

1. VACUNA DE VIRUS INACTIVADO DE PANLEUCOPENIA FELINA.

La respuesta a esta vacuna es rápidamente inhibida por la presencia de anticuerpos. Bajos niveles de anticuerpos, ya sea

adquiridos pasivamente o como resultado de una vacunación previa, pueden suprimir totalmente la respuesta a esta vacuna. se requieren 2 vacunaciones con 14 días de intervalo para lograr una buena inmunización. El principal inconveniente con esta vacuna parece ser su inhabilidad de desarrollar una inmunidad duradera, ya que es necesaria una revacunación cada 3-4 meses para mantener esta inmunidad (4, 5, 6, 31, 32, 34, 36, 38, 40, 46, 48). Algunos autores reportan la presencia de inmunidad después de 12 meses de aplicada la segunda dosis (12). Está comprobado que esta vacuna se puede utilizar con seguridad en perros de todas las edades y en hembras gestantes (32). Aunque hay que mantener cierta precaución, ya que esta vacuna puede contener diversas proteínas, por ejemplo, suero bovino. dichas proteínas pueden generar hipersensibilidad y posible anafilaxia en animales que reciben múltiples inyecciones de esta vacuna (45).

2. VACUNA DE VIRUS MODIFICADO DE PANLEUCOPENIA FELINA.

Los perros vacunados con esta vacuna no arrojan virus vacunal en heces. Por lo tanto, no transmiten inmunidad a perros que se encuentran en el mismo sitio de aislamiento.

La cinética y amplitud de la respuesta inmune implican que los antígenos virales persisten de una forma que pueden estimular el sistema inmunológico.

La ventaja de esta vacuna es una mayor y más temprana respuesta de anticuerpos. La desventaja es su inhabilidad para inmunizar a todos los perros. Una porción bastante significan-

te (aproximadamente un 42%) de los perros vacunados no crearon anticuerpos después de una sola inyección, pero la revacunación a las 3-4 semanas aumentó la eficiencia a un 80-90%.

Esta vacuna para su uso en perros, debe de contener por lo menos 1000 veces la cantidad mínima de virus requerido para inmunizar gatos (4, 32, 36, 45).

Su uso en perras preñadas no está recomendado aunque no se ha reportado algún efecto teratogénico en cachorros de perras preñadas que fueron inadvertiblemente vacunadas (31, 36, 38).

3. VACUNA DE VIRUS INACTIVADO DE PARVOVIRUS CANINO.

Esta vacuna ha demostrado ser eficaz y segura en la prevención de la infección, pero solo por un tiempo determinado.

Los perros inoculados ya no se encuentran inmunizados cuando se les inocula para desafío 12 semanas después de ser aplicada la vacuna. El virus de desafío fue eliminado en las heces y los anticuerpos (H.I.) subieron a los niveles de los perros testigo no vacunados.

La adición de hidróxido de aluminio a la vacuna no altera significativamente la respuesta de los perros. Por lo tanto, debe de revacunarse cada 3-4 meses para lograr una mejor protección (17, 31, 32, 45).

4. VACUNA DE VIRUS VIVO MODIFICADO DE PARVOVIRUS CANINO.

La vacunación de cachorros puede sustituir ventajosamente a la vacunación múltiple con vacunas heterólogas. Debiéndose es+

to a que la neutralización de la vacuna por los anticuerpos de origen materno se neutralizan utilizando virus vivo de origen homólogo (canino). Esta vacuna puede sobreponerse a niveles tales como 1:100 de inmunidad pasiva (14).

Esta vacuna produce inmunidad desde los tres días de su aplicación manteniendo títulos de anticuerpos elevados hasta 114 días de su aplicación independientemente de su vía de inoculación (intramuscular o subcutánea), lo cual, parece indicar que la vía de inoculación no afecta significativamente la rapidez de la respuesta inmune ni el nivel de anticuerpos alcanzados (21).

Se trata de una cepa vacunal que ha perdido su virulencia y produce una respuesta inmune duradera. Además tiene la cualidad que al ser eliminado en heces, puede infectar a otros animales que entren en contacto con el virus sin causarles la enfermedad y provocarles cierto nivel de respuesta inmune (4, 32).

También puede ser usada en perras preñadas ya que no produce infección fetal. Títulos de anticuerpos de más de 1:320 persisten por más de 1 año en estas perras (9). Cachorros nacidos de perras inmunizadas poseen anticuerpos aproximadamente entre las 12 y 16 semanas de edad (31, 36, 38).

El control es basado en la desinfección y en el aislamiento de los perros susceptibles. Este virus es altamente resistente al medio ambiente aún en condiciones adversas. Soluciones de cloro al 30% y formalina al 2-10% son agentes que rápidamente

lo inactivan, siendo recomendadas para 1 desinfección de equipo y perreras (1, 3, 8, 13, 32, 37, 45).

Se recomienda tener a los perros en óptimas condiciones de salud. El médico veterinario deberá de programar un calendario correcto de vacunación contra todas las enfermedades, desparasitación periódica contra endo y ectoparasitos, así como una alimentación adecuada (44).

TRATAMIENTO: El tratamiento es mayormente sintomático y esta orientado a restituir la deshidratación por medio de suero (lactato de ringer), vitaminas del complejo B, estimulantes del metabolismo y antibioticos de amplio espectro. Estos deberan ser aplicados durante la fase aguda de la enfermedad para prevenir infecciones secundarias que se verian favorecidas con la debilidad del animal. Antihemeticos, antidiarreicos, protectores de la mucosa intestinal, antivirales; Las transfusiones de sangre pueden ser tratamiento complementario, así como mantener el animal en un lugar caliente, tranquilo y seco (2, 8, 16, 31, 37, 38, 44, 54).

El tratamiento con suero inmune ya sea homólogo o derivado de panleucopenia felina a una dosis de 4 ml./kilogramo de peso vivo resulta de gran ayuda. Parcial protección ha sido encontrada en perros experimentalmente infectados que han sido tratados con suero heterólogo un día después de infectados (1, 3, 19, 36). El animal puede recuperarse espontáneamente entre

una semana y diez días, pero en brotes severos, aún con el tratamiento el desenlace puede ser fatal (44).

No hay evidencia que el parvovirus canino produzca infección en el humano (1, 4, 22, 23, 24, 39).

II. MATERIAL Y METODOS

De una colonia de perros mestizos de propiedad particular de la Unidad Morelos primera sección de Coacalco de Berriozabal del estado de México, se eligieron 12 cachorros de un promedio de edad de 3 a 6 meses y de 4 a 10 kilogramos de peso. De éstos se formaron 3 grupos de 4 cachorros cada uno, constituyendo el grupo A, B y testigo. Los animales fueron bañados, desparasitados e instalados en jaulas comunales por grupo, se les proporciono alimentación comercial y 10 días despues fueron sangrados con el proposito de determinar la presencia de anticuerpos en el suero contra el parvovirus canino por medio de la prueba de la inhibición de la hemaglutinación. Estas pruebas fueron realizadas en el laboratorio de Virologia de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

1. Se utilizarón 12 cachorros suero-negativos a parvovirus canino.
2. Aguja y jeringas estériles.
3. Tubos vacutainer
4. Equipo y reactivos para la prueba de hemaglutinación (H.A.)
 - a) Antígeno. La misma vacuna fué utilizada como antígeno. Se utilizó virus vivo modificado de parvovirus canino y de panleucopenia felina.
 - b) Solución buffer de fosfatos con pH de 7.2.
 - c) Solución PBS "A".

- d) Glóbulos rojos de cerdo al 1% en PBS "A".
- e) Anticoagulante: Solución Alseaver's en proporción 1:1.

Dextrosa.....20.5 grs.

NaCl..... 4.2 grs.

Acido cítrico.....0.55 grs.

Citrato de sodio.... 8.0 grs.

Agua destilada c.b.p. 1 000 ml.

Esta solución se esteriliza por autoclave 10 minutos a 10 libras de presión.

- f) Centrífuga y tubos de centrífuga.

- g) Matraz de 100 ml.

- h) Tubos ensaye pequeños.

- i) Pipetas graduadas.

- j) Gradilla.

- k) Refrigerador.

- l) potenciómetro.

5. Equipo y reactivos para la prueba de inhibición de la hemaglutinación (H.I.).

- a) Antígeno ya titulado a 4 unidades de hemaglutinación.

- b) Solución de fosfatos con pH de 7.2.

- c) Solución PBS "A".

- d) Glóbulos rojos de cerdo al 1%.

- e) Microplacas.

- f) Tubos vacutainer.
- g) Jeringas y agujas estériles.
- h) Centrifugadora y tubos de centrifuga.
- i) Pipetas pasteur.
- j) Matraz de 100 ml.
- k) Potenciómetro.
- l) Refrigerador.

Comprobando que no hay anticuerpos, los animales del grupo A fueron vacunados intramuscularmente en la región de la pierna y reforzados con una segunda inoculación a los 14 días después de la primera con la vacuna designada con el número 1 (Virus vivo modificado de panleucopenia felina).

El grupo B también fue vacunado en la region de la pierna y reforzado con una segunda inoculación 14 días después de la primera con la vacuna designada con el número 2 (Virus vivo modificado de parvovirus canino).

El grupo testigo permaneció sin vacunar para detectar cualquier exposición accidental al virus, lo que pudiera alterar la prueba.

El sangrado del grupo A, B y testigo se hizo 5 veces de esta manera:

1. Un día antes de la primera inoculación de la vacuna.
2. Siete días después de la inoculación de la vacuna.
3. Catorce días después de la primera inoculación y unas ho-

ras antes de la segunda inoculación de la vacuna.

4. Veintiún días después de la primera inoculación, o sea, siete días después de la segunda inoculación de la vacuna.

5. Veintiocho días después de la primera inoculación, o sea, catorce días después de la segunda inoculación de la vacuna.

Se procedió a la titulación del antígeno, en este caso se usó la misma vacuna, por medio de la prueba de hemaglutinación viral y, se utilizó 4 veces la dosis mínima hemaglutinante del virus para la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

TITULACION DEL VIRUS POR HEMAGLUTINACION.

1. Se sangra un cerdo sano asépticamente, empleando como anticoagulante solución de Alseaver's en proporción 1:1.

2. Los glóbulos rojos se lavan en PBS "A" en 3 tiempos centrifugando durante 10 minutos a 2000 rpm.

3. El paquete de hematíes se diluye al 1% en PBS "A".

4. En una serie de pequeños tubos se coloca 0.25 ml. de PBS a cada uno.

5. Al primer tubo se le adiciona 0.25 ml. del antígeno (vacuna).

6. Se realizan diluciones dobles partiendo de 1:2 hasta 1:64 dejando un tubo control.

7. Posteriormente se le agrega 0.25 ml. de la suspensión de glóbulos rojos de cerdo al 1% a todos los tubos, se agitan y

se incuban por 4 horas a 4 grados centigrados.

8. Se realizan 2 lecturas, una a los 30 minutos. y la otra a las 4 horas.

El resultado de las lecturas fué una aglutinación en la dilución 1:16 para los dos antígenos, el canino y el felino, siendo la dosis mínima aglutinante, pero sabiendo que se necesitan 4 unidades aglutinantes para la prueba de inhibición de la hemaglutinación fué hasta la dilución 1:4 que nos dió las 4 U.H.

Conocido el poder aglutinante del virus se procedió a la extracción de la sangre (10 ml.) de la vena cefálica de los cachorros para su posterior extracción del suero por medio de la centrifugación a 2 500 rpm. por 10 minutos, para la realización de la prueba de (H.I.) y calcular los niveles de anticuerpos desarrollados por medio de la vacunación.

PRUEBE DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (H.I.).

1. Se diluyó el suero en PBS "A" en forma seriada en microplacas con 0.025 ml.
2. Se le agrega igual cantidad de virus ya titulado, en este caso contando con 4 U.H.
3. Se incuban las placas a temperatura ambiente por 1 hora.
4. Se adicionan 0.05 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 1% y se ponen a incubar a 4 grados centigrados por 2 horas.
5. El titulo de anticuerpos se obtuvo multiplicando la diluci-

ón más alta del suero que consiguió inhibir la hemaglutinación por el número de unidades hemaglutinantes del virus.

6. En cada prueba se incorporó un control positivo y otro negativo.

III. RESULTADOS

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION VIRAL

0	0	0	0	0	0	0	0
1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	TESTIGO
16	8	4	2	1 UNIDADES HEMAGLUTINANTES			NEGATIVO

EN ESTA PRUEBA SE OBTUVO IGUAL RESULTADOS PARA LOS ANTIGENOS DE ORIGEN CANINO Y FELINO.

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

GRUPO A

FERRO	VIA DE ADMINISTRACION	TIPO DE VACUNA	TITULO DE ANTICUERPOS DESPUES DE LA VACUNACION				
			1	7	14	21	28 DIAS.
1	I.M.	P.L.F.V.	1:2	1:2	1:8	1:32	1:32
2	I.M.	P.L.F.V.	1:2	1:2	1:8	1:32	1:64
3	I.M.	P.L.F.V.	1:2	1:2	1:16	1:64	1:64
4	I.M.	P.L.F.V.	1:2	1:2	1:8	1:64	1:64
MEDIA ARITMETICA			1:2	1:2	1:10	1:48	1:56

I.M.=INTRAMUSCULAR

P.L.F.V.=VIRUS VIVO MODIFICADO DE PANLEUCOPENIA FELINA.

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

GRUPO B

PERRO	VIA DE ADMINISTRACION	TIPO DE VACUNA	1	7	14	21	28 DIAS
5	I.M.	P.V.C.	1:2	1:256	1:4096	1:16384	1:32768
6	I.M.	P.V.C.	1:2	1:64	1:512	1:2048	1:8192
7	I.M.	P.V.C.	1:2	1:128	1:1024	1:4096	1:8192
8	I.M.	P.V.C.	1:2	1:256	1:2048	1:8192	1:32768
MEDIA ARITMETICA			1:2	1:176	1:1920	1:7680	1:20480

P.V.C.=VIRUS VIVO MODIFICADO DE PARVOVIRUS CANINO.

PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION.

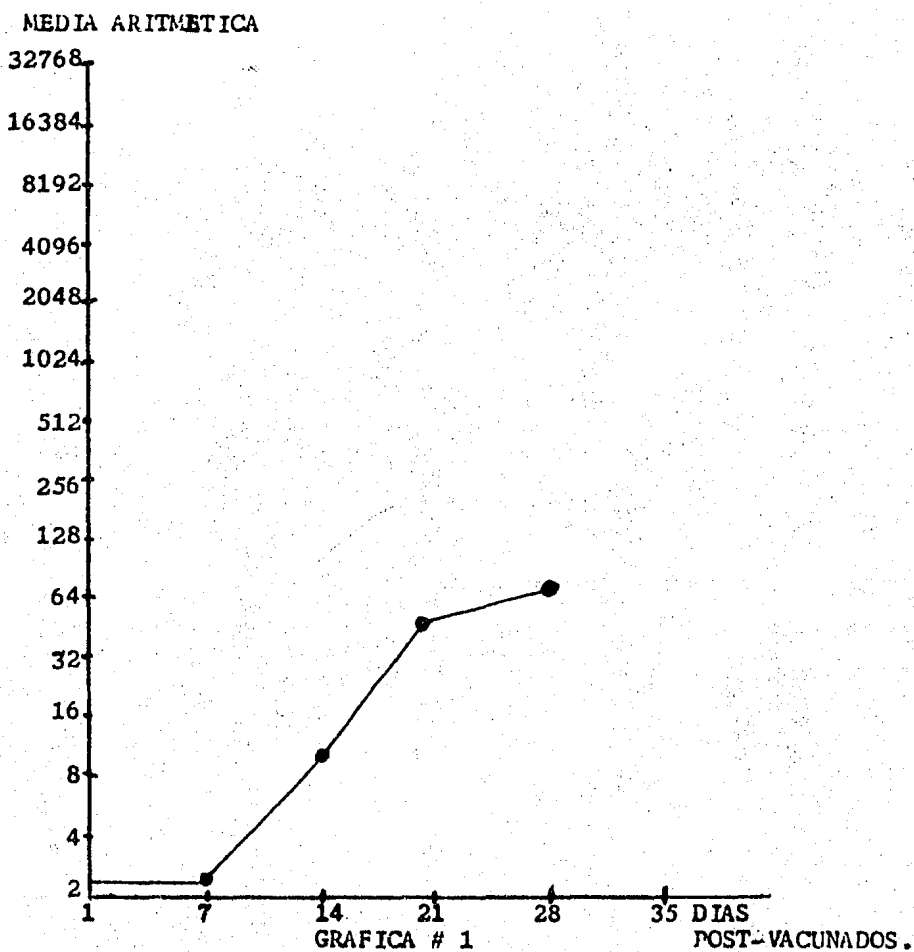
GRUPO TESTIGO

		1	7	14	21	28 DIAS
9	CONTROL	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
10	CONTROL	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
11	CONTROL	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
12	CONTROL	1:2	1:2	1:2	1:2	1:2
MEDIA ARITMETICA		1:2	1:2	1:2	1:2	1:2

CONTROL= PERMANECIERON SIN VACUNAR.

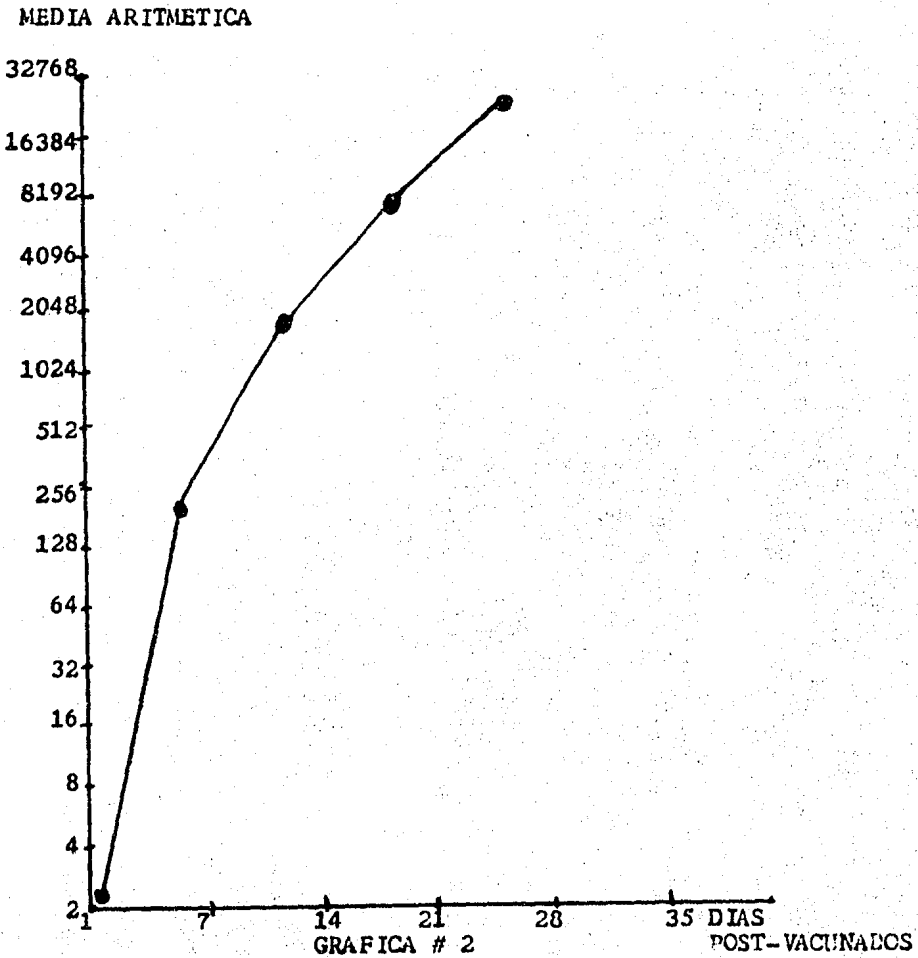
NIVEL DE ANTICUERPOS EN CACHORROS DESPUES DE VACUNADOS CON 2
DOSIS DE VACUNA DE VIRUS VIVO MODIFICADO DE PANLEUCOPENIA
FELINA.

Hay poca formación de anticuerpos debido a la especificidad de
especie que presenta la partícula viral.



NIVEL DE ANTICUERPOS EN CACHORROS DESPUES DE VACUNADOS CON 2
DOSIS DE VACUNA DE VIRUS VIVO MODIFICADO DE PARVOVIRUS CANINO.

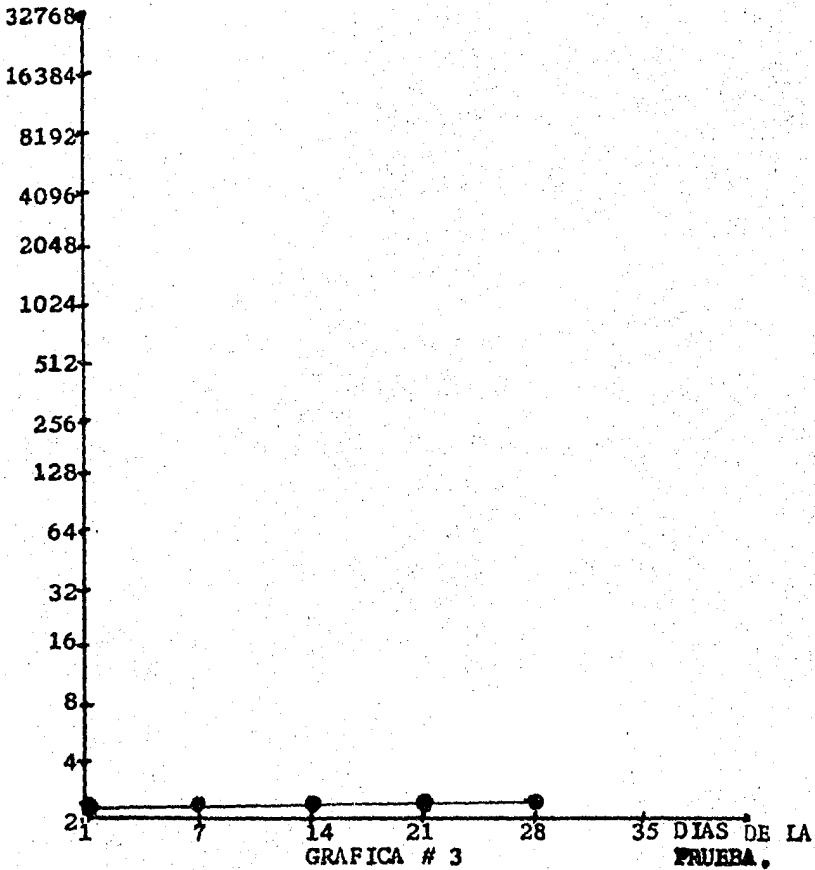
Se observa un importante aumento en el nivel de anticuerpos
debido a que la partícula viral mantiene su capacidad multi-
plicativa en una especie para la cual es específica.



NIVEL DE ANTICUERPOS EN CACHORROS DEL GRUPO CONTROL.

Los cachorros se mantuvieron suero-negativos lo que quiere decir que no hubo exposición accidental al virus, que hubiera alterado la prueba.

MEDIA ARITMETICA



IV. DISCUSSION

Se observa una diferencia importante entre la vacuna de origen canino y la de origen felino.

La vacuna de virus vivo modificado canino, que fué aplicada en dos dosis con 14 días de intervalo, produjo una reacción 365 veces más alta que la lograda por la vacuna de virus vivo modificado de panleucopenia felina.

Si teóricamente se necesita un nivel de 1:12 de anticuerpos para considerar que existe inmunidad, se observa que a partir del séptimo día post-vacunación el grupo que recibió vacuna de origen canino, presenta un título superior que continúa incrementándose geométricamente, hasta alcanzar un nivel de 1:20480 a los 28 días de efectuada la vacunación.

Esto puede ser debido a la especificidad de especie que presenta el virus, ya que la capacidad de replicación de la partícula viral por estar viva, manteniendo su capacidad multiplicativa y estimulante del sistema inmune. La segunda dosis o de refuerzo puede proveer una respuesta memoria, alcanzándose títulos mucho más altos como en una respuesta secundaria clásica (anamnesis).

De los perros que recibieron la vacuna de origen felino, se obtuvo una reacción inicial mucho más baja, de los cuales,

sólo uno obtuvo título de anticuerpos protectores a los 14 días de iniciada la vacunación, los tres restantes alcanzaron inmunidad aproximadamente entre los días 16 y 17 post-vacunados.

El hecho de que los perros del grupo control se mantuvieran suero-negativos, eliminó la posibilidad de una exposición incidental a la enfermedad.

Debido, a que la cantidad de animales por grupo no es suficiente, no se realizó un análisis porcentual de los resultados obtenidos.

V. CONCLUSIONES

1. La vacuna de origen canino virus vivo modificado produjo - una rápida respuesta inmune, cuyos títulos permanecen elevados desde el séptimo día de iniciada la vacunación y que continúa incrementándose en comparación con los producidos - con la vacuna de origen felino.

2. Es importante señalar que en ausencia de la vacuna viva modificada de origen canino, al hacer uso de la vacuna de - origen felino se debe de evitar el contacto de los perros - con el virus, ya que esta vacuna empieza a desarrollar nivel de anticuerpos protectores aproximadamente entre 14 y 17 - días de iniciada la vacunación.
El hecho podría explicarse por la baja capacidad de multipli - cación de la partícula viral en una especie para la cual el virus vivo es altamente específico, y por lo tanto la con - centración de antígeno no se considera altamente estimulato - ria.

3. La vacuna de origen canino al producir una respuesta inmune mucho más alta; al comprobar que no se inhibe en presencia de anticuerpos maternos y que su uso se recomienda en perras preñadas, se considera uno de los biológicos ideales para prevenir la enfermedad.

4. Debido a que la gastroenteritis hemorrágica viral canina es una enfermedad altamente contagiosa y con una mortalidad -

elevada, se debe de tener estrictas medidas de prevención y control para evitar su propagación.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Appel, M. J.: Canine Parvovirus Infection - An Emerging Disease. Cornell Res. Lab. for Dis. of Dogs., 1:1-3 (1979).
2. Appel, M. J., Cooper, B. J., Greisen, H., Carmichael, L. E. and Scott, F.: Canine Viral Enteritis. I Status Report on Corona and Parvo-Like Viral Enteritides. Cornell Vet., 69:124-133 (1979).
3. Appel, M. J., Meunier, P., Glickman, L. and Carmichael, L. E.: Enteritis Viral Infections of Dogs. Gaines Veterinary Symposium. United States, (1979).
4. Appel, M. J., Pollock, R. V. H., Meunier, P. C. and Carmichael, L. E.: What's Happening in Parvo?. Calif. Vet., 35:8-11 (1981).
5. Appel, M. J., Scott, F. W. and Carmichael, L. E.: Isolation and Immunisation Studies of Canine Parvo-Like Virus From Dogs With Haemorrhagic Enteritis. Vet. Rec., 105:156-159 (1979).
6. Black, J. W.: Estudios de comparación Serología en Vacunas Parvovirus Comercialmente Registradas. Estudios Especializados Nashville. United States, (1983) 1-6.
7. Black, J. W., Holscher, M. A., Powell, H. S. and Byerly, C. S.: Parvoviral Enteritis and Panleucopenia in Dogs. Vet. Med. Sm. An. Clin., 74:47-50 (1979).
8. Carmichael, L. E. and Appel, M. J.: Canine Viral Enteritis. Mod. Vet. Pract., 1:375-380 (1979).

9. Carmichael, L. E., Joubert, J. C. and Pollock, R. V. H.:
A. Modified Live Canine Parvovirus Strain With Novel Plaque Characteristics. I. Viral Attenuation and Dog Response. *The Cornell Veterinarian*, 71:408-427 (1981).
10. Carpenter, L. J., Roberts, R. M. and Harpster, H. K.: Intestinal and Cardiopulmonary Forms of Parvovirus Infection in a Litter of Pups. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176:1269-1273 (1980).
11. Cooper, B. J., Carmichael, L. E., Appel, M. J. and Greisen, H.: Canine Viral Enteritis. II Morphologic Lesions in Naturally Occurring Parvovirus Infection. *Cornell Veterinarian*, 69:135-144 (1979).
12. Chapok, M. L. and Strauss, A.: Duration of Immunity in Dogs Inoculated With an Inactivated Feline Parvovirus Vaccine. *Vet. Med. Small An. Clin.*, 74:1319-1324 (1981).
13. Chui, M. R., Fung, H. P. and Liu, C. H.: Pathological Lesions of Spontaneous Parvovirus Enteritis of Dogs. *J. Chin. Soc. Sci.*, 7:81-84 (1981).
14. Edwards, B. G.: Estudios de Vacunacion con Parvovirus Canino Vivo Modificado en Cachorros con Anticuerpos Maternos. *Research and Development Vaccines Inc. Texas* (1982).
15. Else, R. W.: Fatal Haemorrhagic Enteritis in a Puppy Associated With a Parvovirus Infection. *Vet. Rec.*, 106:14-15 (1980).
16. Erbeck, D. H.: Parvovirus. *Vet. Med. Sm. An. Clin.*, 77:1755-1758 (1981).
17. Eugster, A. K.: Studies on Canine Parvovirus Infections: De-

velopment of an Inactivated Vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 4:2020-2024 (1980).

18. Fenner, F., Mc Auslan, B.R., Mims, C. A. and White, D. O.: *The biology of Animal Viruses*. Second Edition. Academic Press. United States, 1974.

19. Fletcher, C. K. and Eugster, A. K.: Parvovirus Infection in Maned Wolves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 175:897-900 (1979).

20. Flower, R. L., Wilcox, G. E. and Robinson, W. F.: Antigenic Differences Between Canine Parvovirus and Feline Panleucopenia Virus. *Vet. Rec.*, 107:254-257 (1980).

21. Fulker, R. H., Edwards, B. G. and Acree, W. M.: Protección Inmediata Contra Parvovirus Canino con Vacuna Homóloga de Virus Vivo Modificado. *Res. and Dev. Vacc. Inc. Texas* (1982) 1-6.

22. Gill, E.: Information on Parvovirus. *Vet. Rec.*, 8:22 (1980).

23. Gillespie, J. H. and Timoney, J. F.: Hagan and Bruner's. *Infectious Diseases of Domestic Animals*. Seventh Edition. Cornell University Press. United States 1981.

24. Gourley, J.: Canine Parvovirus Outbreak. *Animal Disease Diagnostic Laboratory, Department of Agriculture. Iowa.*, 29:265 (1980).

25. Grist, N. R., Ross, C. A., Bell, E. J. and Stott, E. J.: *Diagnostic Methods in Clinical Virology*. First Published. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1966.

26. Hannon, W. M. and Sather, G. S.: *Arboviruses in Lennete*. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections*.

- Second Edition. American Public Health Association Inc. United States, 1969.
27. Hayes, M. A., Russell, R. G. and Babiuk, L. A.: Sudden Death in Young Dogs With Myocarditis Caused by Parvovirus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174:1197-1203 (1979).
 28. Hernández, B. E. y Mar, C. R.: Clasificación de Virus de Vertebrados. Resumen del Tercer Reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus., México, D. F. (1978) 1-27.
 29. Identificación del Parvovirus en México.: Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Sanidad Animal. Subdirección de Referencia en Salud Animal., 9:1-3 (1980).
 30. Jesyk, P. F., Mark, E. H. and Jones, C. A.: Myocarditis of probable Viral Origin in Pups of Weaning Age. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 174:1204-1207 (1979).
 31. Kramer, J. M., Meunier, P. C. and Pollock, R. V. H.: Canine Parvovirus: Update *Vet. Med. Sm. An. Clin.*, 15:1541-1555 (1980).
 32. Levy M. C.: Enteritis Virales en Perros. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. F.E.S.-C. U.N.A.M. México 1981.
 33. Mc Candlish, I. A. P., Thompson, H., Cornell, H. J. C., and Laird, H.: Isolation of a Parvovirus From Dogs in Britain. *Vet. Rec.*, 105:167-168 (1979).
 34. Mc Candlish and Others.: Parvovirus Infection in Dogs. *Vet. Rec.*, 106:540 (1979).
 35. Mc Candlish and Others.: Canine Parvovirus Infection. *Vet. Rec.*, 107:204-205 (1980).
 36. Mc Candlish, I. A. P., Thompson, H., Fisher, E. W., Cornwell,

- H. J., Macartney, J. and Walton, I. A.: Canine Parvovirus Infection. *Vet. Med. Sm. An. Clin.*, 1:7-14 (1981).
37. Mc Carthy, G.: Canine Parvovirus Infection. *Irish Vet. J.*, 6:15-19 (1980).
38. Medina, B. W. F.: Diagnóstico Clínico, Tratamiento Sintomático y Prevención de la Gastroenteritis Hemorrágica Viral Canina. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. F.B.S.-C. U.N.A.M. México, 1981.
39. Mcunier, P. C., Glickman, L. T., Appel, M. J. and Shin, S.: Canine Parvovirus in a Commercial Kennel: Epidemiologic and Pathologic Findings. *Cornell Veterinarian*, 71:96-109 (1981).
40. Morailion, A.: Canine Parvovirus : Safety and Efficacy of Attenuated Feline Panleucopenia Vaccine. *Vet. Rec.*, 106:24 (1980).
41. Nettles, V. F., Pearson, J. E., Gustafson, G. A. and Blue, J.: Parvovirus Infection in Translocated Raccoons. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 177:787-789 (1980).
42. North, d. c.: Canine Parvovirus Disease. *Vet. Rec.*, 107:265 (1980).
43. Okin, R. E.: Canine Parvovirus. *Canine Practice Medicine*, 7:51-53 (1980).
44. Payro, J. L. y Casillas, P.: Gastroenteritis Hemorrágica por Parvovirus. *Revista Xolo. Organó Oficial de la Federación Canófila Mexicana A. C.*, 6:9-12 (1980).
45. Pollock, R. V. H.: Vaccine Strategies for C.P.V. Immunization. *N. Y. State College of Veterinary Medicine. Ithaca* (1980). 4-7.

46. Prole, J. H. B. :Vaccination of Greyhounds Against Canine Parvovirus. *Vet. Rec.*,106:4 (1980).
47. Robinson, W. F.,Wilcox, G. E. and Flower, R. L. P. :Canine parvoviralDisease: Experimental Reproduction of the Enteric Form With a Parvovirus Isolated From a Case Myocarditis. *Veterinary Pathologic.*,17:589-599 (1980).
48. Ruth, D. T. and Emery, J. B. :Clinical Trial of a Modified Live Parvovirus Vaccine for Dogs. *Vet. Med. Sm. An. Clin.*, 8:830-833 (1981).
49. Stephano, H. A.:Epizootia de Enteritis Viral Canina en México. Posible Infección por Parvovirus.*Revista Xolo.Organo Oficial de la Federación Canófila Mexicana A. C.*,7:14-20 (1981).
50. Thompson, G. W. and Gagnon, A.:Canine Parvoviral Enteritis: A Disease Entity. *Canadian Veterinary Journal.*,2:158 (1980).
51. Tizard, R. I.:*Inmunología Veterinaria. Primera Edicion.* Editorial Interamericana. México, 1979.
52. Walker, S. T.,Seilen, C. P.,Sabine, M.,Love, D. N. and Jones, R. F.: A Serological Survey of Canine Parvovirus Infectin in New South Wales, Australia. *Vet. Rec.*,106:324-325 (1980).
53. Wilson, N. D. :Suspected Parvovirus Outbreak. *Vet. Rec.*, 106:212 (1980).
54. Wood, CH. B.,Pollock, R. V. H. and Carmichael, L. E. : Canine Parvoviral Enteritis. *J. of the Am. An. Hosp. Assoc.*, 16:172-179 (1980).