

85
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"ELABORACION DE UN CONJUGADO FLUORESCENTE
EXPERIMENTAL PARA EL DIAGNOSTICO DE
PARVOVIROSIS CANINA"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARIO ALBERTO TRUJILLO OROPEZA

Dirigida por :
M.V.Z.M. Sc. RAUL ARTURO MAR CRUZ

Abril de 1990



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

Página

I.	TITULO DE LA TESIS	
II.	INTRODUCCION	01
	1) El Problema de la Parvovirus Canina	01
	2) El Diagnóstico de Parvovirus Canina	09
	3) Diagnóstico de Confirmación de Parvovirus - Canina	13
	4) La Inmunofluorescencia como Alternativa en el Diagnóstico de Confirmación	18
	5) La Técnica de Anticuerpos Fluorescentes como Recurso en el Diagnóstico de Parvovirus Ca- nina	30
III.	OBJETIVOS DE LA TESIS	32
IV.	MATERIALES Y METODOS	33
	Materiales (Soluciones y Reactivos)	33
	Equipo	34
	Métodos	54
V.	RESULTADOS	45
VI.	DISCUSION	50
VII.	CONCLUSIONES	52
VIII.	BIBLIOGRAFIA	54

I. Título de la Tesis:

"ELABORACION DE UN CONJUGADO FLUORESCENTE

EXPERIMENTAL PARA EL DIAGNOSTICO DE PARVO

VIROSIS CANINA".

II. INTRODUCCION.

1) EL PROBLEMA DE LA PARVOVIROSIS CANINA.

El problema de la parvovirus canina se presentó relativamente hace poco tiempo. En el año de 1970, Binn y colaboradores tomaron muestras rectales de perros sanos y aislaron un virus del grupo parvovirus al que llamaron "minute virus". En 1976, Siegl basándose en estudios serológicos estimó que el virus estaba difundido en los canideos de los Estados Unidos de América sin reconocer su patogenicidad. En 1977, Eugster y colaboradores lograron observar al parvovirus en heces diarreicas en cachorros enfermos que se recuperaron espontáneamente entre los cinco y diez días posteriores a los primeros signos (1, 2). En febrero de 1978, Carmichael observó en los estados del este y suroeste de los Estados Unidos una epizootia sumamente contagiosa en canideos con cuadro clínico gastroentérico, siendo en ocasiones fatal, el cual fue atribuido a un Coronavirus. En el mes de agosto del mismo año los autores observaron parvovirus por medio de la microscopía electrónica en heces de canideos sospechosos de Coronavirus, lo que demostró que se trataba de dos enfermedades con el mismo cuadro clínico, pero de diferente etiología viral.

A finales de 1978, la enfermedad estaba difundida en todos los Estados Unidos (1, 3, 4).

En el mismo año Kelly y Atwell descubrieron en Australia -- una miocarditis de probable origen viral en canideos, la cual fue confirmada posteriormente por ser causada por parvovirus.

En el mismo año Post y Feldman reportaron en Canadá un caso de gastroenteritis similar a los casos observados en Estados Unidos de Norteamérica.

En general a partir de 1978 fueron reportados múltiples brotes de gastroenteritis hemorrágicas y miocarditis causadas por parvovirus en perros de países como Alemania, Austria, Bélgica, Canadá, E.U., Francia, Holanda, Inglaterra, Panamá y Suiza.

En México los primeros casos se reportaron en marzo, abril y junio de 1980, en los estados de México, Puebla, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Morelos y Veracruz, así como en el Distrito Federal. (2, 3, 7).

La enfermedad se difunde rápidamente de un lugar a otro por vectores como moscas, cucarachas e insectos hematófagos, a través de objetos inanimados como material orgánico en contacto con comederos, bebederos, jaulas, botes, ropa, etc., o bien cualquier individuo como médico veterinario o personal de limpieza; está bien demostrado que por contacto de un animal enfermo a otro susceptible se difunde la enfermedad (1, 3, 5, 6).

El agente causal de la gastroenteritis viral de los caninos es miembro de la familia parvoviridae. Los parvovirus se han aislado a partir de numerosos huéspedes vertebrados como son: Bovinos, porcinos, perros, conejos, gansos, gatos y posiblemente de hamsters y ratas. Estos agentes son isométricos, no poseen envoltura y contienen una cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (DNA), cuyo peso molecular es de 1.5 a 2.2 millones de Daltons; son virus resistentes al éter, al cloroformo, al calor y a los ácidos.

Todos los parvovirus se replican en el núcleo de las células durante ciertas fases del ciclo de división de las mismas (8, 9). Existe también una cierta interacción antigénica entre los virus de la panleucopenia felina, el parvovirus canino y el virus de la enteritis de los visones (MEV), la cual se puede demostrar mediante pruebas de seroneutralización, de hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación (3, 10, 11, 12, 13).

Una de las características importantes del parvovirus canino es su capacidad de aglutinar a los glóbulos rojos de porcino y de primate; esta propiedad se aprovecha con fines de diagnóstico (3, 11).

El agente es sumamente resistente a los cambios bruscos de temperatura y pH, además resistente a la acción de los desinfectantes comunes, por lo que las infecciones se diseminan con facilidad, persistiendo por tiempos prolongados en áreas contaminadas. Son resistentes a la acción del formol en proporciones menores a 1:30 (14).

La principal vía de infección es oral, aunque también se ha demostrado que el cuadro clínico puede reproducirse experimentalmente al inocular perros por vía oronasal, nasal, intramuscular-intravenosa y subcutánea (3, 15, 16, 17, 18).

Aún no se conoce si la infección natural puede ocurrir por otra vía diferente a la oral; se desconoce también la dosis mínima infecciosa.

Los animales infectados eliminan al virus en las heces, llegan a alcanzar títulos de hasta 1×10^9 viriones infecciosos por gramo de materia fecal (18, 19).

Es posible que durante la fase de viremia el virus sea eliminado también en algunas secreciones.

La eliminación del virus en las heces de perros infectados ocurre durante aproximadamente dos semanas a partir del tercer día posterior a la infección experimental por vía oral.

En algunos casos puede prolongarse la fase de eliminación hasta por veinticinco días después de que ha ocurrido la infección de manera que, la amplia diseminación de la enfermedad parece deberse al hecho de que el virus es sumamente resistente a factores ambientales y a la diseminación por perros crónicamente infectados (18, 20, 21, 22).

La capacidad del parvovirus canino de causar enfermedad parece estar limitada a la especie canina, así se ha observado en el perro doméstico, y algunas referencias indican que se presenta en coyotes, algunas variedades de zorras, así como en ciertas variedades de lobos (23, 24, 25).

Aun cuando no se cuente con información suficiente respecto a la susceptibilidad de los seres humanos, se cree que son resistentes a la infección por parvovirus canino (26, 27).

La infección por parvovirus en los perros puede dar origen a dos formas clínicas diferentes: Una gastroentérica y otra cardíaca o miocárdial. La mortalidad es mayor en esta última (28).

FORMA ENTERICA.

Esta forma clínica puede producirse en perros de cualquier edad, los signos clínicos más comunes son vómito y diarrea que en la mayoría de los casos es de color grisáceo y frecuentemente hemorrágica. Al inicio de la enfermedad hay de-

presión, anorexia y fiebre; la diarrea se hace aparente entre las seis y veinticuatro horas siguientes a la aparición de los primeros indicios de enfermedad.

El vómito puede ocurrir simultáneamente con la presentación de la diarrea, sin embargo, en numerosos casos puede estar ausente.

En algunos animales se produce el reflejo del vómito, pero este es improductivo. La diarrea propicia un cuadro de deshidratación severa, la cual es más frecuente en los casos - en los que la diarrea es hemorrágica.

Aquellos animales en los que no hay hemorragia, tienen más posibilidades de sobrevivir que aquellos en los que se produce el cuadro hemorrágico, independientemente de que se aplique tratamiento o no. La muerte suele estar asociada a estados severos de deshidratación (4, 12, 21, 28, 29, 30, - 31, 32).

Al realizar estudios hematológicos de los perros clínicamente afectados, es posible identificar cierto grado de leucopenia. Es probable que en aquellos en que la leucopenia esté más marcada, será mayor la severidad de la infección -- (33).

Durante la fase de recuperación se observa un incremento en la cuenta de leucocitos. (33)

FORMA CARDIACA.

Esta forma de presentación de la parvovirus en perros se ha diagnosticado solamente en cachorros menores de doce semanas de edad, sin embargo, puede darse el caso de que animales adultos que sobrevivieron a un proceso de miocarditis

de origen parvoviral sufran de fallas cardiacas a la edad de cinco meses o aún mayores (34, 35).

La forma cardiaca se produce en una tasa del 50% de mortalidad en camadas afectadas. Los miembros de las camadas que logran sobrevivir son animales aparentemente normales; pero al practicar en ellos electrocardiogramas se pueden identificar indicios de miocarditis, la que por lo general ocurre aún en ausencia de signos de enteritis o bien puede manifestarse de tres a seis semanas después de que los animales se han recuperado del cuadro entérico (34, 36).

Los cachorros presentan dolor abdominal y permanecen postrados, a la auscultación se pueden identificar arritmias cardiacas, disnea e incluso edema pulmonar. El electrocardiograma confirma las anormalidades en el ritmo cardiaco.

Es común encontrar al cachorro muerto sin que se haya manifestado signo alguno de enfermedad. En ocasiones la muerte se produce pocas horas después de diagnosticar el padecimiento, independientemente de que se aplique o no algún tratamiento.

La muerte se produce a consecuencia de fallas en la conducción de impulsos nerviosos a nivel de miocardio (34).

Microscópicamente las lesiones más representativas se observan en el aparato digestivo, linfo-hematopoyético y corazón (5, 7, 36, 37, 38, 41, 42, 44, 45).

En el estómago encontramos congestión de la mucosa, ausencia de contenido o líquido claro espumoso amarillento o grisáceo, pudiéndose observar hemorragias petequiales y equimóticas en la serosa (39, 40, 41).

En el intestino delgado las partes más afectadas son el íleon y yeyuno; el duodeno es usualmente poco afectado al igual que el colon. Hay distensión por persistencia de gas, marcadas hemorragias petequiales y congestión en serosa; el contenido intestinal varía desde pastoso amarillento a grisáceo hasta líquido sanguinolento e incluso con filamentos de fibrina. (5, 7, 36, 40, 41, 43, 44, 45).

La mucosa presenta lesiones características de denudación del epitelio, engrosamiento de la pared con fluido edematoso y en ocasiones fibrinoso. Toda la mucosa está congestionada y hemorrágica con algunas áreas necróticas e inclusive úlceras redondas.

En el intestino grueso ocasionalmente podemos encontrar congestión, ligeras hemorragias y edema de la mucosa; y como dato usual la presencia de heces pastosas mezcladas con sangre siempre es observable (3, 39).

El timo presenta atrofia y necrosis en la zona cortical, el órgano tiene una consistencia cartilaginosa.

El bazo se encuentra aumentado de tamaño con congestión y hemorragias petequiales (5, 21).

Los ganglios linfáticos mesentéricos se presentan inflamados, congestionados, hemorrágicos y edematosos (5, 41).

La médula ósea se observa generalmente hemorrágica y de color obscuro (36, 42).

El hígado se encuentra engrosado, congestionado y de consistencia friable (41).

En el corazón, los ventrículos se encuentran dilatados con zo-

nas congestionadas y pálidas con apariencia moteada, en el surco coronario del miocardio hay presencia de hemorragias petequiales y equimóticas (5, 44).

Los pulmones presentan congestión pasiva y edema e incluso con inflamación y hemorragias en serosa; puede o no haber líquido en cavidad pleural (5, 16, 36, 39, 41, 44).

Microscópicamente los cambios histológicos son muy variables, ya que dependen de la severidad de la enfermedad.

A nivel del tracto digestivo se observa denudación de la mucosa con pérdida o atrofia de las vellosidades intestinales; la mucosa está inflamada con hemorragias petequiales y áreas necróticas, además está engrosada y edematosa. También se observa necrosis de las criptas de Lieberkuhn o bien éstas pueden estar dilatadas con contenido necrótico celular.

Pueden observarse cuerpos de inclusión intranucleares basófilos en las células epiteliales de las criptas de Lieberkuhn. La lámina propia está aumentada de tamaño con infiltración de células mononucleares en la capa profunda y en las vellosidades; pudiendo observarse focos de neutrófilos y cariorrexis de algunas células.

La submucosa está congestionada y edematosa con hemorragias y en algunos casos en la capa muscular y serosa se observa congestión y en ocasiones hemorragias (1, 2, 5, 39, 41, 43, 45).

En las placas de Peyer o acúmulos linfoides localizados en la pared intestinal se observa depresión, congestión y necrosis (5, 39, 41, 44).

Los ganglios linfáticos mesentéricos están inflamados (hi-

perplásicos) congestionados, hemorrágicos y necróticos en la corteza e incluso edematosos; ocasionalmente se observa infiltración linfocitaria (41).

El timo presenta necrosis y atrofia cortical e incluso hemorragias (5, 39, 41, 44, 45).

La médula ósea muestra depresión y hemorragias ocasionales. El pulmón tiene inflamación intersticial, hemorragias, edema y una marcada congestión (5, 41, 44, 45).

El hígado se encuentra inflamado con congestión, se observan hemorragias ocasionales e incluso edema intersticial (7, 16, 41). El corazón presenta miocarditis intersticial no supurativa con infiltración linfocitaria, células plasmáticas, histiocitos neutrófilos y algunos eosinófilos en miocardio, pero lo más característico es la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares, basófilos en fibras musculares y también zonas de necrosis, hemorragias y cambios degenerativos en fibras musculares cardíacas (2, 5, 38, 41, 42, 44, 45).

2) EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIROSIS CANINA.

El diagnóstico clínico se determina en base a la historia clínica y a los signos de la enfermedad.

Se debe tener cuidado en el enfoque para elaborar el diagnóstico, ya que puede confundirse con otras enfermedades que producen signos semejantes, por lo tanto, aunque se tenga evidencia clínica, se debe respaldar por un diagnóstico de laboratorio e identificación del virus para obtener un diagnóstico confirmativo. La correcta anamnesis y observación clínica del paciente deben considerar en conjunto los siguientes datos:

Edad de los canideos.- Los animales afectados pueden ser de cualquier edad, siendo la enfermedad más frecuente en cachorros menores de seis meses y perros viejos (27, 45, 46, 47).

El curso.- Es sobre agudo y agudo, ya que la muerte ocurre entre veinticuatro y setenta y dos horas después de iniciados los signos, presentando un cuadro clínico digestivo y cardiaco, o bien muertos repentinamente por problemas cardíacos (1, 2, 3, 5, 39, 41, 44, 45).

La morbilidad se considera entre 90-100% y letalidad es de 80-90% (41, 46).

Los signos clínicos.- Los más característicos son: Hipertermia, 39.5 a 41 °C, depresión, anorexia, emesis, diarrea color amarillo-grisáceo hasta hemorrágica, deshidratación severa e incluso la muerte repentina por paro cardíaco, signos que nos darán la pauta para sospechar de esta enfermedad (1, 2, 5, 7, 16, 41, 42, 43, 44, 45, 47).

Lesiones.- Tomar en cuenta todos los cambios macroscópicos y microscópicos más evidentes.

Anamnesis.- Datos que se obtienen del dueño del animal, que nos son útiles para integrar el diagnóstico y que son los siguientes:

- Revisar esquemas de vacunaciones, edad a la que se inmunizó tipo de vacuna utilizada y vía de administración.
- Edad del paciente.
- Tipo de alimentación, cambios de dieta, etc.
- Preguntar si sale a la calle o no, o bien si ha asistido

a alguna exposición, cuándo y dónde.

- Desde cuándo comenzó el padecimiento y qué cambios han observado en el paciente, si hay vómito, de qué color y frecuencia; si hay diarrea, qué color y olor tiene, qué frecuencia; si existe depresión, anorexia, deshidratación, - si ha cambiado el apetito, si bebe agua o no, si la retiene.
- Revisar las constantes fisiológicas, frecuencia cardiaca y respiratoria, pulso, temperatura e inspección general - del paciente (48, 49).

El diagnóstico diferencial es de suma importancia, ya que existen gran cantidad de agentes infecciosos, así como causas no infecciosas que producen signos clínicos similares a los de la parvovirus, tanto en forma digestiva como en forma cardiaca (41, 44, 45, 47).

FORMA ENTERICA.

- Agentes Virales:

- a) Coronavirus.
- b) Rotavirus.
- c) Calicivirus (picornavirus).
- d) Adenovirus tipo II.
- e) Virus del moquillo canino.
- f) Virus de la hepatitis canina.

- Agentes Bacterianos:

- a) Campylobacter sp.
- b) Salmonella sp.
- c) Pseudomonas sp.
- e) E. coli.

e) Clostridium: (welchii, novy y perfringens).

- Agentes Parasitarios:

a) Ancylostoma caninum.

b) Toxocara canis.

c) Dipilidium caninum.

d) Coccidias.

- Intoxicaciones:

a) Warfarina.

b) Plomo.

c) Arsénico.

- Neoplasias Intestinales:

a) Linfossarcoma.

b) Adenocarcinoma.

c) Fibrosarcoma.

- Otras Causas:

a) Pancreatitis aguda.

b) Obstrucciones por objetos traumáticos (pelotas, huesos, astillas.

c) Torsión intestinal.

d) Diarreas mecánicas por cambios bruscos de dietas.

e) Colitis.

f) Gastroenteritis hemorrágica inespecífica.

g) Púrpura trombocitopénica ideopática.

h) Fallas agudas renales o hepáticas.

FORMA CARDIACA.

- a) Electrocu^sión.
- b) Anomalías congénitas.
- c) Herpes virus.
- d) Moquillo canino.
- e) Insuficiencias cardiacas.

3) DIAGNOSTICO DE CONFIRMACION DE PARVOVIROSIS CANINA.

Identificación del agente etiológico: Se recogen muestras fecales frescas y se procesan por centrifugación y filtración; se observan las partículas virales por medio del microscopio electrónico. También se pueden observar las partículas virales del contenido intestinal por medio del microscopio electrónico, e incluso muestras de corazón (50).

Reproducción de la enfermedad: Se ha demostrado que el cuadro clínico puede reproducirse experimentalmente al inocular perros sanos por vía oronasal, nasal, intramuscular, intravenosa y subcutánea, con sobrenadantes de macerados de células de intestino que se sospecha infectado o bien con sobrenadantes de heces de perros sospechosos. Si el resultado es positivo el animal sano presentará los signos clínicos característicos de la enfermedad en un período que sea igual al período de incubación (51).

Aislamiento en cultivos celulares: El diagnóstico definitivo de la parvovirus se puede lograr mediante el aislamiento del virus, utilizando para ello varias líneas celulares e incluso cultivos primarios de células de diferentes tejidos entre los que se encuentran células de riñón de perro, células de pulmón de gato y células de pulmón de visón. El virus se puede aislar a partir de heces de perro infectado,

durante la fase crítica de la enfermedad, el título de virus de heces llega hasta 10^9 dosis infectantes del cultivo celular 50% por gramo de materia fecal (32).

El aislamiento de parvovirus a partir de heces ha sido descrito por numerosos autores. De igual forma el aislamiento a partir del miocardio (51).

Este método de diagnóstico es sin duda el más preciso, pero resulta costoso y delicado, por lo que no se emplea rutinariamente.

DIAGNOSTICO POR PRUEBAS SEROLOGICAS.

Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación: Como ya se ha mencionado, el parvovirus canino es capaz de aglutinar glóbulos rojos de porcino, de manera que para determinar la presencia de parvovirus en heces, se centrifugan suspensiones de materia fecal y con el sobrenadante se hacen diluciones: a cada dilución se añaden eritrocitos de porcino. Con este procedimiento es posible establecer el título hemoaglutinante del virus de la muestra. Posteriormente se intenta inhibir tal reacción repitiendo la prueba, pero añadiendo suero antiparvovirus canino. Los resultados positivos a la Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) indican la presencia de parvovirus en las heces examinadas. Esta prueba es de utilidad durante la fase activa de eliminación del parvovirus en heces, lo que ocurre durante dos semanas siguientes a la infección (11).

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación puede emplearse también para identificar la presencia de anticuerpos en el suero de perros, utilizando un parvovirus conocido y glóbulos rojos de porcino. El título del suero será la mayor dilución del mismo capaz de inhibir la aglutinación de los eritrocitos de porcino por parte del parvovirus.

La inhibición de la HA se considera específica para parvovirus canino, ya sea para el diagnóstico de la presencia del virus o para declarar un suero positivo con anticuerpos contra la enfermedad. En el caso de tener sueros de referencia para detectar antígeno viral, la prueba es también sumamente específica y sensible (11, 53, 54).

Prueba de virus neutralización: Cuando los virus se mezclan con antisueros que contienen anticuerpos específicos contra antígenos de la cubierta viral, dichos virus se convierten en no infecciosos. El efecto se puede producir por solamente una molécula de anticuerpo. Esta reacción forma base para las pruebas de neutralización que se utilizan en forma habitual en virología, bien sea para identificar virus desconocidos, o bien sea para medir el nivel de anticuerpos específicos. Las pruebas de neutralización son muy específicas y sumamente sensibles (52).

Para todas las pruebas de neutralización es preciso titular primero el virus, a manera de conocer su poder infeccioso. Para ello, se puede medir la 1D50 en los animales de experimentación o en embrión de pollo o la TC1D50 en cultivos celulares. Dada una suspensión viral de poder infectante conocido, cabe medir la actividad neutralizante del suero problema mediante dos métodos. En el primero se mantiene constante la concentración del virus, y se va diluyendo el antisuero. En esta forma se puede medir directamente el título de neutralización del antisuero. La otra posibilidad consiste en mantener constante la concentración de antisuero, y diluir la suspensión de virus.

Esta técnica constituye otra medición del poder neutralizante del antisuero, que se expresa entonces como índice de neutralización (52, 53).

El índice de neutralización es la diferencia entre el número de 1D50 o de TC1D50 que puede neutralizar el suero problema y un suero negativo testigo. En general, se requiere un índice superior a 50 para que pueda considerarse positivo el suero problema. La interacción virus-anticuerpo más importante es la efectuada por los anticuerpos de las clases IgG, IgM e IgA, ya que neutralizan la efectividad de to dos los virus conocidos (52, 53).

Elisa: Son las iniciales que se utilizan para nombrar esta prueba y significan ensayo de inmunoadsorción con unión de enzimas y se trata de una prueba destinada a medir la cantidad de anticuerpos. El antígeno queda químicamente pegado a una superficie sólida, por ejemplo, el interior de un tubo de ensayo.

Después de que el suero reaccionó con el antígeno, se lavan los complejos inmunes fijados a la superficie, con el fin de eliminar anticuerpos que no formaron complejos y se añade globulina unida a la enzima. Después de un segundo lavado, la cantidad de enzimas que permanece en el tubo constituye un indicio de la cifra de anticuerpos específicos en el suero y se presta a una medición sencilla mediante técnicas químicas ordinarias (52, 53, 54).

Como ejemplo de las enzimas utilizadas en esta prueba, se cuentan la fosfatasa alcalina, la lisozima, la peroxidasa de rábano macho y la B-galactosidasa. Por su relativa sencillez, esta técnica parece prometedora y es de pensar que contribuirá grandemente a generalizar el diagnóstico inmunológico de muchas infecciones bacterianas, virales y parasitarias (52).

Pruebas de fijación del complemento: Es una de las técnicas inmunológicas de más amplia aplicación, una vez preparados y estandarizados los reactivos necesarios, esta prueba permite identificar muchas interacciones inmunes. El punto final -

de la reacción es fácil de leer y además no se depende de la sedimentación de eritrocitos como en las pruebas de hemaglutinación, además no se requiere disponer de suspensiones purificadas de antígenos, por lo que se utilizan frecuentemente para el diagnóstico de enfermedades virales (53, 54).

Pruebas de precipitación: Si se mezcla una cantidad adecuada de antígeno soluble con el anticuerpo homólogo y se incubaba a 37 grados centígrados, la mezcla se torna opaca al cabo de unos minutos, luego floclula y finalmente se forma un precipitado en el fondo del tubo al cabo de una hora aproximadamente.

Si se van mezclando cantidades crecientes de antígeno soluble con una cantidad constante de anticuerpos, los resultados que se observan dependen de las proporciones relativas de los reactivos. Si la concentración de antígeno es muy baja no se forma ningún precipitado visible. Si se aumenta la cantidad de antígenos, se precipita una cantidad creciente de complejos hasta llegar al máximo (52, 53, 54).

Pruebas de precipitación en gel: La inmunodifusión en gel se puede definir como una reacción en un medio semisólido en la que la difusión de un antígeno y su anticuerpo homólogo da como resultado la formación de líneas o bandas de precipitación visibles, en el lugar en donde se encuentran las concentraciones óptimas del antígeno y del anticuerpo.

Las técnicas de difusión en gel se pueden clasificar en difusión simple o doble. En la difusión simple un reactante, generalmente en solución líquida, difunde en una solución gelificada del reactante complementario. En la difusión doble, tanto la solución de antígeno como la de anticuerpo se separan inicialmente por una zona de gel en la que poste-

riormente ambos reactantes difunden. En este tipo de reacciones intervienen las propiedades físicas e in^{mu}noquímicas del sistema. Así tenemos que la velocidad de difusión para un antígeno o para una población de anticuerpos, dependerá de la concentración de moléculas, la temperatura, el tamaño de las moléculas, la forma de las moléculas y la viscosidad del medio (52).

Esta prueba es frecuentemente usada en el diagnóstico de enfermedades virales.

4) LA INMUNOFLUORESCENCIA COMO ALTERNATIVA EN EL DIAGNOSTICO DE CONFIRMACION.

Historia de la Inmunofluorescencia.

Antecedentes.

En el año de 1930, con el desarrollo de técnicas microscópicas para la identificación de sustancias bioquímicas por absorción ultravioleta y por reacciones de tinción química específica, se llevaron a cabo los primeros ensayos con microscopía de luz ultravioleta. En la misma década se inventa el microscopio de fase y en años posteriores las técnicas de autoradiografía amplían el horizonte de la microscopía. El desarrollo de la técnica de anticuerpos fluorescentes se debió a los avances de la inmunología y de la química, ya que proteínas séricas pudieron ser marcadas con colorantes fluorescentes por medio de uniones químicas estables (52, 55).

En 1941, Coons, Creech y Jones publican un artículo sobre algunas propiedades inmunológicas de un anticuerpo adicionado a un grupo fluorescente, demostrando que la conjugación

de inmunoglobulinas no se afecta en su especificidad.

El primer colorante empleado por Coons fue el β -anthraceno unido a anticuerpos contra pneumococo tipo III. En 1942, -- Coons emplea los primeros conjugados con fluoresceína para detectar antígeno pneumocócico en tejidos de ratones infectados.

En 1950-51, se publican 5 artículos que describen con detalle los adelantos en la síntesis de isocianato y su conjugación con anticuerpos específicos. En esta misma década Marshall publica resultados de observaciones de antígenos en tejidos por la técnica de anticuerpos fluorescentes (52, 56)

En 1957, cuando aparecen 4 informes sobre pruebas indirectas para detectar anticuerpos específicos con sueros conjugados, el potencial diagnóstico de la técnica se incrementa.

El uso de Rhodamina y sus resultados positivos aparecen en 1958, así como la aplicación con otro compuesto llamado -- DANS.

En 1955 Leitz y Reichert empiezan a producir microscopios de luz ultravioleta en forma comercial. Durante este mismo año aparecen en el mercado americano colorantes y conjugados comerciales (59).

Técnicas y Aplicaciones:

La técnica de anticuerpos fluorescentes se utiliza en muchos laboratorios para determinar la presencia de partículas virales en tejidos de animales, o bien para establecer si existen anticuerpos específicos en el suero de un animal sospechoso (36).

En este último caso, se baña una laminilla preparada con tejido infectado con suero problema; después de incubar y lavar la preparación, se tiñe con anticuerpos fluorescentes - específicos contra inmunoglobulina de perro. La persistencia del conjugado fluorescente en la preparación indica la presencia de anticuerpos específicos contra parvovirus en el examinado.

Dado que existe una enorme relación antigénica entre parvovirus canino y el virus de la panleucopenia felina, se puede utilizar indistintamente conjugado preparado con uno u otro virus, con los mismos resultados. Se pueden identificar incluso anticuerpos IgG, IgM, utilizando conjugados específicos contra cada una de ellas (32).

De esta misma manera se pueden hacer conjugados con anticuerpos específicos contra distintas enfermedades, logrando marcar las partículas virales con los anticuerpos fluorescentes, dándonos un diagnóstico rápido y seguro, siempre y cuando los anticuerpos no marquen por inmunidad cruzada a otro microorganismos.

Preparación del conjugado:

Para la preparación de un conjugado fluorescente se requiere una cantidad conveniente de suero hiperinmune contra la enfermedad que se quiere diagnosticar, se mide un volumen conveniente de este suero y se pone en un vaso de precipitación pequeño. Se coloca el vaso en un agitador magnético - en refrigeración o rodeado de hielo con el propósito de mantenerlo a 4° C. Posteriormente se agrega el mismo volumen de solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, al suero que se está agitando durante un período aproximado de dos minutos. Se mantendrá en agitación constante durante una hora aproximadamente manteniendo siempre el hielo o la

misma temperatura de 4° C.

Después se saca la mezcla y se centrifuga a 3500 rpm durante 15 minutos manteniendo a 4° C la temperatura para recuperar el precipitado, posteriormente se descarta el sobrenadante y se disuelve el precipitado con agua destilada en la mitad de volumen descartado.

El siguiente paso es precipitar nuevamente con el volumen calculado de solución saturada de sulfato

Una vez realizado esto, se colecta el precipitado centrifugado nuevamente en las condiciones anteriores y se descarta el sobrenadante y se resuspende el precipitado en un volumen de agua destilada igual a la mitad de 1 volumen original del suero.

Esta solución de globulinas se coloca en una membrana de diálisis a la que se le ata una barra magnética. La membrana se pone a dializar en un litro de solución salina fría sobre el agitador magnético en el refrigerador. Hay que cambiar la solución salina cada cuatro horas, o hasta comprobar que la diálisis ha terminado. La diálisis se ha completado cuando mezclando en un tubo de ensayo partes iguales de solución salina de diálisis y solución saturada de cloruro de bario, no se forma el precipitado blanco que forma el cloruro de bario.

El fraccionamiento del suero puede hacerse con DEAE celulosa, o bien proceder a conjugar las globulinas y después fraccionar los anticuerpos fluorescentes en la misma columna.

Una vez realizado esto, se procede a determinar la concentración de proteína total. Para esto se puede emplear el método de Biuret o leer por medio del espectrofotómetro de luz ultravioleta. Una vez obtenidas las cantidades de globulinas por ml. de mezcla o globulinas totales se procede a calcular la cantidad de isotiocianato de fluoresceína requeridos para una conjugación óptima según la relación mg de proteína o globulina total / 60=mg de ITCF necesarios para conjugar las globulinas.

Una vez obtenidas las constantes se diluyen las globulinas con solución salina hasta obtener una concentración final de proteínas del 2 al 3%, ajustar el pH de las globulinas a 9.0 - 9.5 con bicarbonato de sodio. Se ponen las globulinas en un vaso de precipitados sobre un agitador magnético en el refrigerador o rodeado de hielo y se agrega la fluoresceína en pequeñas cantidades a medida que se disuelve en un período de tres o cuatro horas. Se deja agitar de un día para otro. (10 a 20 horas)

Se ponen estas globulinas conjugadas en una membrana de diálisis y se ata a esta una barra magnética. Se dializa contra SSF para eliminar el exceso de fluoresceína no conjugada. Este proceso puede ser cambiado por filtración por Sephadex. Para eliminar la fluoresceína se requiere de 5 a 7 cambios de SSF en un período de 3 a 4 días. Se dializa hasta que la SSF se mantenga clara (sin fluoresceína). Se agrega una porción de DOWEX 2-X4 a la solución salina, ya que éste absorberá la fluoresceína y acelerará la diálisis.

Así el conjugado está listo para su titulación y posterior evaluación (56).

Métodos de la Tinción Fluorescente:

Método Directo.

Esta es la más simple de las reacciones, unas cuantas gotas del conjugado diluido apropiadamente se aplican sobre el antígeno adherido generalmente a un portaobjetos. Estos son incubados en una cámara húmeda por un período variable, generalmente de 10 minutos a 1 hora.

Las temperaturas de incubación se han llevado a cabo en una variación de 5 a 45° C, pero la mayoría se realizan a temperatura ambiente (25° C). La temperatura de estufa incubadora también proporciona buenos resultados (37° C).

Las cámaras húmedas evitan que la muestra se reseque, evitando la presencia de cristales colorantes, que darían lecturas falsas.

Una vez incubada, la muestra se lava con solución amortiguadora fosfatada agitando ligeramente aproximadamente 10 minutos; finalmente se enjuagan las muestras por inmersión en agua destilada, se secan y se montan. Los anticuerpos específicos depositados sobre los sitios de antígeno aparecerán con fluorescencia amarilla verdosa bajo la luz ultravioleta del microscopio, cuando se ha empleado alguna sal de la fluoresceína.

Ventajas de este método.- La principal es que sólo se emplea reactivo de tinción. Una vez que el conjugado ha sido titulado y evaluado, las reacciones requieren un mínimo de controles para establecer la especificidad.

Controles del método directo.- Sirven para establecer la especificidad inmunológica de la fluorescencia observada.

- 1.- Antígeno + conjugado heterólogo (misma concentración que el homólogo) = no fluorescencia.

Esto ayuda a evitar artefactos fluorescentes que podrían aparecer si las concentraciones de colorantes son diferentes en los conjugados comparados.

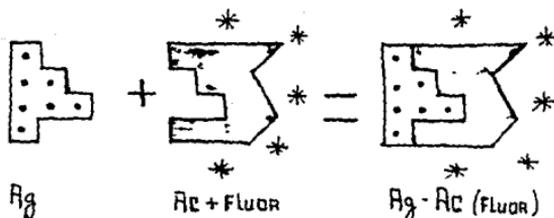
- 2.- Tejido normal + conjugado homólogo = no fluorescencia.

El conjugado fluorescente específico no debe teñir tejido normal.

- 3.- Antígeno + suero homólogo + conjugado homólogo = no fluorescencia. Es una prueba de inhibición.

- 4.- Antígeno heterólogo + conjugado específico homólogo = no fluorescencia.

Demuestra si algunos antígenos tienen afinidad por tinción no específica que puede proporcionar lecturas falsas (52, 54, 55, 57).



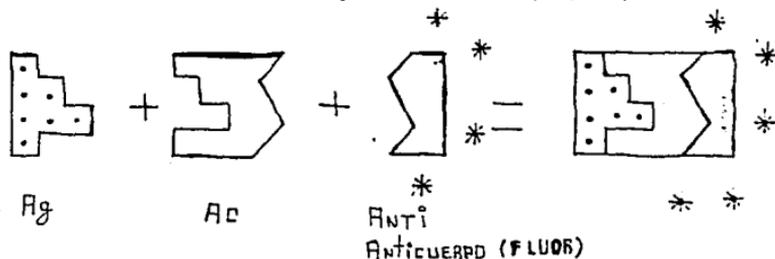
CONTOLES DEL METODO DIRECTO.

Método Indirecto.

En este método, los anticuerpos que van a reaccionar con un antígeno específico son por sí mismos antígenos que reaccionarían con un conjugado específico contra las inmunoglobulinas. Si un antisero contra globulinas de conejo que ha sido preparado en cabras se marca con fluoresceína, será capaz de reaccionar con las inmunoglobulinas de conejo, aún así éstas últimas están unidas a un antígeno. Por este mecanismo, el antígeno se detectará fluorescente aunque el primer anticuerpo no esté conjugado. El procedimiento es el siguiente: Unas cuantas gotas de antisuero específico sin conjugado son colocados sobre la muestra de antígenos e incubados por 15 a 60 minutos.

Las laminillas son lavadas, enjuagadas y secadas. En el paso 2, un conjugado que detecte las primeras globulinas es depositado y procesado como en el paso 1. La apariencia microscópica del antígeno teñido por este método es muy semejante a la observada por el método directo.

Ventajas de este método.- Una vez obtenidos los conjugados antiglobulinas (anti-inmunoglobulinas) de diferentes especies no es necesario conjugar inmunoglobulinas contra diferentes antígenos. Al mismo tiempo se aumenta la sensibilidad dado que la proporción de combinación molecular de un anticuerpo para un antígeno es casi siempre mayor de 1 y puede ser hasta 10, la capa intermedia de anticuerpos sin conjugar multiplica el número de sitios a los cuales los marcadores fluorescentes pueden unirse (52, 54).



C U A D R O A.

CONTROLES DEL METODO INDIRECTO.

ANTIGENO	REACTIVO PARA EL PASO I	REACTIVO PARA EL PASO II	RESULTADOS
	Ninguno o solución salina	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Suero normal	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Antisuero específico absorbido	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Suero heterólogo	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas heterólogo	No fluorescencia
	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia

C U A D R O A.

CONTROLES DEL METODO INDIRECTO.

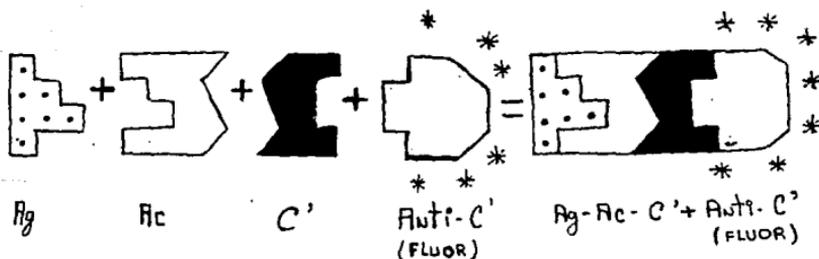
ANTIGENO	REACTIVO PARA EL PASO I	REACTIVO PARA EL PASO II	RESULTADOS
	Ninguno o solución salina	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Suero normal	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Antisuero específico absorbido	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Suero heterólogo	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia
	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas heterólogo	No fluorescencia
	Antisuero específico	Conjugado antiglobulinas	No fluorescencia

Método Anticomplemento:

Empleando el mismo principio que en el método indirecto, si una reacción antígeno anticuerpo se ha realizado y fijado - el complemento, éste puede ser detectable por tinción fluorescente con anticuerpos contra el complemento.

Ventajas del método anticomplemento: Tiene la ventaja de -- que sólo se necesita un suero conjugado anticomplemento y - sólo requiere que el sistema antígeno-anticuerpo fije el - complemento.

La sensibilidad de este método es tan alta como en el método indirecto, aunque no se ha popularizado mucho.



C U A D R O B.

CONTROLES DEL METODO ANTICOMPLEMENTO: EL NUMERO DE CONTROLES NECESARIOS ES MAYOR, DADO QUE EL NUEVO REACTIVO INTRODUCE UNA FUENTE POTENCIAL DE NO ESPECIFICIDAD (52, 54, 55, 57).

ANTIGENO	REACTIVO PARA EL PASO 1	REACTIVO PARA EL PASO 2	RESULTADOS
HOMOLOGO	Ninguno o solución salina.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Suero normal.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Antisuero específico.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Complemento activo.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Suero normal + complemento.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Antisuero específico + complemento inactivo.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia
	Antisuero específico + complemento activo.	Conjugado anti-inmunoglobulina	No fluorescencia
HETEROLOGO	Anticuerpo específico + complemento activo.	Conjugado anticomplemento	No fluorescencia

Aplicaciones de la Inmunofluorescencia.- Las principales aplicaciones de la técnica han sido ampliamente explotadas en aspectos de microbiología y patología. Frecuentemente se dirigen sobre todo a aspectos de estudios de replicación, patogénesis y diagnóstico. Ensayos sobre aplicaciones en bacteriología, micología, virología y parasitología han sido publicados. Y no solamente se considera el aspecto microbiológico, también se ha cubierto la patología, enfermedades autoinmunes, enzimología y neoplasmas.

En la actualidad se emplea mucho la inmunofluorescencia para detectar secuencias de formación de antígenos, básicamente en estudios de replicación viral.

Sin embargo, los aspectos de diagnóstico en virología han sido los más espectaculares, detectando antígeno viral en material de pacientes o identificando virus aislados de los mismos o por demostración de anticuerpos específicos contra ciertos virus.

La inmunofluorescencia es tal vez el más específico y versátil de los métodos histoquímicos que han permitido la localización de muchos materiales biológicamente importantes como en estudios sobre tumores y lesiones malignas.

Ha jugado también un importante papel en el estudio de la síntesis de anticuerpos en inmunología comparada. El uso de preparaciones proteico-fluorescentes en estudios bioquímicos in vitro han tenido relevancia en la medición exacta de concentraciones de antígenos y anticuerpos en sistemas precipitantes (51, 52, 53, 55, 56, 57).

5) LA TECNICA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES COMO RECURSO EN EL DIAGNOSTICO DE PARVOVIROSIS CANINA.

Proyección.

Siendo ésta una técnica sumamente específica y llevada a cabo su correcta evaluación por medio de los controles necesarios, ofrece proyección diagnóstica en aquellos casos en los que se requieren los resultados de una prueba de laboratorio en períodos de tiempo cortos, cuya importancia radica en proceder a un rápido tratamiento específico y tomar las medidas de manejo y erradicación necesarias como en casos que se presentan en criaderos o simplemente cuando se trata de camadas que corren peligro, ya que ofrece resultados en un tiempo muy corto, siendo esta proyección más aplicada a centros de diagnóstico especializado o laboratorios de análisis clínicos, mismos que cuentan con la infraestructura adecuada.

Limitaciones.

Una de las principales limitantes de esta técnica es el requerimiento de infraestructura adecuada que permita la elaboración del conjugado. Tomando en cuenta los requerimientos de personal especializado y el costo que esto provoca, así como el material y aparatos especializados que se necesitan para realizar las lecturas, aún cuando los costos se reducen cuando se elabora el conjugado, ya que no se tiene que importar.

Por otro lado, es limitante para clínicas veterinarias en las que aún contando con un conjugado comercial nacional de menor costo tienen la limitante de hacer las lecturas, ya que el microscopio que se requiere para realizarla es de un costo muy elevado. Solamente el clínico de pequeñas espe--

cies que tenga acceso a un microscopio ultravioleta para --
realizar las lecturas, le resultaría costeable y de gran -
utilidad.

III. OBJETIVOS DE LA TESIS.

- 1.- Demostrar que la elaboración de conjugados fluorescentes para el diagnóstico de parvovirus es fácilmente realizable y con esto, evitar la importación de los mismos, disminuyendo los costos.
- 2.- Comprobar que el conjugado fluorescente puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad, ayudando así, al clínico a elegir tratamiento adecuado y a evitar la propagación de la enfermedad.
- 3.- Demostrar que la prueba de anticuerpos fluorescentes puede ser aplicada en el diagnóstico de esta enfermedad con resultados satisfactorios, invitando al clínico y a los laboratorios de diagnóstico a emplearla, ya que es segura y rápida.

IV. MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES: SOLUCIONES Y REACTIVOS.

- A) Solución neutra saturada de sulfato de amonio: a) 78 gr. de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (grado relativo) en 100 ml. de agua destilada caliente (50-60° C), antes de usar la solución será enfriada a temperatura ambiente. b) Ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de amonio 0.1 N. (Normal). Esta solución puede mantenerse indefinidamente a temperatura ambiente en una botella tapada.
- B) Solución buffer de fosfatos PBS: a) A un litro de agua destilada agregar 8.0 gr. de cloruro de sodio (NaCl), -- 0.2 gr. de cloruro de potasio (KCl), 1.15 gr. de fosfato de sodio monobásico (NaHPO_4) , y 0.2 gr. de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) , disolver completamente con el agitador magnético y ajustar el pH a 7.2 con NaOH 0.1 N.
- C) Solución de cloruro de bario: a) Diluir 5 gr. de cloruro de bario en 100 ml. de agua destilada.
- D) Amortiguador de carbonatos pH 9.5: Se mezclan 4.2 gr. de NaHCO_3 y 0.60 gr. de NaOH en 100 ml. de agua desglilada, se ajusta el pH a 9.5.
- E) Isotiocianato de fluoresceína (ITCF). Según la metodología que se elija para conjugar, se emplean los cristales de ITCF o la solución siguiente: Pequeñas cantidades de ITCF se disuelven en amortiguador de carbonato pH 9.5 - hasta una concentración final de 1.0 mg. de ITCF/ml. Esta solución puede ser guardada en frasco obscuro a 4° C durante varias semanas (56).

EQUIPO:

- a) Agitador magnético.
- b) Balanza de precisión.
- c) Canicas.
- d) Celdas de cuarzo para UV.
- e) Centrífuga refrigerada.
- f) Congelador.
- g) Crióstato.
- h) Espectrofotómetro de UV - Visible.
- i) Hilo de cáñamo.
- j) Liofilizadora.
- k) Material de vidrio.
- l) Membrana para diálisis.
- m) Microscopio de luz ultravioleta.
- n) Potenciómetro.
- ñ) Refrigerador.

METODOS.

Preparación del conjugado.- En primer lugar se procedió a elegir a un canideo de tres años de edad, en buen estado físico y cuyos antecedentes vacunales e historia clínica son bien conocidos.

Tenía aproximadamente un año y medio de que le fueron aplicadas las vacunas moquillo, hepatitis, leptospira, rabia y parvovirus por última vez. Por lo tanto, se procedió a inmunizarlo únicamente contra parvovirus utilizando vacunas de

virus vivo de diversos laboratorios. Se le aplicaron 4 vacunas con un intervalo de 20 días entre cada una de ellas, y un mes después de la aplicación de la última vacuna, se le extrajeron 20 ml. de sangre que se mantuvo en refrigeración durante dos horas (no se usó anticoagulante). La muestra de suero se llevó al laboratorio y se evaluó por pruebas de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación para titular el nivel de anticuerpos que la muestra contenía.

El resultado fue un título de anticuerpos vacunales de 1×1064 , siendo éste un título bastante elevado, indicándonos con esto que la inmunización dio buenos resultados y que sí se podía trabajar con este donador.

Posteriormente se procedieron a tomar muestras sanguíneas del donador; se le sangró en tres ocasiones con un lapso de 8 días entre cada sangrado, obteniendo en cada sangrado 40 ml. de sangre, mismos que se refrigeraban y se procesaban 1 hora después, obteniendo el suero hiperinmune por procesos de coagulación y centrifugación. El suero obtenido en cada sangrado se mantenía en viales estériles bajo congelación, se obtuvieron en total 37 ml. de suero hiperinmune después de los tres sangrados.

Como siguiente paso se inició el proceso de purificación de globulinas, se descongelaron los 37 ml. de suero hiperinmune lentamente en baño maría, posteriormente se preparó una solución saturada de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), con la cual se van a precipitar las globulinas.

Las globulinas de cada animal requieren de pequeñas diferencias en los porcentajes de sulfato de amonio en solución saturada para la precipitación de las mismas y obtener óptimos resultados. Los sueros de conejo y borrego, por ejemplo, son precipitados en tres ocasiones con un 50, 40 y finalmen

te 35% de sulfato de amonio, mientras que los sueros de caballo requieren de tres precipitaciones con sulfato de amonio, pero con concentraciones de 45, 35 y finalmente 30% -- (56).

En este caso para las globulinas de perro usamos los porcentajes 50, 40 y finalmente 30% de sulfato de amonio para la precipitación.

Como todas las globulinas tienen puntos isoeléctricos de aproximadamente 6.8 el primer paso para la precipitación fue medir el pH de las globulinas, ya que muchos de los sueros -- tienden a elevar el pH a 8.0 o más dependiendo del manejo que se le da a la sangre. El pH de nuestro suero hiperinmune fue de 6.84 y se consideró en óptimas condiciones. En caso de que no estuvieran en óptimo estado sería necesario calibrar el pH con soluciones de Hidróxido de sodio 2: N o Acido Clorhídrico 1: N, hasta alcanzar el 6.8. El suero descongelado se mantuvo en un matraz apropiado rodeado de hielo en agitación constante, evitando producir espuma. La primera precipitación se llevó a cabo con un volumen calculado de sulfato de amonio que representó una solución al 50%, éste se mantuvo a temperatura ambiente y para lograr una mezcla homogénea, el sulfato de amonio se fue adicionando poco a poco al suero que se estaba agitando, aproximadamente 1 gota por segundo, y esta solución se mezcló durante 2 horas en el baño frío a 4° C.

Para calcular el volumen a usar de la solución saturada de sulfato de amonio para precipitar, se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sulfato de amonio deseado} / 100 (\text{volumen de suero} + 1) = 1 X.$$

Donde X es igual a la cantidad de ml. de solución saturada de sulfato de amonio que se le adicionará al volumen de suero dependiendo de la concentración que se necesita.

Por ejemplo, para preparar una solución al 50% de sulfato de amonio y precipitar 37 ml. de globulinas despejando la fórmula se expresa de la siguiente manera:

$$\begin{aligned} \text{ml. de solución saturada} \\ \text{requeridos} &= \frac{(\% 50/100) (37 \text{ ml.})}{1 - (\% 50/100)} \\ &= \frac{.5 (37)}{1 - (50/100)} = \frac{18.5}{1-.5} = \frac{18.5}{0.5} = 37 \text{ ml} \end{aligned}$$

37 ml. de solución saturada de sulfato de amonio.

De la misma forma se realizan las operaciones requeridas para obtener los ml. necesarios para preparar al 40 y 30% con el sulfato de amonio.

Una vez terminada la precipitación se procedió a centrifugar a 3000 rpm durante 15 minutos, se le descartó el sobrenadante y el sedimento se solubilizó con 37 ml. de agua destilada, se colocó en el interior de una membrana de diálisis y esta se introdujo en un garrafón que contenía 18 litros de solución buffer de fosfatos pH 7.2 a 4° C durante toda la noche manteniendo agitación constante con un agitador magnético. Se mantuvo dializando 21 horas y posteriormente se tomó una muestra de 1 ml. de la solución buffer del garrafón y se le añadió 1 ml. de solución saturada de sulfato de bario, notando que si se mantiene transparente significa que el exceso de sulfato de amonio fue eliminado

de las globulinas mediante la diálisis y si se pone turbio blanquecino significa que aún tiene sulfato de amonio unido a las globulinas y que requiere más tiempo de diálisis. En este caso se observó transparencia en la reacción, por lo tanto, se procedió a sacar las globulinas de membrana y a precipitar nuevamente, pero esta vez con un porcentaje de 40% de sulfato de amonio en solución saturada (56).

Al realizar la diálisis existe un intercambio de líquidos - a través de la membrana, por lo tanto los 37 ml. que se pusieron originalmente dentro de la membrana se incrementaron en 74 ml., por lo cual se toman los 74 ml. como el total para calcular la cantidad de sulfato de amonio a usar al 40% usando la fórmula ya descrita.

Se le calibra el pH a 6.8 usando soluciones de HCL 1:N o de NaOH 2: N necesarias, se colocan las globulinas en una matraz y se mantiene la temperatura a 4° C en agitación constante sin producir espuma, se le adicionan entonces 50 ml. de solución saturada de sulfato de amonio, una gota por segundo hasta completar la precipitación, misma que tardó aproximadamente 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se les descartó el sobrenadante y el sedimento se solubilizó con 30 ml. de agua destilada. Esta nueva solución se colocó dentro de una membrana de diálisis y se dializaron contra 18 litros de solución buffer de fosfatos dentro de un garrafón a 4° C en agitación constante durante 20 horas. Nuevamente pasado este tiempo se hizo la prueba con el cloruro de bario mostrando algo de turbidez, por lo tanto, fue necesario dializar 6 horas más. Posteriormente se volvió a probar la pureza de las inmunoglobulinas con el cloruro de bario y esta vez el líquido dializable permaneció transparente, así que se procedió nuevamente a calibrar el pH a 6.8 y a depositar las globulinas dentro del matraz, rodeado de hielo y en agitación constan-

te sin producir espuma. Esta vez únicamente se incrementó el volumen a 40 ml. y en base a este volumen se hicieron los cálculos para saber la cantidad de sulfato de amonio que se usara, pero esta vez al 30%.

Por lo cual, se añadieron 17 ml. de sulfato de amonio a razón de una gota por segundo a los 40 ml. de globulinas hasta completar la precipitación misma que duró 2 horas.

Terminada la precipitación se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos, se le descartó el sobrenadante y las globulinas se solubilizaron con 27 ml. de agua destilada, se colocaron dentro de la membrana y se dializaron contra 18 litros de solución buffer de fosfatos pH 7.2 a 4° C en agitación constante. Esta vez fue necesario dializar durante 72 horas cambiando la solución dializadora buffer de fosfatos pH 7.2 cada 12 horas, ya que la prueba de cloruro de bario indicaba turbidez.

Completa la diálisis, se sacaron las globulinas que representaron un volumen de 34 ml. y se colocaron en un matraz pequeño, se les midió el pH que fue de 6.79, por lo que no fue necesario calibrarlo a 6.8. Se tomó una muestra de globulina de 0.1 ml. y se diluyó con 0.9 ml. de agua destilada (1:10), ajustar el espectrofotómetro de luz ultravioleta a 280 nm. el tubo blanco a 0 y ajustar en absorbancia ultravioleta (UV). Se puso la muestra de proteínas diluidas 1:10 en el tubo del espectrofotómetro y se midió. El resultado fue .563.

Posteriormente se ajustó el espectrofotómetro a 495 nm, el tubo blanco a 0 y ajustar en absorbancia luz visible. Se colocó la misma muestra en el tubo del espectrofotómetro y se midió. El resultado fue .568.

Con estos datos se obtendrá por medio de una fórmula la cantidad de globulinas en mg. que se tienen en cada mililitro de muestra y se expresa de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia UV} \times .35 \text{ (absorbancia luz visible)}}{1.4} = \frac{\text{mg. proteína X}}{\text{ml. de muestra X 10}}$$

NOTA: El resultado se multiplica por 10, ya que se diluyó la muestra 1:10.

Sustituyendo los valores tenemos:

$$\frac{(.563) \times .35 (.568)}{1.4} = \frac{.54313}{1.4} = \frac{.387 (10)}{1.4} \quad R = 3.87 \text{ mg/ml}$$

Ahora para saber el total de proteína en miligramos que se tiene en los 34 ml. de muestra, únicamente se multiplica:

$$3.8 \text{ mg/ml} \times 34 \text{ ml} = 129.2 \text{ mg. de proteína en los 34 ml. de la muestra.}$$

Con este resultado se calculará la cantidad de isotiocianato de fluoresceína necesaria para teñir 129.2 mg. de proteína usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{mg. de isotiocianato}}{\text{de fluoresceína (ITF)}} = \frac{\text{mg de globulina}}{60}$$

sustituyendo:

$$\frac{\text{mg. de isotiocianato}}{\text{de fluorescencia}} = \frac{129.2}{60} = R = \frac{2.15 \text{ mg. de ITF.}}{1}$$

Con este resultado disolvimos 2.15 mg. de isotiocianato de fluoresceína en un litro de solución buffer de fosfato pH 9.0.

Los 34 ml. de muestra se ponen dentro de una membrana de -- diálisis y se colocan dentro de la solución buffer teñida - con los 2.15 mg. de ITF y se mantuvo a 4° C sin agitar durante 5 días.

Después de este período las globulinas ya están teñidas -- con ITF y lo único que falta es eliminar el exceso de ITF - que queda adherido a las globulinas. Esto se hizo de la siguiente manera, se sacaron las membranas en cuyo interior - se encontraban las proteínas teñidas y se pusieron a dializar contra 18 litros de solución buffer de fosfatos pH 7.2 en agitación constante a 4° C.

Se mantuvo en diálisis hasta ver que la solución buffer no se teñía de amarillo característico del ITF, cambiando garrafones de solución dializadora de buffer de fosfatos pH - 7.2 cada 12 horas. Se requirieron 8 cambios de garrafón pa ra eliminar el exceso de ITF (96 horas).

Una vez eliminado el exceso de ITF se sacaron las globulinas de la membrana de diálisis y se envasaron en viales color ámbar estériles dentro de la campana bacteriológica, ya envasados se procedió a liofilizar. Se guardaron los viales con las globulinas ya liofilizadas en refrigeración constante a 4° C hasta volver a rehidratar para las pruebas de claridad y especificidad necesarias dentro del campo ultravioleta del microscopio.

EVALUACION DEL CONJUGADO.

Se tomaron muestras de animales sospechosos, clínicamente -

enfermo que presentaron toda la sintomatología propia de una infección por parvovirus.

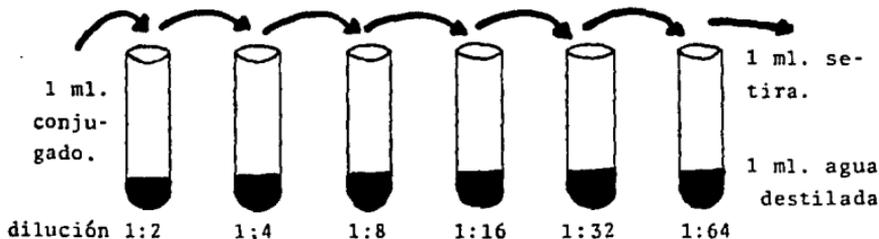
De algunos animales vivos se obtuvieron muestras de heces sanguinolentas, con las cuales se elaboraron frotis e impresas.

De otros animales muertos se obtuvieron muestras de órganos como intestino delgado, hígado, estómago, corazón, bazo y placas de Peyer, mismos que se congelaron y fueron procesados con un crióstato para luego montar los cortes de 5 micras en portaobjetos sin cubreobjetos.

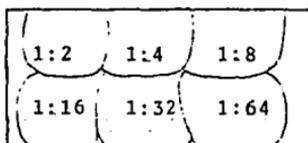
De igual manera, se obtuvieron muestras de heces de animales sanos y órganos de animales sacrificados por diversas causas excepto por padecer infecciones gastrointestinales, al igual que de los animales muertos durante cirugías o después de ellas. Todas las muestras se procesaron igualmente que las de animales sospechosos. También se realizaron frotis de vacunas concentradas contra el moquillo, hepatitis, leptospira, rabia y parvovirus.

Todas las muestras fueron fijadas en acetona absoluta a -20° C durante 24 horas.

Como siguiente paso se procedió a rehidratar el conjugado liofilizado, se tomó 1 ml. de éste y se procedió por el método de diluciones dobles con agua destilada.



Se tomaron 8 laminillas de muestras clínicamente positivas y se dividieron en seis partes con un plumón graso, y se tiñó en cada uno de los seis espacios con una dilución diferente de las antes realizadas quedando de la manera siguiente:



Se aplicó una gota de cada dilución en cada espacio y se incubó en una cámara húmeda a 37° C durante 30 minutos, después se eliminó el exceso de conjugado enjuagando las laminillas por simple inmersión en agua destilada y secando al aire libre.

Se colocaron en un portalaminillas y se cubrieron de la luz con un forro de papel estaño. Posteriormente se observaron al microscopio (fotomicroscopio III para luz ultravioleta - de luz transmitida marca Carl Zeiss) con un objetivo Plan-Neofular 16/0,50 Inmersión, combinación de filtros: (58)

COLOR DE EXCITADOR	FILTRO EXCITADOR	DIVISOR CROMATICO	FILTRO SUPRESOR
Ultravioleta	G-365	Ft-395	LP-420
Verde	G-546	Ft-580	LP-590
Azul-violeta	G-436	Ft-510	LP-520
Azul	B 485/20	Ft 510	BP-520-560

Aquí se eligió la mejor dilución por ser más clara y emitir la fluorescencia adecuada dentro del campo ultravioleta, -- misma que fue la dilución 1:8, por lo tanto, se tiñeron todas las muestras clínicamente negativas, clínicamente posi-

tivas, así como los frotis de vacunas, incubando de igual forma en la cámara húmeda a 37° C durante 30 minutos y posterior enjuague por inmersión en agua destilada. Se procedió a la observación y los resultados se muestran en las siguientes tablas.

V. RESULTADOS.

Siguiendo la técnica experimental utilizada en la sección de epizootiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) para la elaboración de conjugados fluorescentes y metodología basada en técnicas convencionales, se logró producir un conjugado cuyas características son evaluadas en este trabajo y los resultados alentadores nos marcan la pauta para elaborar conjugados -- que servirán en la facilitación del diagnóstico de muchas enfermedades presentes en nuestro país.

Para la evaluación del conjugado fue necesario contar con antígenos conocidos y purificados, mismos que fueron obtenidos a partir de vacunas comerciales.

Asimismo, para definir la especificidad se procedió a probar el conjugado obtenido con antígenos conocidos y purificados diferentes. Los resultados se exponen en el siguiente cuadro:

CUADRO NO. 1

ANTIGENOS VACUNALES + CONJUGADO HOMOLOGO ANTIPARVOVIRUS.

TIPO DE MUESTRA	M U E S T R A S	FLUORESCENCIA
Frotis	Vacuna contra parvovirus	+ +
	Vacuna contra Moquillo	- - -
	Vacuna contra hepatitis	- - -
	Vacuna contra Leptospira	- - -
	Vacuna contra Rabiá	- - -

Una vez realizadas las pruebas de especificidad del conjugado, los resultados obtenidos en la aplicación práctica con fines diagnósticos fueron los siguientes:

Se tomaron muestras de casos positivos a parvovirus por su sintomatología, o bien por su muerte, para ser diagnosticados con el conjugado elaborado. Los resultados se exponen en el siguiente cuadro:

CUADRO NO. 2

ANGITENOS PARVOVIRUS + CONJUGADO HOMOLOGO ANTIPARVOVIRUS.

TIPO DE MUESTRA	MUESTRAS	FLUORESCENCIA
Frotis	Heces	+ + + +
Improntas	Heces	+ + + +
Cortes Histológicos	Intestino Delgado	+ + +
	Estómago	+
	Placas de Peyer	+ +
	Corazón	- - -
	Hígado	- - -
	Bazo	- - -

Por otro lado, utilizando el mismo conjugado, se tomaron -- muestras de casos negativos a parvovirus por su sintomatología para ser comparados con los resultados anteriores. Los resultados se exponen en el siguiente cuadro:

CUADRO NO. 3

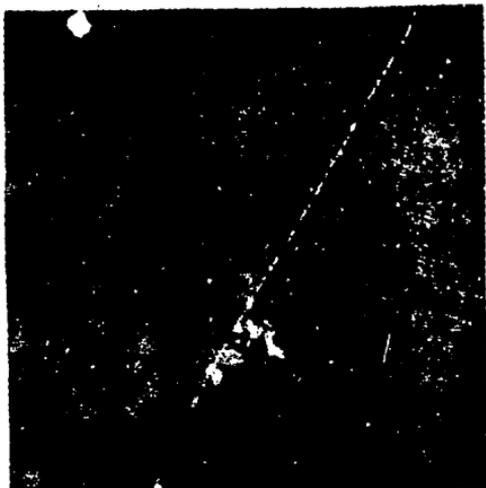
MUESTRAS NEGATIVAS + CONJUGADO HOMOLOGO ANTIPARVOVIRUS.

TIPO DE MUESTRA	MUESTRAS	FLUORESCENCIA
Frotis	Heces	- - -
Improntas	Heces	- - -
Cortes histológicos	Intestino Delgado	- - -
	Estómago	- - -
	Placas de Peyer	- - -
	Corazón	- - -
	Hígado	- - -
	Bazo	- - -

CUADRO NO. 4

CONTROL DE ADHERENCIA AL VIDRIO.

TIPO DE MUESTRA	MUESTRA	FLUORESCENCIA
Se colocan 2 gotas - del conjugado sobre un portaobjetos limpio, se incuba a 37° C durante 30 minutos. Posteriormente se lava por inmersión en agua destilada. Se carla al aire.	Conjugado	
	Fluorescente	- - -
	Antiparvovirus.	



Frotis de Heces de Perro. Parvovirus teñidos con Isotiocianato de fluoresceína (ITF). prueba de los anticuerpos -- fluorescentes positiva.

Fotog. realizada con un foto microscopio III y condensador de luz transmitida, fluorescencia III RS, Carl Zeiss.

En película Ektar-Asa-1000.

Excitación por luz ultravioleta + filtro ocular rojo.

Combinación de filtros UV-G365 Ft-.395, LP-420.

Objetivo plan neofular 16/0.50 inmersión.

Preparación y fotografía por P.M.V.Z. Mario Alberto Trujillo Oropeza, Unidad de Posgrado, Campo 1, F.E.S. Cuautitlán, UNAM, México.

Impronta de heces de perro - parvovirus teñidos con Isotiocianato de fluoresceína - (ITF) prueba de anticuerpos fluorescentes positiva. Fotografía con un fotomicroscopio y condensador de luz -- transmitida, fluorescencia - III RS, Carl Zeiss.

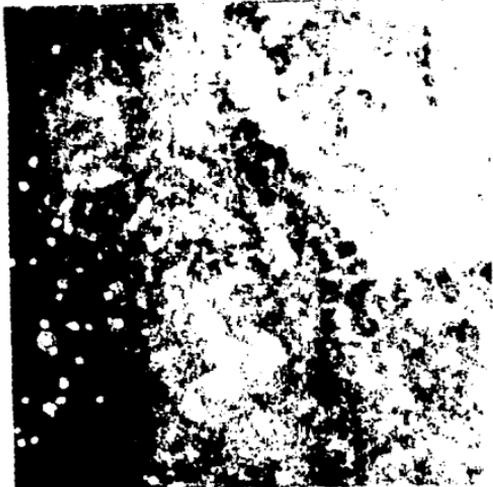
En película Ektar-Asa-1000.

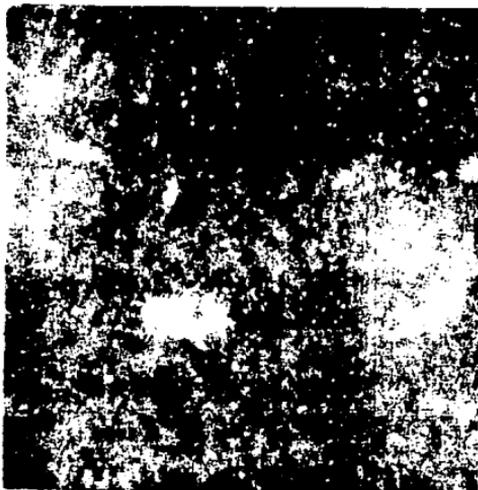
Excitación por luz azul-violeta.

Combinación de filtro G-436, Ft-510, LP-520.

Objetivo plan neofular 16/0.50 inmersión.

Preparación y fotografía por P.M.V.Z. Mario Alberto Trujillo Oropeza, Unidad de Posgrado, Campo 1, F.E.S. Cuautitlán, UNAM, México.





Corte de intestino delgado de perro, teñido, con Isotiocianato de Fluoresceína (ITF) Prueba de anticuerpos fluorescentes - positiva.

Fotografiada con fotomicroscopio III y condensador de luz transmitida, - fluorescencia III RS, -- Carl Zeiss.

En película Ektar-Asa-1000
Excitación por luz-azul -
combinación de filtros --
B 485/20, Ft-510, BP-526/
560.

Objetivo plan neofular --
16/0.50, inmersión.

Preparación y fotografía
por P.M.V.Z. Mario Alberto
Trujillo O., Unidad de Pos-
grado, Campo 1, F.E.S. --
Cuautitlán, UNAM, México.



Frotis de heces de perro
teñido con Isotiocianato
de fluoresceína (ITF) --
prueba de anticuerpos -
fluorescentes positiva.

Fotografiados con fotomi-
croscopio III y condensa-
dor de luz transmitida, -
Fluorescencia III RS. --
Carl Zeiss.

En película Ektar-Asa-1000
Excitación por luz azul-
violeta, combinación de --
filtro G-436, Ft-510, LP-
520.

Objetivo plan neofular --
16/0.05, inmersión.

Preparación y fotografía
por P.M.V.Z. Mario Alber-
to Trujillo Oropeza, Uni-
dad de Posgrado, Campo 1,
F.E.S.C., UNAM, México.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

VI. DISCUSION.

Aún cuando se trabajó con una técnica experimental y metodología convencional, la elaboración del conjugado fue realizada con gran facilidad y prometiéndole resultados satisfactorios.

Como se observa en el Cuadro no. 1 el resultado positivo obtenido de la reacción conjugado homólogo antiparvovirus + parvovirus vacunal fue debido a la especificidad de la prueba, y el resultado negativo fue debido a la no especificidad para otros antígenos y su especificidad a parvovirus.

En el Cuadro No. 2, los resultados positivos que se observan son debidos principalmente a la gran cantidad de virus que se desprenden de las células de la mucosa intestinal, que son eliminados por las heces; considerando que la replicación viral se lleva a cabo en este órgano por el tropismo que tiene el virus hacia este tejido.

En el caso del estómago, éste se ve afectado, ya que la patología de esta enfermedad comprende lesiones de gastroenteritis. El resultado negativo en las muestras de corazón, hígado y bazo es debido a que el cuadro clínico en los animales muestreados fue típicamente gastrointestinal.

Analizando los Resultados del Cuadro no. 3.

La fluorescencia negativa se debe a que los animales de los cuales se obtuvieron las muestras, no presentaron cuadro clínico característico de una infección parvoviral.

Demostrando con esto que el conjugado es específico a esta

enfermedad.

Como un dato adicional en la prueba de control de adherencia al vidrio, en la cual se pudo observar fluorescencia inespecífica, ésta se debe a "los Artefactos" que son residuos de colorante que no pueden ser eliminados a pesar de que se realicen múltiples lavados.

VII. CONCLUSIONES.

La elaboración del conjugado fluorescente es fácilmente realizable, aún sin contar con infraestructura sofisticada, ni personal especializado. Este conjugado fue fácilmente producido en los laboratorios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán e INIFAP, asesoría perfectamente aplicada por personal del laboratorio. Con esto, se reducen costos de importación de conjugados y nos alienta a producir conjugados fluorescentes para diagnosticar muchas enfermedades, disminuyendo la mortalidad por el tratamiento oportuno y aumentando con esto la producción animal.

Asimismo, se considera que la especificidad del conjugado es confiable aunque podría mejorarse realizando una separación de inmunoglobulinas por métodos convencionales.

Este conjugado tiene aplicación práctica en el diagnóstico de la enfermedad parvoviral bajo condiciones de laboratorio por ser segura y confiable.

ASIGNATURAS RELACIONADAS CON LA TESIS.

- Virología.
- Inmunología.
- Patología.
- Enfermedades Infecciosas II (Monogástricos).
- Clínica Canina.
- Zootecnia Canina y Felina.
- Laboratorio de Análisis Clínicos.

TIEMPO APROXIMADO PARA EL DESARROLLO.

- Tres a cuatro meses.

LUGARES DONDE SE DESARROLLARA LA TESIS.

- Laboratorios de la Unidad de Estudios de Posgrado y Maestría. Campo 1, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, F.E.S. Cuautitlán, U.N.A.M.
- Laboratorio de Análisis Clínicos. Campo 4, F.E.S. Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

V. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Amos, W.M.G. *Inmunología Básica*. Editorial Acribia, S. A. 1986, Págs.: 73-92.
- 2.- Appel, M.J. 1978, *Canine Viral Enteritis*. J. Am. Vet. Méd. Assoc. 1973; 1516-1518.
- 3.- Appel, M.J. 1979. *Canine Parvovirus Infection and Emerging Disease*. Laboratory Report. Series 3, Number 1. -- March 1979. Ithaca. New York.
- 4.- Appel, M.J.; Scott, F.W.; Carmichael, L.E. Isolation and Immunization Studies of a Canine Parvo Like Virus from Dogs with Haemorrhagic Enteritis. *Vet. Rec.* (1979) 105 - (8) 156-159.
- 5.- Appel, M.J.; Cooper, B.J.; Carmichael, L.C. *Canine Viral Enteritis I. Status Report on Corona and Parvovirus Like Enteritis*.
- 6.- Appel, M.J.; Meunier, P.O.; Pollok, R.; Greisen, H.J.; Carmichael, L. *Canine Viral Enteritis*. *Canine practice* (1980) (7) (4); 22-35.
- 7.- Bachmann, P.A.; Hoaggan, J.D. and Kurstak, E.; *Parvoviridae Intervirology*. 11: 248-254, 1979.
- 8.- Bachmann, P.A.; Hoggan, M.D. and Melnick, J.L.; *Parvoviridae Intervirology*. 5:83-92, 1975.

- 9.- Becton, Kickinson & Co., Canadá, LTD. Toronto 10, Onta-
rio. Products for Fluorescent Antibody Techniques. A.
Professional Service Manuel of B-D. Laboratories, Inc.
N.J.
- 10.- Binn, L.M. El Al. 1970. Recovery and characterization
of a Minute Virus of Canines. *Infect. and Immun.* 1. 503-
508.
- 11.- Binn, L.N.; Marchwicki, R.H.; Eckermann, E.H. and Fritz,
T.E.: Viral antibody studies of laboratory dogs with --
diarrheal disease. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1665-1667, --
1981.
- 12.- Black, J.W., Holscher, M.A. Powell, H.S. and Byerly, -
C.S.: Parvoviral Enteritis and Panleukopenia in Dogs. -
Vet. Me./Small Anim. clinician. 74: 47-50, 1979.
- 13.- Canting, L.F. 1980. History of Parvovirus in the Dogs.
Dogs World. October. 1980: 13-14.
- 14.- Carman, S. and Povey, C.: Successtul experimental Cha-
llenge of Dogs with canine parvovirus. 2. *Can. J. Comp.
Med.* 46: 33-38. 1982.
- 15.- Carmichael, L.E. and Binn, L.N.: New enteritic viruses
in the Dog. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 25: 1-37, 1981.
- 16.- Carmichael, L.E., Joubert, J.C. and Pollock, R.V. : A -
modified Live Canine parvovirus strain with novel pla-
que Characteristics. I Viral attenuation and dog res-
ponse. *Cornell. Vet.* 71: 408-427, 1981.

- 17.- Carmichael, L.E.; Joubert, M.C. and Pollock, R.V.H.: Hemagglutination by Canine Parvovirus: Serologic studies and Diagnostic Applications. Am. J. Vet. Res. 41: 784-791, 1980.
- 18.- Carpenter, J.L.; Roberts, R.M.; Harpester, N.K. and King, N.W.: Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a Litter of pups. J. Am. Vet. Assn. 175: 1269-1273, 1980.
- 19.- Ciprián, C.A.; Cuevas, R.S.; Colmenares, V.G.; Hernández, B.E.: Preparación de Conjugados para la Técnica de Anticuerpos Fluorescentes. Artículo en prensa, 1989.
- 20.- Coignoul, F.; Dewalg, A.: A canine hemorrhagic Enteritis Patology of a Syndrome. Ann. Med. October (1979) 123: 47-54.
- 21.- Cooper, B.J., Carmichael, L.E., Appel, M.J.; Greisen, H.: Canine Viral Enteritis. Morphologic Lesions in Naturally Occurring Parvovirus Infection. Cornell Veterinarian. (1979). (69) (3): 134-144.
- 22.- Eugster, A.K., Bendele, R.A. and Jones, L.P.: Parvovirus Infections in Dogs. J. Am. Vet. Med. Assn. 173: 1340-1341, 1978.
- 23.- Evermann, J.F.; Foreyt, W. and Maag-Miller, L.: Acute hemorrhagic Enteritis associated with Canine Coronavirus and Parvovirus infections in a captive coyote population. J. Am. Vet. Med. Assn. 177: 784-786, 1980.
- 24.- Fletcher, K.C.; Eugster, E.K.; Schidt, R.E. and Hubbard, G.B.: Parvovirus Infection in Maned Wolves. J. Am. Vet. Med. Assn. 175: 897-900, 1979.

- 25.- Flores, C.R. Parvovirus Canina y Aspectos de Inmunización. *Ciencia Veterinaria*. Vol. 4, 1987. Págs. 131 - 153.
- 26.- Flower, R.L.P.; Wilcox, G.E. and Robinson, W.F.: Antigenic differences between Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia virus. *Vet. Rec.* 107: 254-256, 1980.
- 27.- Frederic, H.D. Manual de Gastroenterología. Conferencia Anual de A.M.M.V.E.P.E. 1980.
- 28.- Fritz, T.: Canine Enteritis caused by a Parvovirus, *J. Am. Vet. Med. Assn.* 1974: 5-6-7, 1979.
- 29.- Harcourt, R.A.; Spurling, N.W. and Pick, C.R.: Parvovirus infection in a Beagle Colony. *J. Small. Anim. Pract.* 21: 293-302, 1980.
- 30.- Hayes, M.A.; Rossel, R.G. and Babiuk, L.A.: Sudden death in young dogs with myocarditis caused by Parvovirus. *J. Am. Vet. Assn.* 174: 1197-1203, 1979.
- 31.- Hitchcock, L.M. and Scarmell, J.: Canine parvovirus isolated in U.K., *Vet. Tec.* 105: 172-175, 1979.
- 32.- Horst Joachin Christorh. Clínica de las Enfermedades del Perro. Tomo I. Edición Acribia. Zaragoza, España, 1977. Págs.: 7-9, 58-59.
- 33.- Identificación del Parvovirus en México. Subsecretaría de Ganadería. Dirección General de Sanidad Animal. Subdirección de Referencias de Salud Animal. Septiembre - 1980.

- 34.- Jacobs, R.M.; Weiser, M.G.; Hall, R.L. and Kowalski, J. J.: Clinic pathologic features of Canine parvoviral Enteritis. J. Am. Anim. Health. Assn. 16: 809-814, 1980.
- 35.- Jezyk, P.F.; Haskins, M.E. and Jones, C.L.: Myocarditis of probable vital origin in pups of weaning age. J. Am. Vet. Med. Assn. 174: 1204-1207, 1979.
- 36.- Johnson, R. and Spradbrow, P.: Insolation from Dogs. - with severe Enteritis of a Parvovirus related to Feline Panleukopenia virus. Aust. Vet. J. 55: 84-92, 1975.
- 37.- Kelly, W.R. Diagnóstico Clínico Veterinario. 1976. Edición CECSA, España. Págs.: 2-47 y 171-248.
- 38.- Kramer, J.M.; Meunier, P.C. and Poolock, R.V.: Canine parvovirus. Update. Vet. Me./Small Anim. Clinicae. -- 75: 1541-1565, 1980.
- 39.- Kramer, J.J.; Miunier, P.C.; Pollok, R.U.: Canine Parvovirus. Update Veterinary. Medicine. 1980: 1541-1558.
- 40.- Lantig, L.F. 1980: Newest Canine Killer, Dog World. - September. 1980: Págs.: 13-40.
- 41.- Mann, P.C.; Bush, M. and Appel, M.J.G.: Canine Parvovirus infection in South American Canids, J. Am. Vet. -- Med. Assn. 175: 779-783, 1980.
- 42.- Mc Master, G.; Tratschiw, J.D. and Siegl, G.: Comparison of canine parvovirus with mink enteritis virus by restriction site mapping. J. Virol. 38: 368-371, 1981.
- 43.- Medina, W.F.: Gastroenteritis Hemorrágica Viral Canina. Tesis Cuautitlán Izcalli, F.E.S.C., UNAM, 1981.

- 44.- Meunier, P.C.: The pathogenesis of Canine Parvovirus - infection. Ph. D. Thesis, Cornell University. Ithaca. New York, 1983.
- 45.- Morilla. Bautista. Inmunología Veterinaria. Manual de Laboratorio. Ediciones del Patronato de Apoyo a la Investigación y Experimentación Pecuaria en México, A.C. Págs.: 85-86 y 53-75.
- 46.- O'Sullivan, G.; Durham, P.J.; Smith, J.R. and Campbell, R.S.: Experimentally induced severe canine parvoviral Enteritis. Aust. Vet. J. 61: 144, 1984.
- 47.- Padilla, J. Tópicos de pequeñas Especies. Parvovirus - Canino. Conferencia en la F.E.S. Cuautitlán, Junio, -- 1981.
- 48.- Payro, J.L., Casillas, P.: Gastroenteritis Hemorrágica por Parvovirus. Federación Canófila Mexicana, A.C. -- (80) (20) (IV). 1-5.
- 49.- Pollock, R., and Carmichael, L.E.: Canine Viral Enteriⁱtis: Recent developments. Mod. Vet. Pract. 60: 375-380, 1979.
- 50.- Pollock, R.V.: Experimental Canine Parvovirus infec^tion in Dogs. Cornell, Vet. 72: 103-119, 1982.
- 51.- Pollock, R.U.H.; Carmichael, L.E.; Appel, M.J.: Caniⁿe Viral Enteritis. Update. 72nd. Annual Conference -- for Veterinarians. Cornell, January, 1980.
- 52.- P. Stites, D.D.; Stobo, J.; Hugh, F.H.; Vivia, W.J.: - Inmunología Básica y Clínica. Edit. El Manual Moderno, 1985, 5ta. edición. Págs.: 342-347.

- 53.- Robinson, W.F. Wilcox, F.E. and Flower, R.L.P.: Canine Parvoviral Disease: Experimental reproduction of the - Enteritic Form with a Parvovirus isolated from a case of Myocarditis. Vet. Pathol. 17: 589-599, 1980.
- 54.- Scott, F.: Viricidal Desinfectants and the Feline virus. Am. U. Vet. Res. 41: 410-414, 1980.
- 55.- 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. Año VI. Junio 1981: 13-14.
- 56.- Thompson, G.W.; Gagnon, A.N. Canine Gastroenteritis -- Associated with Parvovirus line Agent. (Correspondence) Can. Vet. Jour. 1978. (19) (12). 346.
- 57.- Tizard, I.R. Inmunología Veterinaria. Edit. Interamericana. México, 1979, 1ra. edición. Págs.: 119-154.
- 58.- Zeiss Carl, D.- 7082. Oberkochen, West Germany. Zeiss Information, Brochures, numero 41-350-S, 41-173-e. -- Printed in West Germany.