



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE TÍTULOS DE
ANTICUERPOS IgG PROTECTORES CONTRA PARVOVIRUS
CANINO TIPO 2 EN UNA POBLACIÓN DE PERROS DE LA ZONA
CONURBADA DE TOLUCA”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

KENIA NAYELI ESCOBAR PINEDA

ASESORES:

Dr. JOSE SIMON MARTINEZ CASTAÑEDA
M en C. LEMUEL LEON LARA

REVISORES:

Dra. Claudia Giovana Peñuelas Rivas
Dr. Israel Alejandro Quijano Hernández

Toluca, México, Agosto de 2016



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el lugar brindado para permitirme realizar el más grande de mis sueños

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por la formación y educación, pero sobre todo porque durante cinco años fue mi hogar.

Al Centro de Investigación Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), por prestarme las instalaciones para realizar este proyecto.

A la directora del Centro de Bienestar Animal María Elena Chiquillo Barrios, por su colaboración para la realización de este estudio.

Al mayor Jorge Martínez, por su colaboración en la información y muestreo necesarios para este estudio.

Al Dr. José Simón Martínez Castañeda por su confianza y por brindarme ese apoyo incondicional que me permitió lograr este sueño que sin duda alguna habría sido muy difícil de lograr sin usted.

Al M. en C. Lemuel León Lara por sus comentarios durante el desarrollo del trabajo.

A mis compañeras de laboratorio Mirna, Dulce, Gaby, Ariadna y Nataly, por ayudarme y guiarme cuando estaba iniciando con el proyecto; su tiempo y palabras fueron muy valiosos.

A mis amigos Fernando Martínez y Luis Castro, gracias infinitas por ser parte de mi vida, ayudarme en todo, por esos momentos de risas y pláticas eternas que me han ayudado a ser mejor persona.

A Luis, Emmanuel y Rosy, gracias por ser uno de los pilares más grandes de mi vida, les amo, mi vida no podría ser lo mismo sin ustedes.

A todas las personas que me ayudaron con el muestreo, agradezco su tiempo y esfuerzo.

DEDICATORIA

A mi madre Guadalupe Pineda Silva, gracias por ser esa mujer tan guerrera, única y maravillosa. Deseo que este momento te llene de orgullo y felicidad, espero que la vida me permita disfrutar de cada segundo de este camino que recorreremos juntas. Gracias infinitas mi Lupita, te amo.

A mi hermanos Edgar y Carlos, los amo con toda el alma; Charo, gracias por eso momentos de locura y risa que le das a mi vida, Edd tu eres ese recuerdo que me quedó de lo que un día tuvimos y aunque no estés a mi lado ten la seguridad que siempre te llevo en mi corazón, estoy muy orgullosa de los hombres maravillosos en los cuales se han convertido.

A mi Match, mi Martínez y mi persona favorita en todo el mundo, Simón jamás me cansare de agradecerle a la vida el que hayas aparecido en mi camino, por compartir conmigo este mundo tan loco y único en el que tú vives, vida mía gracias por formar parte de mis días, este momento tan esperado y soñado por mí te lo dedico con todo el corazón, es tuyo también. Te amo.

RESUMEN

El parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) ha sido considerado como uno de los patógenos de mayor importancia clínica en los perros desde que emergió en 1978. El PVC-2 es el agente causal de enteritis hemorrágicas agudas y de miocarditis en perros, con una morbilidad el 100% y una mortalidad del 10% en perros adultos y del 91% en cachorros. Algunos reportes indican que tanto la prevención como la severidad de la enfermedad están relacionadas con la tasa de títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 en perros.

La presencia de anticuerpos contra PVC-2 en perros indica una vacunación previa, una exposición con virus de campo o en el caso de cachorros la presencia de anticuerpos derivados materno (ADM) y estos generalmente están relacionados con una protección confiable contra la enfermedad.

En este estudio fue analizada la frecuencia de anticuerpos IgG contra PVC-2 en perros de la zona conurbada de Toluca, utilizando la técnica de Inhibición de la hemoaglutinación.

Doscientos veintidós sueros de perros provenientes de calle, criaderos y casas fueron procesados mediante HI, mostrando que solo el 36.4% de la población analizada tiene anticuerpos $\geq 1:256$, titulación considerada protectora en este estudio. 52/222 eran cachorros de seis semanas de edad con presencia de ADM, con una mediana de títulos de anticuerpos de 1:96, solo el 9.6% tubo títulos de anticuerpos $\geq 1:256$, mientras que 170/222 perros eran mayores de 6 semanas de edad, con una mediana de títulos de anticuerpos de 1:128 y un 44.7% de perros con anticuerpos $\geq 1:256$.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIA	II
RESUMEN.....	III
ÍNDICE.....	IV
INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Descripción del agente etiológico	4
2.2 Patogénesis de la gastroenteritis parvoviral	8
2.3 Signos clínicos de la gastroenteritis parvoviral	12
2.3.1 Presentación clínica con signos cardiacos.....	12
2.3.2 Presentación clínica con signos entéricos.....	13
2.4 Patología.....	16
2.4.1 Lesiones macroscópicas	16
2.4.2 Lesiones microscópicas	18
2.5 Aspectos de la respuesta inmune contra PVC-2	20
2.6 Aspectos sobre la Vacunación.....	25
2.7 Técnicas para la determinación de títulos de anticuerpos	30
2.7.1 Inhibición de la hemoaglutinación (HI).....	30
2.7.2 Inmunocromatografía	31
2.7.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)	32
2.8 Antecedentes relacionados a este trabajo.....	35
3. JUSTIFICACIÓN.....	38
4. HIPÓTESIS	40
5. OBJETIVO.....	41
5.1 Objetivos específicos.....	41
6. MATERIAL.....	42

6.1 Material biológico	42
6.2 Material de laboratorio	42
6.3 Equipo.....	43
6.4 Reactivos	43
7. MÉTODO.....	44
7.3 Inhibición de la hemoaglutinación (HI)	45
7.4 Inmunocromatografía.....	46
7.5 ELISA.....	46
8. LÍMITE DE ESPACIO	49
9. LÍMITE DE TIEMPO.....	50
10. RESULTADO	51
11. DISCUSIÓN	58
12. CONCLUSIÓN	63
13. SUGERENCIAS	64
14. LITERATURA CITADA.....	65
15. ANEXOS	73

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICAS

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modelo de la estructura de la capsida del PVC-2.....	5
Figura 2 Esquema de la patogénesis parvoviral	9
Figura 3 Cuadros de contingencia	51
Figura 4 Analisis de presencia de anticuerpos considerando la edad	56
Figura 5 Analisis de presencia de anticuerpos considerando el sexo.....	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concordancia entre IC, HI y ELISA para la detección de titulación de anticuerpos contra CPV-2.....	53
Tabla 2 Análisis de IC, HI y ELISA para la detección de anticuerpos IgG contra PVC-2	54
Tabla 3 Características cualitativas de IC, HI y ELISA	55

1. INTRODUCCIÓN

La enteritis hemorrágica por parvovirus canino es considerada la enfermedad viral más común en los perros, ésta afecta principalmente a los cachorros menores de 6 meses de edad (Shashidhara *et al.*, 2009). El agente etiológico de esta enfermedad es miembro de la familia *Parvoviridae*, género *Protoparvovirus* de la especie *Protoparvovirus de los carnívoros tipo 1* (Cotmore *et. al.*, 2014) El parvovirus canino tipo 2 (PVC-2), es un virus pequeño, con genoma de DNA de hebra simple, los viriones tienen un diámetro de aproximadamente 20 nm, y no poseen envoltura. Son resistentes al éter, el cloroformo, a los ácidos y al calor, poseen la capacidad de hemoaglutinar eritrocitos principalmente de cerdo (Nandi y Kumar, 2010).

El mecanismo de entrada del virus al organismo del animal es por la vía oral-fecal y también se puede realizar por el contacto con secreciones contaminadas o por fómites (Cote, 2007). La viremia ocurre en promedio al quinto día después de la infección y va disminuyendo con relación al incremento de anticuerpos séricos neutralizantes, posteriormente estas partículas virales se diseminan a la médula ósea, intestino delgado y pulmón (Meunier *et al.*, 1985). La infección por PVC-2, se caracteriza por una depleción en el conteo de células leucocitarias, debido a la muerte de las células precursoras de los leucocitos. Por otro lado, la replicación viral en las células epiteliales de las criptas intestinales provoca una necrosis del epitelio y un acortamiento de las microvellosidades intestinales, disminuyendo la capacidad de absorción del intestino, como consecuencia se produce una diarrea que puede ser desde catarral hasta hemorrágica (Flores, 1987; Gómez y Guida, 2010).

La protección contra la infección durante las primeras semanas de vida se logra mediante transferencia pasiva de inmunoglobulinas de la madre. Los cachorros recibirán anticuerpos por vía transplacentaria y mediante la toma de calostro, estos anticuerpos tienen en promedio una vida media de 9.7 días, la protección

mediante anticuerpos derivados maternos (ADM) es en promedio de 10-14 semanas (Greene, 2012). Existe un periodo crítico en el que los anticuerpos presentes en el suero sanguíneo de los cachorros no son los suficientes para proveer protección contra un agente infeccioso, pero sí lo son para interferir con un intento de inmunización activa mediante vacunación. Este periodo dependerá de los títulos de anticuerpos presentes en los cachorros, lo cual es condicionado a los títulos de anticuerpos que poseía la madre poco antes de la gestación (Greene, 2012). Es importante la determinación de títulos de anticuerpos en cachorro a primo vacunación para evitar este periodo y garantizar la inmunización.

La inmunidad activa se adquiere por vía de vacunación o contacto por virus de campo. En ocasiones los perros después de la vacunación muestran protección parcial y si posteriormente se exponen al virus de campo pueden sufrir infección subclínica, que reforzará su inmunidad contra la enfermedad pudiendo alcanzar títulos promedio de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación de hasta 1:5120 (Elia *et al.*, 2005). La determinación de títulos de anticuerpos en perros adulto que ya han sido desafiados con el virus ya sea vacunal o de campo está todavía en controversia, algunos autores refieren que la determinación de éstos no son necesarios para los procesos de revacunación (Selbitz y Moos, 2006). Sin embargo, actualmente se sabe que el parvovirus canino tipo C puede infectar a perros adultos previamente inmunizados (Aguilar, 2014; Decaro *et al.*, 2008), por lo que debe ser importante confirmar la presencia de anticuerpos protectores contra ésta enfermedad, esto permitirá saber si el perro se encuentra protegido y ayudará a determinar el momento exacto de la revacunación.

Existen diferentes técnicas de laboratorio que han sido desarrolladas para determinar los títulos de anticuerpos que poseen los perros. Una de ellas son los kits (paquetes) sensibles basados en pruebas de ELISA, estas pruebas resultan confiables durante la fase aguda de la enfermedad (2-8 días post infección) (Gómez y Guida, 2010). También existen pruebas basadas en

inmunocromatografía que se pueden utilizar en las clínicas veterinarias, estas son de fácil uso y rápidas de realizar, sin embargo su sensibilidad no es mayor al 80%. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) se emplea de manera habitual para estimar los niveles anticuerpos que inhiben la hemoaglutinación, estos anticuerpos son iguales que los que causan la neutralización del virus y sus niveles sirven para estimar el grado de inmunidad. La HI es una prueba altamente específica y sensibles, fácil de realizar, de bajo costo, simple y rápida (MacLachlan y Dubovi, 2011). Sí los títulos de anticuerpos se encuentran en $\geq 1:180$ o más se consideran títulos protectores, pero si los títulos se encuentran entre 1:20 a 1:180 no solo no proveerán protección, sino que interferirán con la inmunización activa contra PVC-2 (Nandi y Kumar, 2010).

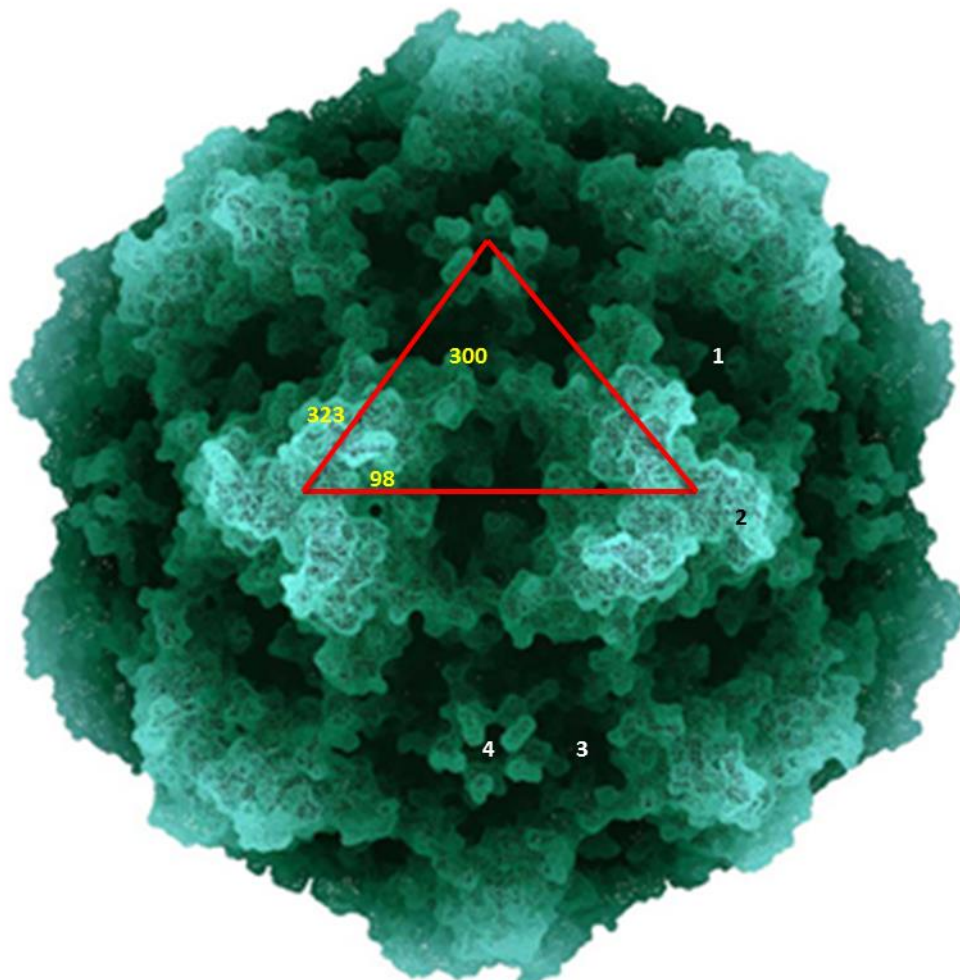
En diferentes países se han realizado muestreos en perros para determinar la prevalencia de los títulos de anticuerpos que poseen éstos y su papel en la infección por Parvovirus; otros estudios sugieren que si mínimo el 50% de los perros de una población poseen títulos protectores de anticuerpos contra parvovirus, se podrá tener el control de la enfermedad, incluso podría erradicarse (Schultz *et al.*, 2010). En México no existen estudios que analicen los títulos de anticuerpos contra PVC-2 en las diferentes poblaciones de perros, por lo tanto, se desconoce el papel de estos en el control de la infección por este virus. En este trabajo determinaremos la frecuencia relativa de los títulos de anticuerpos en una población de perros en la zona conurbada de Toluca.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Descripción del agente etiológico

El PVC-2, esta agrupado junto con el virus de la panleucopénia felina, el virus de la enteritis del visón y el parvovirus del mapache dentro de la familia *Parvoviridae*, pero el PCV-2 pertenece al género *Protoparvovirus* (Miranda *et al.*, 2015). PVC-2 es un virus de ADN de cadena simple, contiene 5200 nucleótidos, tiene un peso molecular de 1.5 a 2.2 x 10⁶ daltons y no posee envoltura. (Figura 1) Su genoma tiene dos marcos abiertos de lectura, el primero codifica a las dos proteínas no estructurales denominadas (NS1 y NS2) las cuales son generadas a través del splicing alternativo del mRNA viral, el segundo codifica para tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3). La capsida del virus está compuesta de 5 o 6 copias de VP1 y 54 o 55 copias de VP2 (Nandi y Kumar, 2010; Hueffer y Parrish, 2003; Desario *et al.*, 2005). La proteína VP3 resulta del rompimiento de VP2 solo después del proceso de traducción de esta proteína, su función no ha sido bien estudiada. Las proteínas de la capsida son altamente antigénicas, por lo que, juegan un rol importante en la determinación del hospedero y el tropismo hacia ciertos tejidos (Mittal *et al.*, 2014).

La gastroenteritis hemorrágica causada por PVC-2 fue descrita como una enfermedad potencialmente fatal y altamente contagiosa en la década de los 70's, fue aislado por primera vez en 1978, pero, las primeras muestras positivas de títulos de anticuerpos contra PVC-2 se observaron en suero de perros muestreados en Europa entre los años 1974 y 1976, los primeros sueros positivos en USA, Japón y Australia fueron reportados a inicios de 1978 (Parrish, 1999). Sin embargo se ha especulado que el virus pudo haber emergido una década antes de que la enfermedad clínica fuera descrita (Hoelzer y Parrish, 2010; Nandi y Kumar, 2010).



Fuente: adaptado de Hueffer and Parrish, 2003

Figura 1. Modelo de la estructura de la cápside del PVC-2, las áreas en rojo entre la cresta del eje triple corresponde a las regiones activas del tropismo celular y actúan como receptores para la célula hospedadora. 1.- Depresión del eje doble, 2.- cresta del eje triple, 3.- cañón, 4.- cilindro eje quíntuple.

Se cree que el PVC-2 fue originado como una variante del virus de la panleucopenia felina (FPV por sus siglas en ingles). Existen tres hipótesis de cómo emergió el virus; estas incluyen una mutación directa del FPV, la cual permitió que este virus evadiera la barrera de especie y así pudiera infectar a los

perros; otra hipótesis indica que una mutación en el virus vacunal de la panleucopenia felina permitió la adaptación a nuevo hospedero, es decir el perro a través de carnívoros no domésticos, como los visones y los zorros. Esta evolución requirió una sustitución y una mutación paralela de tres aminoácidos claves (Truyen, 2006). PVC-2 y FPV son patógenos muy importantes para perros y gatos domésticos respectivamente. Un análisis filogenético reveló que todas las variantes del PVC-2 descienden de un mismo ancestro estrechamente relacionado con el virus de la panleucopenia felina, el cual infecta gatos, minks y hurones, pero no perros o cultivos celulares de perros (Parrish, 1999; Nandy y Kumar, 2010). Existe un 98% de homología entre las secuencias del FPV y PVC-2 con tan solo seis codificaciones diferentes de nucleótidos en el gen VP2 en las posiciones 3025, 3065, 3094, 3753, 4477 y 4498 (Martella *et al.*, 2005; Parrish, 1999). Los efectos biológicos de estos pequeños cambios fueron suficientes para que PVC-2 adquiriera la habilidad de infectar perros, pero perdiera la capacidad de infectar y replicarse en gatos. Las mutaciones que sufrió el virus dando origen a nuevas variantes ocurrieron en la Proteína VP2 de la cápside en la posición 87, 300 y 305 (Hueffer y Parrish, 2003), afectando la afinidad para reaccionar con anticuerpos monoclonales, la unión a receptor de la transferrina felina (TfR) y la replicación en los gatos (Mittal *et al.*, 2014). Los anticuerpos monoclonales ensamblan en los epitopes presentes entre los aminoácidos 55-77, 345-365 o 446-466 en la VP2 en B19, también inhiben la HA, el primero de estos epitopes es equivalente a la parte loop 1 en el PVC, el cual se incluye en el residuo 93 determinante del rango de hospedero. El segundo epítotope corresponde al loop que es responsable de las diferencias en las propiedades hemoaglutinantes del FPV y PVC, este puede contener el recetor de eritrocitos y el tercer epítotope corresponde a una región altamente conservada región del PVC (Agbandje *et al.*, 1995).

El PVC-2 fue reemplazado por los subtipos 2a el cual fue aislado por primera vez en el año 1980 y 2b, aislado entre 1983 y 1984. Estas dos variantes difieren en un solo aminoácido en la posición 426 de la proteína VP2 de la capsida. En el año

2000 otra variante fue reportada en Italia y se le denominó PVC-2c, esta nueva variante también difiere de sus predecesores por el cambio de un aminoácido en la posición 426. Por lo tanto PVC-2a posee Asn en esta posición, mientras que PVC-2b posee Asp y PVC-2c Glu. (Decaro, 2007; Lamm *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2011). Esta última variante se ha convertido en la más común y ha sido identificada en diferentes países de Europa y en mayor número en Asia (Wilson *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Pedroza *et al.*, en el 2013 demostró que la variante viral de PVC dominante en el oriente de México dentro de la población canina actualmente es PVC-2c. La distribución de las variantes de PVC-2 son variables, en norte América las variantes predominantes son PVC-2b y PVC-2c, mientras que PVC-2a se encuentra con mayor frecuencia en Asia y Australia. Esto mismo ocurre en Europa, PVC-2a es mayormente detectado en perros de Grecia y Hungría, mientras que PVC-2a y PVC-2b, Y PVC-2a y PVC-2c tienen mayor incidencia en el Reino Unido e Italia respectivamente (Proksh *et al.*, 2015) Recientemente ha sido observada una substitución de aminoácido en la posición 297 (Ser297Ala) en las tres variantes del PVC (2a, 2b y 2c), las cuales han sido nombradas como new CPV-2a/2b. Éstos tres tipos antigénicos del PVC-2 llamados new PVC-2a, new PVC-2b y PVC-2c han sido reportados en todo el mundo (Mittal *et al.*, 2014)

Mutaciones adicionales que afectan residuos importantes de las proteínas de la cápside del PVC-2, tales como los residuos 297, 300 y 426, han sido reconocidas recientemente, sugiriendo que el PVC-2 aún se encuentra en un proceso evolutivo (Martella *et al.*, 2005)

2.2 Patogénesis de la gastroenteritis parvoviral

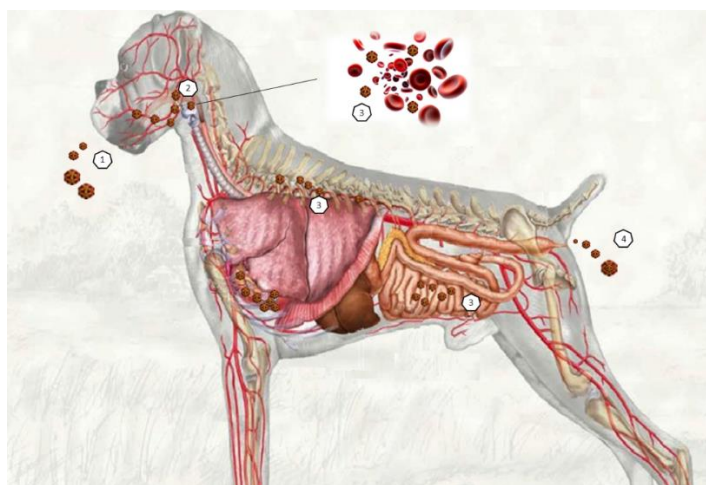
Actualmente existen dos rutas por las cuales un perro puede infectarse de parvovirus canino, la directa y la indirecta, la exposición oronasal es la ruta directa, mientras que, la indirecta, es a través del contacto con fómites contaminados con heces (Goddard y Leisewitz, 2010). Una vez que el virus logra entrar al organismo existe un periodo de incubación el cual ocurre de tres y siete días post infección (Basurto y Marín, 2003; Nandy y Kumar, 2010; Gómez y Guida, 2010). Los signos clínicos de la enfermedad aparecerán después del periodo de incubación.

Como el parvovirus tiene tropismo por órganos linfoides la replicación dará inicio en el tejido linfoide de la orofaringe, linfonodos mesentéricos y el timo; gracias a la viremia temprana, la cual ocurre entre el tercer y quinto día post infección alcanzando el pico máximo el día cinco, el virus se diseminara por leucocitos infectados a epitelios de la cavidad oral, revestimiento de la lengua, el esófago; la médula ósea y a las criptas del intestino delgado (Figura 2)(Pollock, 1982; Carman *et al.*, 1985), órganos con rápida división celular (Decaro y Buonaboglia, 2012; Meunier *et al.*, 1985). Un estudio realizado por Meunier *et al.*, en 1985 demostró que el virus puede ser aislado de pulmones, bazo, hígado, riñón y corazón.

La tasa de renovación de células linfoides e intestinales aparentemente es el factor que determina la severidad de la enfermedad, una alta tasa de renovación estará directamente relacionada con la replicación del virus y la destrucción celular. Durante el destete, los enterocitos de las criptas intestinales tienen una mayor tasa de replicación, debido a los cambios en la flora bacteriana y la dieta, por lo tanto son más susceptibles al tropismo del virus (Goddard y Leisewitz, 2010).

En la médula ósea el virus es responsable de la destrucción de células jóvenes del sistema inmune, dañando así el mejor mecanismo de defensa que tiene el organismo, es por esto que la infección por PVC-2 se caracteriza por una caída en el recuento de células blancas en la sangre (Boosinger *et al.*, 1982). La depleción

de estas células ocurre en promedio al cuarto y sexto días post infección. Los efectos más devastadores causados por el virus ocurren en el tracto gastrointestinal. Cuando el intestino está sano las vellosidades son capaces de absorber líquidos y nutrientes. Para poder llevar a cabo la absorción, las vellosidades se ayudan de microvellosidades, la vida media de éstas es relativamente corta, por lo que siempre están en constante renovación, gracias a las criptas de Lieberkuhn, siendo este el lugar donde el parvovirus produce daño. Como resultado de la infección, la renovación celular (usualmente de 1-3 días) se ve afectada, causando un acortamiento y atrofia de las vellosidades (lesión característica de la enfermedad) (Nandy y Kumar, 2010, Goddard y Leisewitz, 2010). Durante este periodo la atrofia de las vellosidades del intestino delgado hace que pierda su capacidad de absorción (Basurto y Marin, 2003). La barrera que separa las bacterias digestivas del flujo sanguíneo se rompe permitiendo una invasión potencial en todo el cuerpo. Las infecciones bacterianas secundarias por la microflora gram negativa y anaerobia causan endotoxemia y coagulación intravascular diseminada (Gómez y Guida, 2010).



Fuente: adaptada de <http://images.animalpicturesociety.com/images/06/dog-anatomy-chart-photos.jpg#.V2mZGcBEuQs.link> (2016)

Figura 2. Esquema de patogénesis parvoviral 1.- entrada del virus vía oronasal. 2.-replicación en órganos linfoides. 3.- viremia en la cual llega a placas de peyer, corazón, boca, revestimiento de la lengua, bazo, pulmones etc. 4.- eliminación en heces

Los animales infectados eliminan el virus en las heces habiéndose demostrado que durante la fase aguda de la enfermedad se llegan a alcanzar títulos de hasta 10^9 viriones infecciosos por gramo de materia fecal (Flores, 1987). La excreción del virus a través de las heces inicia al tercer día post infección, generalmente esto ocurre antes de que aparezcan los primeros signos clínicos de la enfermedad (Gómez y Guida, 2010); A partir del octavo día la presencia del virus en heces empezara a declinar desapareciendo casi en su totalidad a la segunda semana de haber iniciado la infección, es factible que la ausencia de virus en la materia fecal se deba a que han aparecidos niveles suficientes de inmunoglobulinas específicas en el intestino delgado (Flores, 1987); aunque se han reportado casos en los que la diseminación del virus ha durado 25 días después de haber iniciado la infección, de manera que, la amplia diseminación de la enfermedad se debe más a la resistencia del virus ante factores ambientales que a su diseminación por perros infectados.

En relación a la patogénesis de la forma cardiaca, se ha demostrado que la edad del cachorro juega un papel importante. Se han logrado reproducir casos de miocarditis en cachorros experimentalmente expuestos a los 5 días de edad, en contraste al intentar reproducir el cuadro clínico en cachorros de 4 semanas de edad, utilizando un virus aislado del miocardio de un cachorro que murió con signos clínicos de miocarditis, solo se logró reproducir un cuadro de enteritis parvoviral, debido a que la replicación de PVC-2 requiere de células con una tasa alta de división y las células del miocardio en cachorros neonatos se encuentran en franca proliferación, lo que favorece la replicación del virus, sin embargo, la división celular del miocardio disminuye conforme avanza la edad del animal, lo que evita la posibilidad de infección en este tejido en cachorros mayores de 2 meses (Flores, 1987; Meunier *et al.*, 1985). Así mismo, Lenghaus *et al.*, 1980 lograron reproducir la enfermedad en cachorros mediante la inoculación intrauterina en una hembra gestante ocho días antes del parto. Al momento del

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

nacimiento los cuatro cachorros eran clínicamente normales, pero dos de ellos murieron a la tercera semana de vida. Ambos perros mostraron a la necropsia miocarditis linfocítica aguda y el virus fue aislado del corazón de cada cachorro, en otros casos similares a éste reportaron que los cachorros sobrevivientes de estas camadas tenían títulos de anticuerpos contra PCV-2.

2.3 Signos clínicos de la gastroenteritis parvoviral

La enfermedad causada por las diferentes variedades del PVC-2 está asociada a una alta morbilidad y mortalidad, puede presentarse como infecciones asintomáticas o enteritis subagudas y agudas que presentan diarrea catarral o hemorrágica (Gómez y Guida, 2010). Entre los factores que determinan el curso de la enfermedad se encuentran la tasa de títulos de anticuerpos derivados maternos o anticuerpos adquiridos de manera activa en el perro infectado, la dosis viral con la que tuvo contacto el perro, el estado nutricional del mismo y cualquier otro factor de estrés al que esté sometido, tales como, el número de perros con los que este convive y el espacio e higiene del lugar que comparten (Miranda *et al.*, 2015, Decaro y Buonavoglia, 2012). Ésta enfermedad está caracterizada por la presencia de vómito, diarrea hemorrágica, fiebre y deshidratación (forma entérica) y miocarditis en cachorros infectados en el útero o a los pocos días de haber nacido, los cuales morirán antes de los tres meses de edad (Miranda *et al.*, 20015).

2.3.1 Presentación clínica con signos cardiacos

Aunque hoy en día la miocarditis causada por este virus es poco común, debido a que la mayoría de los recién nacidos reciben inmunidad pasiva y son resistentes a la infección hasta que los anticuerpos maternos han declinado (Gómez y Guida., 2010), existen diversos reportes de cachorros menores de 6 semanas de edad infectados con PVC-2; estos cachorros provienen principalmente de madres no vacunadas contra el PVC-2 (Goddard y Leisewitz, 2010). Los reportes indican que si la camada se infecta, el 70% de los cachorros moría aproximadamente a las 8 semanas de edad, debido a una insuficiencia cardiaca y el 30% sobreviviente llegará a presentar cambios patológicos, los cuales resultarán en la muerte varios meses, incluso años después (Nandi y Kumar, 2010). El brote y la progresión clínica de la enfermedad ocurre de manera progresiva y rápida, la manifestación más importantes y sobresaliente sobre la miocarditis es la muerte repentina de

cachorros a las 4 semanas de vida, los principales signos que pueden llegar a presentar estos cachorros son extremidades frías, mucosas pálidas, dificultad para respirar, náuseas, chillidos o convulsiones (Flores, 1987; Goddard y Leisewitz, 2010). La insuficiencia cardíaca aguda con dificultad respiratoria se produce en las crías de entre 4 y 8 semanas de edad, mientras que la insuficiencia cardíaca subaguda se produce en cachorros mayores a ocho semanas de edad. El abdomen se encuentra inflamado debido a la ascitis producida y a la hepatomegalia, existe taquicardia acompañada de una arritmia y un pulso débil, la mayoría de los cachorros mueren debido a un shock cardiogénico, no existe diarrea debido a que el virus se replica en las células de alta división del corazón. Si el animal sobrevive sufrirá de complicaciones miocárdicas crónicas (Nandy y Kumar, 2010).

2.3.2 Presentación clínica con signos entéricos

Ésta es la forma más común de enteritis parvoviral, es consecuencia de la destrucción de las células de las criptas de las vellosidades intestinales y de las células linfoides (Gómez y Guida, 2010), el daño en el tracto intestinal debido a la infección viral aumenta el riesgo de translocación bacteriana y una subsecuente septicemia coliforme el cual puede llevar a un shock séptico (Goddard y Leisewitz, 2010). Los signos clínicos pueden variar, incluso, dentro de un mismo criadero. Los cachorros presentan por lo general, un inicio agudo con anorexia, depresión, fiebre, vómitos que ocurren repetidamente, la diarrea puede aparecer en perros de cualquier edad, pero en mayor proporción en cachorros, ésta puede ser catarral, amarillo-grisácea, acuosa o sanguinolenta, ésta última está presente en más del 50% de los casos entéricos, la fiebre y el dolor agudo son muy comunes. (Nandi y Kumar, 2010), La deshidratación y un shock hipovolémico ocurren rápidamente, debido a la pérdida de fluidos y proteínas a través del tracto gastrointestinal (Goddard y Leisewitz, 2010). Un estudio realizado por Decaro *et al.*, 2005; el cual consistió en desafiar a dos grupos de cachorros, demostró que los signos clínicos

tales como diarrea, fiebre, anorexia, depresión, leucopenia y linfopenia se presentaron en el 100% de la población de perros infectados, mientras que el vómito no fue presenciado en ninguno de los cachorros, Contradiendo a Decaro, Meunier *et al.*, 1985 quienes que el signo clínico de vómito es un factor importante durante el desarrollo y severidad de la enfermedad, apareciendo entre el día seis y once post infección. La diarrea tuvo una duración media de 3.5 días, este signo fue notorio entre los días ocho y once post infección, mientras que la fiebre estuvo presente los días ocho y nueve alcanzando su pico máximo el día ocho con una temperatura de 39.8°C, en el caso de la anorexia tuvo una duración promedio de tres días, siendo más evidente entre los días ocho y once después del desafío, con respecto al signo de depresión hubo un ligero cambio en la severidad con que se dio entre los grupos, durando en promedio tres días, siendo más notoria entre el día ocho y diez; con respecto a la leucopenia y linfopenia ambas tuvieron una duración media de 2.5 días y fue posible encontrarla dentro de los días nueve y once post infección con su pico máximo el día nueve (Decaro *et al.*, 2005). Otro estudio realizado por Castro *et al.*, 2013, donde monitorearon a 13 cachorros que presentaban cuadros entéricos hemorrágicos a causa del PVC, refiere que el 77% de la población presento diarrea, mientras que el 75% tenía las mucosas pálidas, 92% tenía una deshidratación $\geq 5\%$ y solo el 30.7% presentó fiebre. Un estudio realizado por Miranda *et al.*, en el 2015, donde evaluaron parámetros clínicos tales como depresión o estupor, grado de deshidratación, condición corporal, vómito, diarrea, color de mucosas y temperatura rectal en 209 perros que presentaban un cuadro gastroentérico, demostró que los perros que fueron diagnosticados con PVC-2 eran más propensos a estar deprimidos, deshidratados y con baja condición corporal. También hubo una relación positiva entre los perros que presentaron vómito y los diagnosticados con PVC-2. El signo de depresión fue más frecuente en los perros que fueron diagnosticados como positivos, estos pacientes también fueron propensos a desarrollar cierto grado de deshidratación. La temperatura también es un factor a considerar, los pacientes normotérmicos

fueron diagnosticados con parvovirus canino en mayor frecuencia en comparación con los pacientes hipotérmicos (Miranda *et al.*, 2015).

Actualmente, se han reportado casos en los cuales perros diagnosticados con PVC-2 mediante la técnica de PCR han presentado cuadros clínicos atípicos de la enfermedad, por ejemplo, algunos perros solo desarrollan leucopenia sin signos de gastroenteritis e incluso algunos solo llegan a desarrollar una ligera diarrea pastosa (Aguilar, 2014). Muchos perros son llevados inicialmente a consulta debido a apatía, anorexia o vómitos (un cuadro clínico que puede ser muy similar a la ingestión de un objeto extraño) sin diarrea, y si ésta llega a aparecer no suele ser sanguinolenta (Nelson y Couto, 2010).

Aquellos perros que sobreviven los 3-4 días iniciales, en general, tienen una recuperación rápida. No obstante, se requieren de dos a tres semanas para la restauración completa de las vellosidades intestinales. Las lesiones neurológicas son poco habituales, aunque pueden ser resultado de hemorragia cerebral o coagulación intravascular diseminada, la infección por parvovirus por sí sola puede provocar síntomas graves y la muerte; sin embargo, la enfermedad se agrava por infecciones concurrentes con coronavirus canino, giardias, áscaris, coccidiosis u otros organismos entéricos (Gómez y Guida., 2010).

2.4 Patología

El PVC-2, tiene como órgano blanco para su replicación a aquellos que tenga una rápida división celular, como el corazón de neonatos, las criptas del intestino delgado y los órganos linfoides, esto es importante ya que determinará los cambios patológicos encontrados en el organismo (Pollock, 1982). Las lesiones macroscópicas causadas por el PVC-2 son altamente variables y poco específicas.

2.4.1 Lesiones macroscópicas

En la forma entérica las lesiones se encuentran distribuidas segmentalmente en el tracto gastrointestinal. Las lesiones por lo general se encuentran en el íleon y yeyuno, pero no en el duodeno y colon (Nandy y Kumar, 2010). Los segmentos afectados se encontraran flácidos, con la serosa congestionada o hemorrágica, generalmente ésta, tiene consistencia granular debido a la fibrina superficial, (Jubb *et al.*, 1985). La mucosa del mismo presenta congestión hemorrágica y necrosis en las vellosidades, sobre todo a nivel del yeyuno. El lumen del intestino suele estar vacío o puede contener ingesta acuosa (Meunier *et al.*, 1985; Flores, 1987; Nandy y Kumar, 2010; Jubb *et al.*, 1985). Por lo general el colon está vacío (Meunier *et al.*, 1985;) Las placas de Peyer pueden ser observadas como áreas ovales de color rojo oscuro de varios centímetros de largo en la serosa y en la mucosa. El estómago puede tener la mucosa congestionada y contener fluido sanguinolento o con bilis (Jubb *et al.*, 1985).

Los ganglios linfáticos mesentéricos se encuentran hipertrofiados y hemorrágicos (Decaro y Buonaoglia, 2012), también se pueden observar hemorragias petequiales multifocales en la zona cortical. En la médula ósea se produce una necrosis y por consiguiente se reduce notablemente la población de células precursoras, células maduras mieloides y eritroides (Basurto y Marin, 2003; Potgieter *et al.*, 1980). Los glóbulos rojos tienen una vida media prolongada, los efectos sobre ellos serán mínimos, aunque puede existir anemia, ocasionada por

la pérdida de sangre por vía intestinal, mientras que el daño causado en la médula ósea, resultará en un suministro insuficiente para la demanda masiva de leucocitos (especialmente neutrófilos) en el tracto gastrointestinal inflamado (Goddard y Leisewitz, 2010). Algunos patólogos han identificado necrosis en la región cortical del timo y atrofia de este órgano en perros jóvenes, lo cual puede dificultar su ubicación (Meunier *et al.*, 1985; Nandy y Kumar, 2010; Jubb *et al.*, 1985).

En las lesiones macroscópicas presentes en la forma cardíaca se puede observar atrofia cardíaca con una prominente dilatación en el ventrículo y atrio izquierdo, existe una pérdida de las fibras del miocardio, las cuales son remplazadas por tejido cicatricial, esto puede conducir a una falla cardíaca crónica, semanas o meses después de la enfermedad aguda (Gómez y Guida, 2010). Los pulmones no se encuentran colapsados, aunque a menudo hay presencia de fluido espumoso blanco en la tráquea y los bronquios (Nandy y Kumar, 2010). También existe edema pulmonar y una congestión pasiva en el hígado, con un grado variable de ascitis y efusión pleural (Flores, 1987). En una estudio realizado por Meunier *et al.*, en 1984 logro producir la forma cardíaca causada por PVC-2 inoculando a los cachorros al quinto día de nacidos, no fueron evidentes signos clínicos típicos de la enfermedad entérica, tanto a la madre, como a los cachorros se les midieron títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 antes de la inoculación, mostrando una titulación de 1:10, después del desafío el rango de los títulos se encontraba entre 1:1280 y 1:2560. A la necropsia, se encontraron depresiones grisáceas en el epicardio, los cuales se extendían sobre el miocardio. Se encontraron cambios patológicos microscópicos en el miocardio de todos los perros infectados, los cuales eran más notorios en el ventrículo izquierdo, especialmente en la zona apical, aunque en menor cantidad, también estuvieron presentes en el septum interventricular, ventrículo derecho y el atrio. Los focos inflamatorios y la fibrosis intersticial estuvieron presentes en el subepicardio (Meunier, 1984).

2.4.2 Lesiones microscópicas

Las lesiones microscópicas| están asociadas a casos fatales de PVC-2 se encuentran en el tracto intestinal, órganos linfoides y la médula ósea, órganos con rápida división celular. Las lesiones dependerán de la severidad y duración de la enfermedad.

En la forma entérica se observa necrosis multifocal de células epiteliales de las criptas, sí el daño en las criptas es severo y se encuentra ampliamente diseminado, la mucosa se encontrara adelgazada, erosionada o ulcerada, con efusión fluidos tisulares, fibrina y eritrocitos (Jubb *et al.*, 1985). Se encontrarán cuerpos de inclusión intranucleares, los cuales son de carácter eosinofílico (Decaro y Buonavoglia, 2012); las vellosidades y la lámina propia se ven afectadas como consecuencia de la descamación del epitelio y la incapacidad de remplazar las células epiteliales (Nandy y Kumar, 2010). Células inflamatorias podrán ser localizadas a lo largo del intestino delgado, también se podrán observar colonias de bacterias las cuales por lo general se encuentran acompañadas de hongos. Las lesiones presentes en los órganos linfoides consisten en linfocitosis en la paracorteza y los folículos de los linfonodos; la corteza del timo, la pulpa blanca del bazo y las células infectadas, raramente mostrarán cuerpos de inclusión. Los linfocitos se encontraran reducidos en el tejido infectado e histiocitos grandes se encuentran prominentemente, a menudo conteniendo fragmentos remanentes de restos nucleares (Jubb *et al.*, 1985). Las deficiencias de absorción del epitelio intestinal debido a una descamación, propicia cambios de permeabilidad favoreciendo así a la aparición de la diarrea (Flores, 1987).

Las lesiones microscópicas que se pueden apreciar en la forma cardiaca, se caracterizan por una inflamación no supurativa del miocardio, asociada a edema, pérdida de miofibrillas e infiltración linfocítica local (Flores, 1987). Un estudio realizado por Meunier *et al.*, 1984 demostró que la lesión predominante en la forma cardiaca de la enfermedad es fibrosis intersticial multifocal extensiva, así como un

tejido conectivo fibroso maduro, los cuales fueron más prominentes en el subepicardio y las áreas miocárdicas profundas. Rara vez se ve un infiltrado intersticial multifocal linfoplasmocítica en estos cachorros. En otras áreas, particularmente en los focos subepicardicos las fibras de los músculos fueron reemplazadas por una capa de fibras las cuales eran de distinto tamaño y grados de madures, el infiltrado inflamatorio fue mínimo el cual consistía primordialmente de linfocitos con pocas células plasmáticas (Meunier *et al.*, 1984)

2.5 Aspectos de la respuesta inmune contra PVC-2

El mayor problema en la protección de un cachorro contra la infección por parvovirus canino se deriva irónicamente desde el mecanismo de protección natural del mismo (Kumar y Nandi, 2010). El cachorro es inmunológicamente competente gracias a la transferencia pasiva de anticuerpos obtenida a través de la madre, ya sea por calostro o vía transplacentaria. La ruta por la cual los anticuerpos derivados maternos (ADM) llegan al feto es determinada por el tipo de placenta. Los perros y gatos poseen una placenta endoteliocorial, en donde el epitelio coriónico está en contacto con el endotelio de los capilares maternos. En estas especies una pequeña porción de IgG (5-10%) podrá ser transferida de la madre a los cachorros a través de la placenta (Chappuis G, 1998). Este porcentaje adquirido *in útero* protegerá a los cachorros o gatos privados de calostro pero los hace refractarios a la inmunización durante varias semanas. En un estudio realizado por Meunier (sin publicar) se inoculó subcutáneamente con PVC-2 a una hembra de 45 días de gestación, resultando en una transferencia transplacentaria de IgG específicos contra el virus aumentando con la toma del calostro, pero no hubo evidencia de infección viral fetal. Un cachorro adquirirá el 90% de ADM gracias a la ingesta de calostro, en los cachorros la actividad proteolítica en el sistema digestivo es baja y minimizada por la presencia de inhibidores de tripsina en el calostro. Por lo tanto, las proteínas del calostro alcanzan el intestino delgado, particularmente el íleon intacto, donde las células epiteliales las captan por pinocitosis y se pasan a través de estas células por los capilares intestinales, alcanzando así la circulación sistémica. Como resultado el recién nacido obtendrá una transmisión masiva de inmunoglobulinas maternas. Estos ADM pueden, potencialmente interferir con la replicación intestinal del PVC-2, ya sea mediante el recubrimiento de los enterocitos o atrapando las partículas de PVC-2 fecales, evitando su multiplicación en la mucosa (Mila *et al.*, 2014; Blanco *et al.*, 2013; Greene, 2012). En general, la permeabilidad a las proteínas calostrales es más alta inmediatamente después del nacimiento y disminuye rápidamente dentro de

24 horas posteriores a este, debido a la maduración de las células intestinales y el establecimiento de la flora intestinal. Los ADM son adquiridos durante los primeros 2-3 días de vida del cachorro y después declinan, la pérdida de anticuerpos maternos en cachorros es similar a la de las inmunoglobulinas que se administran por vía pasiva, la vida media de estos anticuerpos es de 9.7 días, pero puede ser variable ya que cada enfermedad tiene una vida media de eliminación. La composición del calostro consiste en: IgG 500-2200 mg/dl; IgM 70-370 mg/dl e IgA 150 mg/dl (Day, 1999). La clase de anticuerpos también es importante respecto a la pérdida del título, IgA, IgM e IgG del neonato, derivados del suero materno, suelen perderse en ese orden respectivamente (Greene, 2012). El título absoluto de inmunoglobulinas maternas en el suero del neonato dependerá de 3 factores; tamaño de la camada, inmunoglobulinas adquiridas en el momento de la lactancia y el título de anticuerpos que tenía la madre durante el parto. Se han observado considerables títulos de anticuerpos contra PVC-2 en la leche, probablemente para proveer cierta protección a la mucosa intestinal contra una infección por PVC (Decaro *et. al.*, 2005).

La técnica de inhibición de la hemoaglutinación (HI por sus siglas en inglés) es útil para determinar el número de títulos de anticuerpos en un perro, el cual está estrechamente relacionado con la inmunidad. Un título de $\geq 1:320$ en HI es considerado protector, un perro se considerara desprotegido si sus títulos son $\leq 1:20$. Si el rango de títulos de un perro se encuentra entre 1:40 y 1:80 se dice que el perro se encuentra en lo que denominamos “periodo crítico”, en éste se expresa el tiempo en el que el cachorro ya no resulta protegido completamente de un contagio por virus de campo por el título residual de anticuerpos maternos (Gutiérrez, 2010); sin embargo, este título residual interfiere todavía con una inmunización activa. Una vacunación efectuada durante este tiempo resulta inoperante. No obstante, si en ese periodo el cachorro se enfrenta a una gran cantidad de virus, puede contagiarse y enfermar de parvovirus. El momento y

duración de tal periodo depende decisivamente del nivel de anticuerpos recibidos, que a su vez, depende del título de anticuerpos de la madre (Greene, 2012).

Se ha visto claramente que la inmunidad mediada por células, juega un rol importante y tiene que ver fundamentalmente con la recuperación de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta inmune protectora contra PVC-2 es predominantemente humoral, siendo los anticuerpos capaces de neutralizar la mayoría de las partículas virales. La importancia de los anticuerpos en la protección contra la infección, ha sido demostrada por la efectividad de los anticuerpos, que confiere eficientemente protección contra PVC-2. (Hoelzer y Parrish, 2010). Los anticuerpos humorales podrían por si solos contener la enfermedad, previniendo la diseminación del virus a sitios secundarios, como el intestino. Por otro lado, los anticuerpos locales del intestino (coproanticuerpos) o una combinación de la inmunidad local y humoral pueden ser requeridos para una protección completa. Por lo tanto, los anticuerpos humorales pueden disminuir la severidad de la enfermedad, limitando la viremia y aun así permitiendo la replicación en el intestino. Sin los coproanticuerpos el perro podría convertirse en un portador inaparente del PVC-2 (Rice *et al.*, 1982).

Un estudio realizado por Rice *et al.*, 1982 demostró que los perros con altos títulos de coproanticuerpos para PVC-2 tienen un pronóstico clínico más favorable, altos niveles de anticuerpos en el suero y un bajo título de partículas virales en las heces. Por el contrario, los perros con bajos o casi indetectables coproanticuerpos para PVC-2, cursan con cuadros clínicos más severos, el porcentaje de muertes es más alto y una elevada diseminación viral en heces. Muchos de estos perros tenían títulos HI de anticuerpos elevados, lo cual sugiere que los coproanticuerpos juegan un papel importante para determinar el curso de la enfermedad.

Las pruebas serológicas pueden ser utilizadas para la estimación del estado inmune de los perros durante un brote de esta enfermedad. Los perros que tienen títulos de anticuerpos protectores no solo contra parvovirus, sino también contra

enfermedades como el distemper canino son considerados como “inmunes” contra los virus, por lo tanto, perros que no tienen signos clínicos de enfermedad, y que han sido expuesto a PVC o al distemper canino y tienen títulos de anticuerpos protectores contra estos virus montaran una respuesta inmune adecuada, lo cual los hará resistentes a la enfermedad y pueden ser asignados en la categoría de “bajo riesgo”, sin embargo estos aun eliminaran el virus, por lo tanto, se convierten en un foco importante de diseminación y riesgo para los demás perros (Gray *et al.*, 2012) .

La inmunidad innata, constituye la primera línea de defensa frente a los agentes extraños. Se caracteriza por presentar una respuesta inmediata, es incapaz de distinguir diferencias sutiles entre antígenos y carece de memoria. Existen barreras físicas, químicas y biológicas en la superficie corporal, cuya función es evitar la entrada de patógenos, cuando un agente extraño supera estas barreras se producirá la activación de los componentes y mecanismos inmunológicos innatos internos tales como monocitos, macrófagos, células dendríticas, mastocitos, células NK, linfocitos intraepiteliales LT, el sistema de complemento y ciertas citoquinas (Gutierrez, 2010)

La inmunidad adquirida se caracteriza por ser específica, tener memoria, su gran diversidad y ser autolimitada. Esta respuesta es dual: humoral, mediada por anticuerpos secretados por linfocitos B una vez diferenciados en células plasmáticas, los cuales son eficientes frente a antígenos extracelulares; y celular, mediada por linfocitos Tc quienes destruyen células infectadas por patógenos intracelulares y células tumorales (Blanco *et al.*, 2013).

Cuando la infección de una célula es causada por un virus, estimulará la producción de interferón tipo I, el cual promueve la síntesis de nuevas proteínas. El IFN-1 se unirá a sus receptores en las células y producirá un estado antivírico para impedir la formación de nuevas partículas víricas. Cuando las células infectadas por un virus tienen la expresión de CMH-I disminuida o anulada las

células NK lo detectan y actúan inmediatamente. Existe una respuesta temprana de los macrófagos, los cuales degradan los virus fagocitados y lisan las células infectadas mediante procesos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Los anticuerpos neutralizan los virus al bloquear su entrada a la célula, tienen propiedades opsonizantes y aglutinantes, pueden recubrir células infectadas para eliminarlas mediante ADCC por células NK, macrófagos y neutrófilos. Por otro lado el complemento se activa tras la formación de inmunocomplejos para inducir la virolisis y lisis de células infectadas. Los leucocitos CD8⁺ reconocerán al antígeno vírico sintetizando en el citosol de la célula, asociado al CMH-I, promoviendo la lisis de las células infectadas, mientras que los linfocitos CD4⁺ reconocerán los antígenos exógenos procesados y presentados unidos al CMH-II en las Células Presentadoras de Antígenos, colaborando con la respuesta de los CTL y en la maduración de los linfocitos B. (Blanco *et al.*, 2013).

La inmunidad secretora gastrointestinal actúa con cierta independencia de la sistémica, no son compartimentos aislados y existe un intercambio de información mutuo. Las IgAs predominan en la mucosa, pero solo en el calostro su concentración será de 150-340 mg/dl la cual será superior a la sérica, en condiciones normales la cantidad de IgA sérica es de 20 a 150 mg/dl. La IgAs es la primera línea defensiva contra virus, parásitos y bacterias, debido a su capacidad aglutinante, evitando la adhesión de los patógenos al epitelio de la mucosa y la formación de colonias, ya que solo activa el complemento en contadas circunstancias y tiene escasa participación en la citotoxicidad. (Blanco *et al.*, 2013; Quiroz, 1989)

2.6 Aspectos sobre la Vacunación

La inmunización de animales de compañía es uno de los métodos más importantes para la prevención de enfermedades comúnmente infecciosas. Estas estimulan al sistema inmune para producir anticuerpos que protegerán contra organismos presentes en el medio ambiente. La eficacia de los calendarios de vacunación se mide por la exposición a infecciones a corto plazo.

Las vacunas del PVC, junto con las del distemper canino, la hepatitis infecciosa canina y la rabia, se consideran las “vacunas de carácter obligatorio” que todo perro debe recibir de manera permanente, estas deben ser seguras y eficaces, y los cachorros no deben poseer ADM que interfieran con el proceso de la inmunización. Como el PVC-2 es ubicuo y, debido a su estabilidad fuera del hospedero y la facilidad con que se transporta en los fómites, prevenir la exposición es casi imposible, por lo tanto la vacunación es el método más adecuado para la prevención de la misma (Gómez y Guida, 2010).

Debido a que existe un periodo crítico durante el cual no se puede vacunar al cachorro, ya que es susceptible a la infección natural por tener un nivel bajo de anticuerpos maternos, pero que es capaz de interferir con la vacunación. Este periodo puede durar desde algunos días hasta varias semanas, en función del nivel de inmunidad materna y de la vacuna utilizada; es necesario determinar los títulos de anticuerpos previamente al inicio de una vacunación (Gutiérrez, 2010). Los cachorros con un título de anticuerpos menores de 1:80 unidades de inhibición de la hemoaglutinación (HI) son susceptibles a la infección. Esto da lugar a una brecha inmunológica que es la principal razón de las fallas en la vacunación. Por lo tanto, los calendarios de vacunación ya no se deben basar en la edad del perro, sino en la tasa de títulos de anticuerpos de cada uno de los cachorros de la camada y establecer un calendario de vacunación personalizado. Este calendario debe iniciar cuando el cachorro tenga títulos menores a 1:40 HI. Y deberá terminar cuando los cachorros alcancen títulos de anticuerpos protectores, basándose en

los datos publicados por Decaro *et al.*, 2005 en el cual consistió en desafiar a 4 grupo de cachorros con distintos títulos de anticuerpos demostró que los cachorros que tenían una tasa de títulos 1:320 no presentan signos alguno de enfermedad pero si diseminaran el virus, mientras que cachorros con títulos menores a 1:160 presentarían signos que irían de leves a severos conforme va disminuyendo la tasa de título de anticuerpos. Lo cual indica que para que un cachorro sea considerado protegido contra la enfermedad producida por PVC-2 debe tener títulos de anticuerpos mayores a 1:160, en contraste con lo que dice Decaro, Nandi y Kumar refieren que los cachorros que tienen una tasa de título de anticuerpos $\geq 1:80$ se encuentran completamente protegidos contra la enfermedad. Un estudio realizado por Burtonboy *et al.*, en 1991, en el cual inocularon a 4 grupos de cachorros con una vacuna que contenía 10^7 TCID₅₀, estos grupos tenían una tasa de títulos de anticuerpos de ≤ 8 , 16, 32 y >32 mostraron una seroconversión inducida de 95, 89, 82 y 44% respectivamente.

La presencia de anticuerpos contra PVC-2 en perros adultos indica una vacunación previa o una exposición ante el virus, lo cual puede otorgar una protección parcial contra la enfermedad (Riedl *et al.*, 2015). Con respecto a la vacunación en perros adultos se debe dejar atrás la teoría que considera que el PVC-2 es una enfermedad que es exclusiva de cachorros, Decaro demostró en el 2008 que actualmente se han presentado casos en los que perros adultos con múltiples vacunaciones han cursado cuadros gastroentéricos hemorrágicos, diagnosticándolos por PCR y caracterizándolos como PVC-2c, lo cual hace suponer, que la nueva variante de parvovirus puede afectar a perros adultos vacunados y pone en discusión si las vacunas realizadas con PVC-2 o PVC-2b son efectivas en la protección contra todas las variantes del virus. Otro estudio realizado por Böhm *et al.*, 2004 demostró que la tasa de título de anticuerpos protectores contra PVC-2 es más alta en cachorros que en perros adultos, y que, conforme un perro va siendo longevo, sus títulos de anticuerpos protectores van declinando, mostrando así la importancia de la revacunación en perros adultos

(Böhm *et al.*, 2004; Taguchi *et al.*, 2011), aunque estudios anteriores indican que los niveles totales de IgA aumentan significativamente con la edad, mientras que los niveles de IgG no muestran ninguna alteración (Blount *et al.*, 2005). Un estudio realizado por Japoneses en perros domésticos adultos estableció que comúnmente la vacunación contra PVC-2 no provocan un aumento significativo en los títulos de anticuerpos contra la enfermedad, incluso si los títulos de anticuerpos se encuentran bajo (Taguchi *et al.*, 2012). Un estudio realizado por Ridle *et al.*, 2015 en el cual inocularon a perros mayores de un año de edad con una vacuna triple la cual contenía la cepa vacunal de PVC, mostró que en el 83% de la población inoculada, no se observó un aumento de anticuerpos, los perros que respondieron ante la vacunación mostraron un incremento de anticuerpos durante los primeros 7 días post vacunación, así como efectos secundarios provocados por la misma, esta respuesta estuvo asociada a la falta de anticuerpos protectores inicialmente y a un peso menor a 10 kg, lo cual pone en discusión si es necesaria realizar una vacuna contra PVC que este diseñada en relación a la raza y peso de las mascotas.

El intervalo de vacunación para prevenir la infección con PVC-2 y DCV es de 3 años en caso de haber utilizado una vacuna viva modificada o de 1 año, si la el antígeno se encontraba inactivado (Moore *et al.*, 2004). Schultz sugiere que la duración de la inmunidad seguida de la vacunación contra PVC o DVC puede ser de cinco a siete años respectivamente, aunque estos datos no implican que todos los perros vacunados serán inmunes durante todo ese periodo de tiempo (Schultz, 1999), en relación a esto Ottiger en un estudio en el cual midió títulos de anticuerpos a 260 perros que tenían más de un año sin ser vacunados, demostró que existen niveles adecuados de anticuerpos en suero contra DCV y PVC en perros aun cuando tienen más de 36 meses sin ser vacunados (Ottinger *et al.*, 2006)

Las vacunas utilizadas actualmente están basadas en virus atenuados, que conservan su capacidad de multiplicación (vacunas vivas) y unas preparadas a base de virus inactivados (muertas). Es recomendable la inmunización con vacunas atenuadas en cachorros (Decaro *et al.*, 2014). Para iniciar calendarios de vacunación en cachorros es importante determinar los títulos de anticuerpos, si esto no es posible, se debe inocular con una vacuna con alta masa antigénica, para evadir a los ADM, un estudio realizado por De Cramer *et al.*, 2011, el cual consistía en probar dos calendarios de vacunación, uno de ellos consistía en aplicar una vacuna con alta masa antigénica en 91 cachorros a las 4 semanas de vida, después aplicar una vacuna cuádruple a las semana 6 y 9 y concluirlo con una vacuna séxtuple a la semana 12 de vida, el segundo calendario era similar, solo que no aplicaban la vacuna con alta masa antigénica. Este estudio concluyó que aun cuando en el 80% de la población hubo seroconversión en la inoculación, es necesario aplicar 4 dosis vacunales para que el 100% de la población tenga títulos protectores.

En todos los programas vacunales es importante realizar vacunaciones de refuerzo y realizarla en el momento adecuado, el cual se debe realizar de acuerdo a la tasa de títulos de anticuerpos contra el virus. Actualmente se sabe que una serie incompleta de vacunaciones iniciales y la falta de los refuerzos son causa de fracaso vacunal. La determinación de títulos de anticuerpos contra parvovirus canino es de gran utilidad basándonos en la alta morbilidad y mortalidad que causa la enfermedad, combinado con la utilidad de determinar la repuesta inmune humoral ante éste virus para poder establecer si es necesaria una nueva revacunación (Twark y Dodds, 2000; Riedl *et al.*, 2015). Muchos autores han sugerido que en lugar de aplicar la revacunación anual, los perros deben ser sometidos a in análisis de títulos de anticuerpos y que aquellos que muestren anticuerpos negativos, borderline o bajos deberán ser revacunados (Babalola *et al.*, 2016). Aunque las vacunas contra PVC son consideradas seguras y los efectos secundarios severos se presentan con poca frecuencia, la vacunación

debe ser aplicada solo en caso de ser necesario (Day, 2006). La vacunación periódica contra PVC-2 no induce necesariamente a un efecto de refuerzo beneficioso sobre el sistema inmunológico. Una tasa baja de anticuerpos está asociada al factor efecto-vacuna, indicando que los títulos tienen que estar bajos para permitir que la respuesta inmune ocurra, de lo contrario los anticuerpos preexistentes neutralizarán al antígeno vacunal antes de que éste pueda estimular la inmunidad celular tal como ocurre con los ADM (Riedl *et al.*, 2015).

La inmunidad contra el parvovirus canino depende en gran parte en la presencia de los anticuerpos neutralizantes. Existen estudios que han establecido que si al menos el 50% de los perros de una población poseen títulos protectores de anticuerpos contra PVC, favorecerá al control de la enfermedad (Schultz *et al.*, 2010).

2.7 Técnicas para la determinación de títulos de anticuerpos

La detección de la respuesta inmune a un agente infeccioso está basada en su mayor parte, en la determinación de la respuesta de anticuerpos del huésped hacia el agente de interés. La medición de títulos de anticuerpos sigue siendo una técnica que sirve para definir el estatus de defensa del animal, así como proveer información para establecer si éste montó una respuesta inmune adecuada y así utilizar esta información como un indicador práctico de la necesidad de la revacunación (Riedl *et al.*, 2015). Para determinar si un animal ha sido infectado por algún virus en determinado momento, son más confiables las técnicas serológicas, que solo tratan de detectar el virus. El uso de pruebas serológicas para el análisis de la eficacia de vacunas, puede ser un factor importante para un programa de manejo de enfermedades infecciosas. Una prueba de detección de anticuerpos realizada a pacientes recién vacunados, puede probar si el programa de inmunización y el procedimiento fueron realizados de manera correcta (MacLachlan y Dubovi, 2011).

Actualmente existen distintas pruebas de laboratorio con alta sensibilidad y especificidad para su uso en clínicas veterinarias, estas determinan si los perros tienen anticuerpos protectores para patógenos importantes, tal es el caso de PVC-2 (Moore *et al.*, 2014; Gray *et al.*, 2012).

2.7.1 Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

La hemoaglutinación (HA) es una importante propiedad característica del PVC-2, la cual nos provee una herramienta muy valiosa para la detección y cuantificación del virus, este método es sensible, específico, simple de realizar y barato. El principio de este estudio es simple, el virus posee la capacidad de hemoaglutinar con eritrocitos de cerdo, por lo que, el PVC-2 se une al eritrocito a través del receptor en su superficie (Appel, 1979) Los anticuerpos contra PVC-2 se unirán a la molécula viral y por lo tanto este no podrá unirse al receptor en el eritrocito se bloqueará la hemoaglutinación (HA), produciendo así la inhibición de la

hemoaglutinación (HI). Para cuantificar la cantidad de anticuerpos presentes en el suero, éste será diluido en serie en los pocillos de la placa de micro titulación. El título del suero será la mayor dilución del mismo, capaz de inhibir la aglutinación de los eritrocitos porcinos, por parte del parvovirus (Carmichael *et al.*, 1979; Gómez y Guida, 2010; Basurto y Marin, 2003; MacLachlan y Dubovi, 2011). Un título $\geq 1:64$ es considerado como positivo, si la titulación es considerada menor a esta el resultado será negativo (Ariza-Pinzon *et al.*, 2003). En un estudio realizado por Decaro, no solo utilizaron esta técnica para la medición de anticuerpos, sino que, utilizando un panel con 4 anticuerpos monoclonales lograron hacer la caracterización de la cepa que estaba causando los cuadros hemorrágicos en seis cachorros (Decaro *et al.*, 2005).

Es probable encontrar anticuerpos específicos en perros que de alguna manera han estado en contacto previo con el virus, ya sea porque fueron vacunados, o tal vez por que sufrieron una infección a la cual sobrevivieron, la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación en el suero de un perro, no constituye en sí un diagnóstico definitivo (Flores, 1987)

2.7.2 Inmunocromatografía

La Inmunocromatografía, es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más moderna cuyas principales ventajas, son la simplicidad y rapidez de la prueba. Cada vez son más las aplicaciones de ésta técnica, como pruebas de diagnóstico rápidas, debido a que no es necesario reactivos ni instrumentos adicionales. La inmunocromatografía se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona del conjugado, el cual está formado por un antígeno específico contra uno de los epítomos del anticuerpo a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el anticuerpo problema, este se unirá al antígeno formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. La zona de captura está formada por un segundo antígeno específico contra otro epitopo del anticuerpo. Al

llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y anticuerpo quedarán retenidos y la línea se teñirá (muestra positiva). En el caso contrario las muestras serán negativas. La zona control está formada por un tercer antígeno que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de la muestra alcanza ésta zona, el antígeno se unirá al anticuerpo libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea es un control de que el ensayo ha funcionado bien, por lo que siempre se teñirá, sin importar si la muestra es positiva o negativa (MacLachlan y Dubovi, 2011).

En general, cuando una prueba de detección rápida da un resultado positivo éste debe ser considerado como tal, sin embargo, si el resultado es negativo, se debe considerar realizar pruebas adicionales para sustentar dicho diagnóstico; un estudio realizado por Schmitz demostró que estas pruebas tienen una especificidad que va de 97.8% – 100%, pero carecen de sensibilidad pues esta va de 18% - 40% (Smitch *et al.*, 2009).

2.7.3 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Esta técnica tienen su nombre gracias al acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”. Este ensayo serológico es elegido para la determinación cuantitativa y cualitativa de anticuerpos, debido a que es una prueba rápida, relativamente barata y pueden no requerir la producción de virus infeccioso para el antígeno si se utilizan antígenos recombinantes. El fundamento de esta prueba para la detección de anticuerpos consiste en la unión del antígeno viral a una matriz sólida. Se añade suero y, si son anticuerpos contra el antígeno presente en la muestra, se unen a ella. En la prueba directa la detección de la unión del anticuerpo se detecta mediante un anticuerpo anti-Especies etiquetado con una enzima, con la adición del sustrato enzimático, una reacción de color se desarrolla y puede ser evaluada visualmente o con un espectrofotómetro. Es importante tener un control el cual nos permitirá definir si la prueba es aceptable y que muestras en la prueba son positivos. El

producto de una reacción enzimática es determinado en distintas ocasiones en un intervalo muy pequeño. Una de las desventajas de esta técnica consiste en la especificidad de especie, pues si desarrolla una prueba que pueda detectar anticuerpos contra distemper canino en perros, no podrá ser utilizada en la detección de anticuerpos de este mismo virus en leones. La sensibilidad u especificidad de esta prueba ha mejorado en gran medida gracias al desarrollo de anticuerpos monoclonales y la producción de antígenos recombinantes. Aunque es una técnica altamente específica, existen datos variados sobre su sensibilidad, ésta puede variar entre 81.8% (Marcovich *et al.*, 2012), 52% (Desario *et al.*, 2005), 31.81% (Ariza-Pinzon *et al.*, 2003) y 18.4% (Schmitz *et al.*, 2009). Los falsos negativos en esta técnica son comunes y puede interferir en un buen diagnóstico, manejo y ayudar a la diseminación del virus (Proksch *et al.*, 2015). Un estudio realizado en el 2012 en el cual determinaron anticuerpos a perros que llegaban a un refugio, los cuales fueron determinados mediante tres técnicas, HI, inmunofluorescencia y ELISA determino que la especificidad de ELISA fue más alta que la obtenida en la inmunofluorescencia para la correcta identificación de perros con títulos de anticuerpos protectores contra parvovirus canino y distemper canino, pero no hubo diferencia respecto a la sensibilidad (Ariza-Pinzon, 2012).

La importancia de la variación genética y antigénica del PVC, puede producir alteraciones en los epitopes de la capsida y estos a su vez pueden reducir la efectividad de las vacunas contra PVC, o afectar el rendimiento de los test de diagnóstico rápido para la detección de antígeno o de anticuerpos específicos contra esta enfermedad, es por esto que Marcovich *et al.*, 2012 realizaron un estudio en el cual buscaba cual era la sensibilidad de ELISA ante la detección de los antígenos PVC-2b y PVC-2c, teniendo como prueba de oro la PCR, en este estudio fueron procesadas 42 muestras de las cuales 27 fueron positivas y 15 negativas, mientras que en PCR 33 fueron positivas y 9 negativas, estas muestras fueron secuenciadas dando como resultado 9 perros infectados con la cepa PVC-2b y 24 con PVC-2c, la sensibilidad de ELISA ante la detección de PVC-2b y PVC-

2c fue del 75%. En general la sensibilidad de ELISA en este estudio para la detección de PVC-2 fue del 81.8% mientras que su especificidad fue del 100% (Marcovich *et al.*, 2012).

En un formato ampliamente utilizado para los kits de pruebas que se pueden ejecutar en el consultorio de un médico, el suero de prueba fluye a través de un filtro de membrana que tiene tres áreas circulares impregnadas con antígeno, dos de los cuales ya han interactuado con un positivo y un suero negativo, respectivamente, después fluye el suero de prueba a través de la membrana y una etapa de lavado se lleva a cabo, se añade un segundo anticuerpo anti-especie con una enzima ligada a la misma y la membrana se teñirá de nuevo antes de la adición del sustrato de la enzima. El resultado se lee como un cambio de color en la círculo de la prueba, que se compara con el cambio de color en el control positivo y no debe haber algún cambio en el control negativo (MacLachlan y Dubovi, 2011). Aunque estas pruebas están siendo utilizadas en las clínicas por su practicidad y rápido resultado, unas de sus grandes desventajas son que aunque son relativamente rápidas (20 min), pero muchas de estas son “multi-step”, por lo que llevan cierta preparación durante el procedimiento lo cual puede hacer que el tiempo transcurrido sea más largo antes de obtener el resultado final, también no pueden ser procesadas muestras únicas, ya que en general está diseñado para analizar varias muestras a la vez y sumado a esto está el elevado costo de las mismas (Gray *et al.*, 2012)

2.8 Antecedentes relacionados a este trabajo

La protección de un perro contra PVC está basada en la respuesta de los anticuerpos neutralizantes, por este motivo es importante la determinación de los títulos de anticuerpos, debido a que estos nos permiten evaluar la protección inmunitaria de un animal. La prueba serológica más utilizadas para la determinación de título de anticuerpos es la inhibición de la hemoaglutinación (HI), debido a su sencillez y rapidez en su realización. Varios autores refieren que, la evaluación del título de anticuerpos sólo tiene sentido cuando se trata de anticuerpos pasivamente adquiridos, ya que los anticuerpos producidos por la inmunidad activa siempre están protegidos con toda probabilidad ante un nuevo contagio (Selbitz y Moos, 2006). Sin embargo, un estudio realizado por Decaro *et al.*, en el 2007 en un brote de PVC que afectó severamente un criadero de perros en Italia, en el cual, los perros infectados cursaron con cuadros clínicos que llegaron a ser severos y, en el caso de una hembra gestante el desenlace fue fatal, todos los perros pertenecientes a este criadero contaban con su calendario de vacunación completo y al día, los cachorros eran inoculados al día 42 de vida, con una vacuna de alta masa antigénica, seguido de dos dosis de una vacuna cuádruple (Distemper, Parvovirus, Adenovirus y Leptospira) en los días 57 y 90 de vida; con respecto a los perros adultos, estos recibían un refuerzo vacunal anualmente utilizando la misma vacuna cuádruple. Este brote de PVC mostró dos aspectos atípicos de importancia, la edad de los animales infectados y la infección en perros que estaban vacunados. En total 11 perros que tenían edades entre 6 meses y 2.5 años, que estaban inoculados con una cepa vacunal PVC-2, fueron diagnosticados como positivos a PVC-2c mediante PCR y secuenciación. Es probable que una cepa altamente patógena PVC-2c fuera capaz de infectar a los perros adultos, causando la enfermedad y en un caso, incluso la muerte, ya que la inmunidad inducida por la vacuna PVC-2 no fue capaz de asegurar una protección adecuada contra esta cepa de campo que logró infectar a los perros (Decaro *et al.*, 2008).

Actualmente existe la duda de si las vacunas disponibles en el mercado, las cuales están hechas con la cepa PVC-2 y CPV-2b, proveen protección contra todas las variantes que existen de PVC (a, b y c), un estudio realizado por Wilson *et al.*, 2014, en el cual demostró que la vacunación de perros de edad avanzada mínimo con una vacuna multivalente que contenga la cepa variante PVC-2b inducirá respuestas serológicas de reacción cruzada contra todas las cepas de campo actualmente en circulación, PVC-2a, PVC-2c y PVC-2. (Wilson *et al.*, 2014; Schultz *et al.*, 2010). Sin embargo existen reportes de perros vacunados que han desarrollado la enfermedad (Decaro *et al.*, 2008)

Por otro lado, se ha reportado que los títulos de ADM protectores en un desafío experimental contra PVC-2 van de 80 a 320, con una media de 160 (Schultz *et al.*, 2010). Sin embargo, un estudio realizado por Elia *et al.*, en el 2005 demostró que cachorros que tenían título de anticuerpos contra PVC considerados protectores (≥ 80), cruzaban por un cuadro gastroentérico típico de PVC después de haber sido desafiados con una cepa de campo, así mismo un estudio similar realizado por Decaro *et al.*, en el 2005, arrojó datos parecidos, indicando que, entre más baja es la tasa de anticuerpos del cachorro, más severo es el cuadro clínico. En ambos estudios se estableció que aun cuando el cachorro tenga ADM ≥ 160 evitará la enfermedad pero no la infección.

El éxito del control de la enfermedad está estrechamente ligado al porcentaje de perros protegidos contra el PVC, actualmente en México no existe un estudio que nos permita saber cuál es la presencia de títulos de anticuerpos protectores contra éste virus, un estudio realizado por Litster *et al.*, en el 2012 en el cual evaluaron títulos de anticuerpos en perros de dos refugios, determinó que en el refugio 1 el 68% de los perros tenían títulos contra PVC, mientras que en el refugio 2 el porcentaje fue más elevado llegando a 84.3%, en ambos refugios el 75% de estos perros eran adultos. Otro estudio realizado por Lechner *et al.*, en el 2010, en el cual determinaron la prevalencia de títulos de anticuerpos protectores contra

distemper canino y PVC de 431 perros en un refugio de florida, mostrando que, el 64.5% de los perros tienen títulos insuficientes contra estas enfermedades, mientras que el 35.5% tiene títulos protectores para ambas enfermedades, el 7.7% tienen títulos de anticuerpos protectores (TAP) contra distemper canino, pero no contra PVC, 31.5% tienen TAP contra PVC pero no contra distemper canino, y 109 perros, es decir el 25.3% no tenían TAP para ninguno de los virus.

Otro estudio realizado por Acosta-Jamett *et al.*, en el 2015, en el cual realizaron un análisis epidemiológico de distemper canino (VDC) y parvovirus canino en perros de zonas urbanas y rurales, mostró que la seroprevalencia de VDC en las zonas urbanas es del 61% y en el área rural es de 47%, mientras que en el caso de PVC la seroprevalencia en perros de zonas urbanas es de 89% y 72% para las zonas rurales.

3. JUSTIFICACIÓN

La gastroenteritis hemorrágica por Parvovirus canino tipo 2, es una de las principales enfermedades virales que afectan a los perros de México, se caracteriza por una alta morbilidad y mortalidad, sobre todo en perros jóvenes, en la actualidad el único método de control que se utiliza es la vacunación. Sin embargo, éste método de protección no ha sido totalmente eficiente. Existen diversos reportes de perros vacunados que posteriormente han desarrollado la enfermedad, a pesar de esto no existen muchos estudios sobre la falla de inmunidad en los perros contra parvovirus canino.

En otros estudios se ha documentado que la principal respuesta inmunológica contra PVC-2 es de tipo humoral, así mismo, se han realizado, estudios sobre la prevalencia de anticuerpos contra PVC-2 en poblaciones de perros y se ha demostrado que en poblaciones de perros donde la prevalencia es $\geq 50\%$ esto favorece al control de la enfermedad en dichas poblaciones. Por otro lado se ha reportado que perros que poseen títulos de anticuerpos $\geq 1:360$ pueden llegar a infectarse pero logran controlar la enfermedad, debido a que no presentan signos clínicos de la misma y el tiempo de eliminación del virus es corto, si el perro tiene títulos de anticuerpos ≥ 180 se infectara y si presentará signos clínicos, pero no tan evidentes, sin embargo sí los títulos de anticuerpos son $< 1:180$, el perro no solo se infectará, sino que el cuadro clínico que presenta va a ser severo, incluso fatal. Así mismo, ha sido bien documentado que la presencia de ADM en cachorros de menores de dos meses de edad interfiere con el proceso de inmunidad vacunal.

Por lo tanto, la determinación de títulos de anticuerpos IgG en las poblaciones de perros es importante para entender el comportamiento de la enfermedad desde el punto de vista epidemiológico, inmunológico y clínico; sin embargo, en México, no existen reportes sobre prevalencia, caracterización e incidencia de esta enfermedad. Tampoco se han realizado estudios que nos indique el nivel de

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

protección con base en anticuerpos IgG que poseen las poblaciones de perros en nuestro país. Este estudio será uno de los primeros trabajos donde se determinen los perfiles de anticuerpos que poseen poblaciones de perros, lo cual favorecerá a entender cuál es la situación actual del papel que está jugando la respuesta humoral en base a IgG sobre la protección contra PVC-2 en estos perros.

4. HIPÓTESIS

Los títulos de anticuerpos IgG contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros seleccionada de la zona conurbada de Toluca son menores a 1:256, considerados protectores contra la enfermedad.

5. OBJETIVO

Determinar los títulos de anticuerpos IgG contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros seleccionada de la zona conurbada de Toluca.

5.1 Objetivos específicos

- 1.- Analizar la factibilidad de las técnicas: inmunocromatografía y ELISA comercial, para determinar los títulos de anticuerpos contra PVC-2, comparándolas con Inhibición de la hemoaglutinación
- 2.- Determinar la frecuencia relativa de los títulos de anticuerpos IgG contra parvovirus canino tipo 2, presentes en cachorros de 6 a 10 semanas de edad, utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.
- 3.- Determinar la frecuencia relativa de los títulos de anticuerpos contra parvovirus canino tipo 2, presentes en perros mayores a 10 semanas de edad de la zona conurbada de Toluca, utilizando la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

6. MATERIAL

6.1 Material biológico

Suero sanguíneo de cachorros entre 6 y 10 semanas de edad de la zona conurbada de Toluca, obtenidos mediante venopunción (yugular o cefálica).

Suero sanguíneo de perros mayores a 10 semanas de edad de la zona conurbada de Toluca, obtenidos mediante venopunción (yugular o cefálica).

Eritrocitos de cerdo

6.2 Material de laboratorio

Tubos vacutte o minicollect-suero

Jeringas de 3 ml

Jeringas de 10 ml

Tubos de centrifugado de 50 ml

Tubos de centrifugado de 15 ml

Tubos de ensayo

Viales de 1.5 ml

Puntas de micro pipeta 10-100 μ l

Puntas de micro pipeta 100-1000 μ l

Micro placas de titulación con fondo en v

Probeta

Matraz

Papel aluminio

Guantes de nitrilo

Bata de laboratorio

Gradilla

Kits de diagnóstico rápido para detección de anticuerpos PVC ab de Anigen, de la marca BIONOTE

Kit de DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475)

6.3 Equipo

Centrifuga de temperatura ajustable

Micro centrifuga

Refrigerador (4°C)

Congelador (-20°C)

Vortex

Gradilla

Micro pipeta (10-100 µl)

Pipeta multicanal (50 µl)

Cámara de lectura

Baño seco

6.4 Reactivos

PBS pH 7

Albumina sérica bovina al 0.1%

Alsever

7. MÉTODO

7.1 Diseño del estudio y muestreo

Este trabajo fue considerado una investigación exploratoria, y los datos son presentados como un estudio piloto.

El tipo de muestreo fue no probabilístico, la selección de los individuos fue por oportunidad considerando con un mínimo de 100 muestras en un periodo de seis meses (Agosto del 2015- enero 2016).

La aprobación de un comité de ética no es necesaria para estudios de casos clínicos debido a que el muestreo y recolección de muestras son realizados para procedimientos estándares (Sundaran *et al.*, 2015)

Previamente a la selección a todos los perros que fueron candidatos para el estudio se les realizó un examen físico general previo a la toma de muestra para determinar cuál era su estado de salud, si el perro mostró signo clínico alguno de enfermedad, este automáticamente fue descartado para ser muestreado. Se obtuvieron datos necesarios para el proyecto de todos los perros que fue incluido en el estudio, los cuales fueron contenidos en un formulario (anexo 1).

Posteriormente, de cada perro seleccionado se obtuvo 3 ml de sangre mediante venopunción (yugular o cefálica) y fueron colectados en tubos vacutte o minicollect-de suero, se centrifugaron a 3400 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero en viales de 1.5 ml estériles y fueron etiquetados con el ID asignado para el proyecto. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta que se realizaron las pruebas.

7.2 Valoración de los métodos utilizados para identificación de títulos de anticuerpos contra PVC-2

Para la determinar cuál era la técnica con más sensibilidad y especificidad para medir títulos IgG contra PVC-2 fueron analizadas por cuadros de contingencia las técnicas de inmunocromatografía y ELISA usando como prueba de referencia a la

inhibición de la hemoaglutinación, para esto 20 perros que previamente fueron sometidos a un examen físico general fueron muestreados. Las muestras fueron centrifugadas y el suero fue separado. Cada muestra fue dividida en tres alícuotas y procesadas por inmunocromatografía, inhibición de la hemoaglutinación y ELISA.

Para determinar si existe significancia estadística entre cada técnica serán analizadas a través de la prueba de χ^2 utilizando la siguiente fórmula:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(O-E)^2}{E} \right]$$

Dónde:

O: es el número observado

E: es el número esperado

La probabilidad asociada al valor de χ^2 cuadrado se obtendrá de las tablas de R.A. Fisher.

Se utilizó un análisis de Kappa de Cohen para determinar la concordancia entre las HI e inmunocromatografía y HI y ELISA

7.3 Inhibición de la hemoaglutinación (HI)

1. inactivación del suero, para la inactivación se debe preparar una dilución 1:10, esta solución se colocará en baño seco a 56°C por 30 minutos
2. adsorción con eritrocitos puros de cerdo 1:1, dejar reposar 2 horas a temperatura de laboratorio
3. centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos
4. preparar antígeno para HI
5. colocar antígeno en todos los pocillos, menos en la hilera de control de eritrocitos
6. recuperar 25 μ l del suero y colocarlo en un pocillo de la placa, mezclar 10 veces, pasar al siguiente pocillo y mezclar por 6 veces, repetir hasta

terminar hilera y desechar los 25 µl sobrantes, dejar reposar por una hora a temperatura de laboratorio

7. agregar 50µl de eritrocitos al 1%
8. refrigerar a 4°C, leer placa cuando el control eritrocitos este marcado (2 horas aproximadamente) (Carmichael *et. al*, 1979)

El título de HI fue indicado como la mayor dilución del suero que inhibe la hemoaglutinación completamente. Esta prueba fue realizada en microplacas de 96 pocillos con fondo en v.

7.4 Inmunocromatografía

Para la detección de anticuerpos se utilizaron pruebas rápidas de diagnóstico de PVC ab de Anigen, de la marca BIONOTE, la cual consiste en un inmunoensayo de cromatografía en fase sólida para la detección semi-cuantitativa de anticuerpos IgG para el parvovirus canino en suero, plasma o sangre completa. Para la realización de esta prueba, se siguieron las instrucciones del fabricante (anexo 2)

7.5 ELISA

Se utilizó el kit de DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475), El principio del kit de prueba PVC se basa en la detección de anticuerpos contra el virus de Parvo. El virus Parvo está unido a la fase sólida mediante el uso de un anticuerpo monoclonal. Después de la unión de los sueros de antígeno (virus Parvo) que contiene anticuerpos son capaces de reaccionar con el antígeno. Después de la reacción antígeno/anticuerpo, los anticuerpos unidos pueden ser detectados mediante el uso de un conjugado policlonal. Para realización de esta prueba, se siguieron las instrucciones del fabricante (anexo 3).

7.6 Determinación de los títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 en perros de la zona conurbada de Toluca

Durante el periodo que se llevó a cabo este estudio (agosto 2015- febrero 2016) 222 muestras de sangre fueron obtenidos de perros muestreados en la zona conurbada de Toluca, estas muestras fueron procesadas para la detección de anticuerpos contra PVC-2. Los perros fueron divididos en dos grupos, el grupo A contenía a los perros con menos de 10 semanas de edad, mientras que el grupo B está representado por los perros mayores a 10 semanas de edad. Las 222 muestras fueron centrifugadas, el suero fue separado y almacenado a -20 ° C hasta su procesamiento.

7.8 Procesamiento de los datos

7.8.1 Valoración de los métodos utilizados para identificación de títulos de anticuerpos contra PVC-2

Por cuadros de contingencia se determinó la sensibilidad y especificidad de las técnicas de ELISA e inmunocromatografía utilizando como prueba de referencia Inhibición de la hemoaglutinación.

7.8.2 Determinación de los títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 en perros de la zona conurbada de Toluca

Debido a que de las técnicas analizadas para la determinación de anticuerpos (HI, ELISA e inmunocromatografía) la que mayor sensibilidad y especificidad tuvo fue HI, esta técnica fue la utilizada para la determinación de títulos de IgG contra PCV-2 en la población de los perros que fueron muestreados.

7.8.3 Análisis de datos

Una vez obtenidos resultados de los títulos de IgG contra PCV-2 en la población de los perros seleccionada, se obtendrán la frecuencia absoluta y relativa mediante las siguientes formulas:

Frecuencia absoluta:

La suma de las frecuencias absolutas es igual al número total de datos por N

$$f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_n = N$$

Equivalente a:

$$\sum_{i=1}^{1n} f_i = N$$

Frecuencia relativa

El resultado de dividir la frecuencia absoluta de un determinado valor entre el número total de datos, se representa por n_i

$$n_i = \frac{f_i}{N}$$

Dónde:

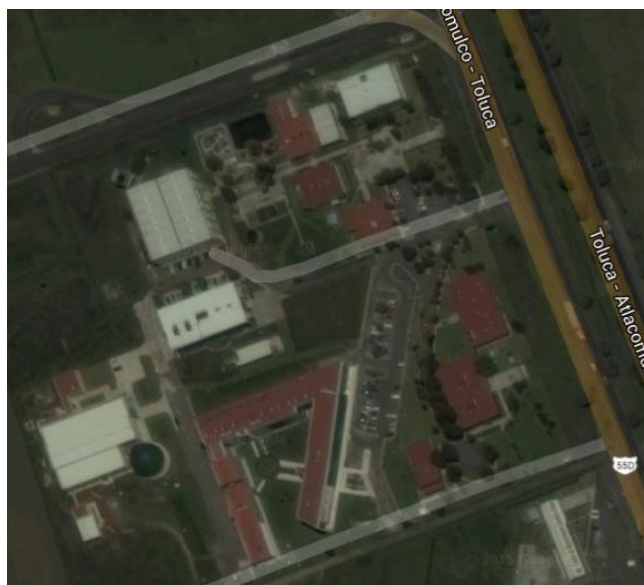
n_i : Frecuencia relativa

f_i : Frecuencia acumulada

N : Número total de datos

8. LÍMITE DE ESPACIO

El presente estudio se realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México. Que se localiza en el Km 15.5 de la carretera Toluca- Atlacomulco, perteneciente a la ciudad de Toluca, en el estado de México, México.



Las muestras fueron obtenidas de distintos propietarios de diferentes municipios del estado de México, del centro de control animal de Toluca y un criadero del estado de México.

9. LÍMITE DE TIEMPO

ACTIVIDADES	MES													
	2015												2016	
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2		
Elaboración del protocolo	■	■	■	■	■	■								
Aprobación del protocolo							■	■	■	■				
Valoración de las técnicas utilizadas para la detección de anticuerpos							■	■	■	■				
Recolección de muestras y elaboración del ensayo de la cinética de títulos de anticuerpos producidos por vacunación						■	■	■	■					
Análisis de los títulos de anticuerpos en las diferentes poblaciones de perros						■	■	■	■					
Análisis de resultados												■	■	
Redacción de tesis												■	■	

10. RESULTADOS

10.1 Análisis de la factibilidad de pruebas

Se determinó la factibilidad de los paquetes (kits) comerciales que se utilizaron para determinar los títulos de anticuerpos contra PVC-2. Para esto, 20 sueros fueron analizados a través de Anigen Rapid CPV Ab test Kit 2.0 (inmunocromatografía) y PRG[®] Canine Parvo Virus IgG ELISA EIA-2475 (ELISA), los datos obtenidos de ambos paquetes fueron comparados con los obtenidos por HI (técnica utilizada como prueba de oro). La sensibilidad clínica en las diferentes técnicas se estableció bajo el parámetro de detección de presencia o ausencia de anticuerpos, por lo tanto los resultados fueron registrados como positivos o negativos. El corte indicado para HI establece que un título $\geq 1:16$ indica la presencia de anticuerpos (en este caso las muestras son positivas), en el caso de inmunocromatografía el corte es $>1:40$ mientras que para la ELISA las instrucciones del fabricante indican que un valor > 90 indica la presencia de anticuerpos.

Por lo tanto, los datos obtenidos en esta parte del estudio indicaron que la inmunocromatografía tuvo una sensibilidad clínica del 100%, mientras que el kit de ELISA mostró una sensibilidad del 30%, con lo que se refiere a la especificidad fue de 100% en ambas técnicas (figura 3).

		HI	
		+	-
inmunocromatografía	+	20	0
	-	0	1

Sensibilidad: 100%
Especificidad: 100%

		HI	
		+	-
ELISA	+	6	0
	-	14	1

Sensibilidad: 30%
Especificidad: 100%

Figura 3. Cuadros de contingencia, la sensibilidad clínica entre las técnicas de inmunocromatografía y ELISA fueron comparadas utilizando como prueba de referencia Inhibición de la hemoaglutinación (HI).

El análisis de concordancias entre los resultados de las diferentes técnicas para la detección de presencia o ausencia de anticuerpos fue determinado por un análisis de Kappa, donde IC y HI presentaron un valor de 0.0519, encontrando mayor concordancia de la que se espera por azar, por lo tanto es considerado un valor de acuerdo moderado, mientras que entre las técnicas ELISA y HI el nivel de concordancia fue de 0.00, lo cual indica que el nivel de acuerdo entre ambas técnicas es nulo (Tabla 1). Para determinar si con estos datos se puede inferir que la validez de los resultados depende de la técnica utilizada se calculó la X^2 el valor fue de 31.58 resultando mayor al valor X^2 de la tabla, indicando que los resultados de la detección de anticuerpos dependerán de la técnica que sea utilizada (Tabla 2).

Otros parámetros, tales como el tiempo de procesamiento de cada muestra, capacitación necesaria para su realización, el equipo y reactivos requeridos, número de muestras que pueden ser analizadas por prueba, así como su costo y disponibilidad fueron analizadas para poder determinar la factibilidad de las tres técnicas, mostrando una factibilidad del 87.5%, 62.5% y 50% para HI, Inmunocromatografía y ELISA respectivamente (Tabla 3). Así mismo fueron analizadas la precisión y la exactitud de las técnicas dando como resultado una exactitud y precisión del 100% en la inmunocromatografía, mientras que en el caso de ELISA se observó una precisión del 60% y una exactitud del 61.7%

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

Tabla 1. Análisis de la concordancia entre las titulaciones de anticuerpos IgG

Clave	Paciente	IC	HI	ELISA
M1	Poli	< 1: 40 ^{NP}	1:32 ^{NP}	1:30 ^{NP}
M2	Poli	< 1: 40	1:32	1:30
M3	Poli	1:80 ^{NP}	1 :256 ^P	1:30
M4	Mera	1:80	1 :256	1:30
M5	Taq	1:80	1 :4096 ^P	1:30
M6	Poli	1:80	1 :4096	1:30
M7	Mera	1:80	1 :4096	1:30
M8	Taq	>1:160 ^P	1 :4096	1:30
M9	Poli	>1:160	1 :4096	1:30
M10	Mera	>1:160	1 :4096	1:30
M11	Juni	>1:160	1 :1024 ^P	1:90 ^{NP}
M12	1	<1:40	1 :32	1 :30
M13	Vaqui	>1:160	1 :256	1 :270 ^{NP}
M14	5	<1:40	1 :32	1 :30
M15	Choco	>1:160	1: 4096	1: 90
M16	Lula	<1:40	1 :32	1 :30
M17	7	>1:160	1: 256	1 :90
M18	Henry	>1:160	1 :1024	1 :90
M19	6	>1:160	1 :256	1: 90
M20	Cumbia 2	<1:40	1:32	1 :30

protectores y no protectores contra PVC-2 utilizando técnicas IC, HI y ELISA.

Valor de análisis de Kappa entre HI e IC: 0.519, grado de acuerdo: moderado

Valor de análisis de Kappa entre HI y ELISA: 0.000, no existe grado de acuerdo

P: anticuerpos protectores contra PVC-2

NP: anticuerpos no protectores contra PVC-2

IC: inmunocromatografía

HI: inhibición de la hemoaglutinación

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

Tabla 2. Análisis de las técnicas de IC, ELISA y HI para determinar su capacidad de detección de anticuerpos IgG contra PVC-2.

	Muestras analizadas por Inmunocromatografía	Muestras analizadas por ELISA	Muestras Analizadas por HI
Ausencia de Anticuerpos	1	15	1
Presencia de Anticuerpos	20	6	20
Total	21	21	21

Valor significativo de P: <0.0001, Grado de libertad V: 2

X² tabla: 5.9; X² calculada: 31.58

X² tabla < X² calculada

Tabla 3. Características cualitativas de las técnicas de HI, IC y ELISA en su utilización para la detección de anticuerpos IgG contra PVC-2

Características	HI	inmunocromatografía	ELISA
Tiempo de procesamiento	+	+++	++
Capacitación necesaria para su realización	++	+++	++
Equipo necesario	++	+++	+
Reactivos necesarios	++	+++	++
muestras analizadas por prueba	+++	+	+++
Precio de la prueba	+++	+	+
Disponibilidad	+++	+	+
Sensibilidad	+++	+++	+

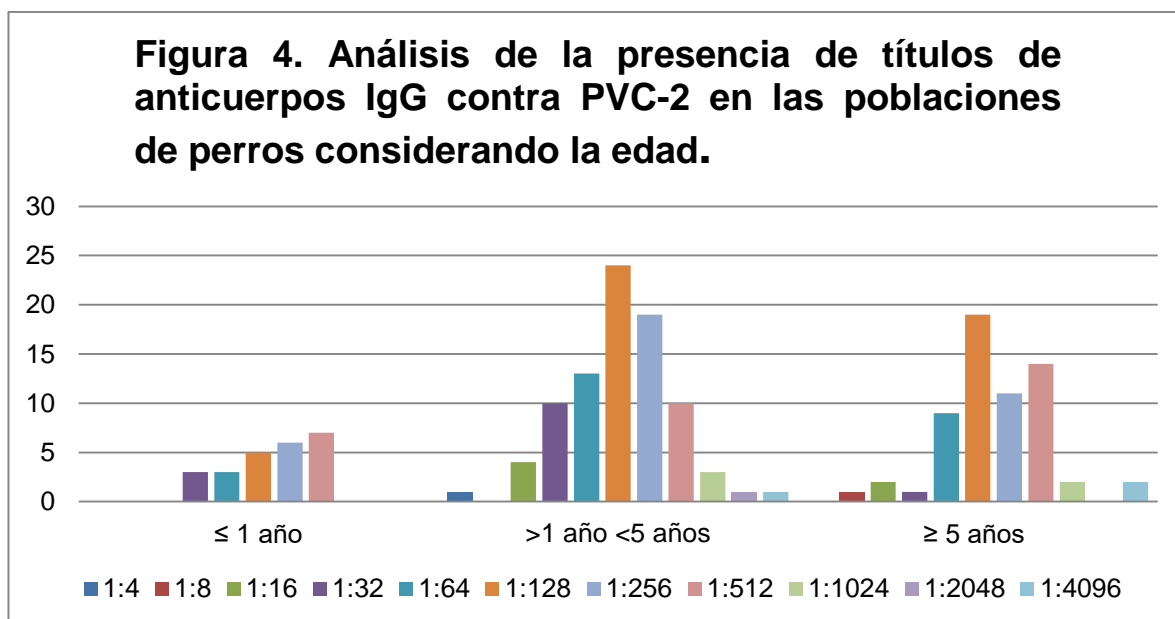
Dónde: + No deseable, ++ deseable, +++ Altamente deseable.

10.2 Titulación de anticuerpos IgG contra PVC-2 en los perros muestreados

En este apartado del estudio 222 perros fueron analizados, 52 perros (23.4%) se incluyeron en el grupo A, debido a que eran cachorros de 6 semanas de edad, mientras 170 (76.6%) estuvieron en el grupo B porque eran mayores de 6 semanas de edad.

Sobre su origen de procedencia los perros de ambos grupos se obtuvieron en el centro de bienestar animal, criaderos y casas de Toluca, distribuidos en los siguientes porcentajes respectivamente, el 38.2%, 27.4% y 34.2%.

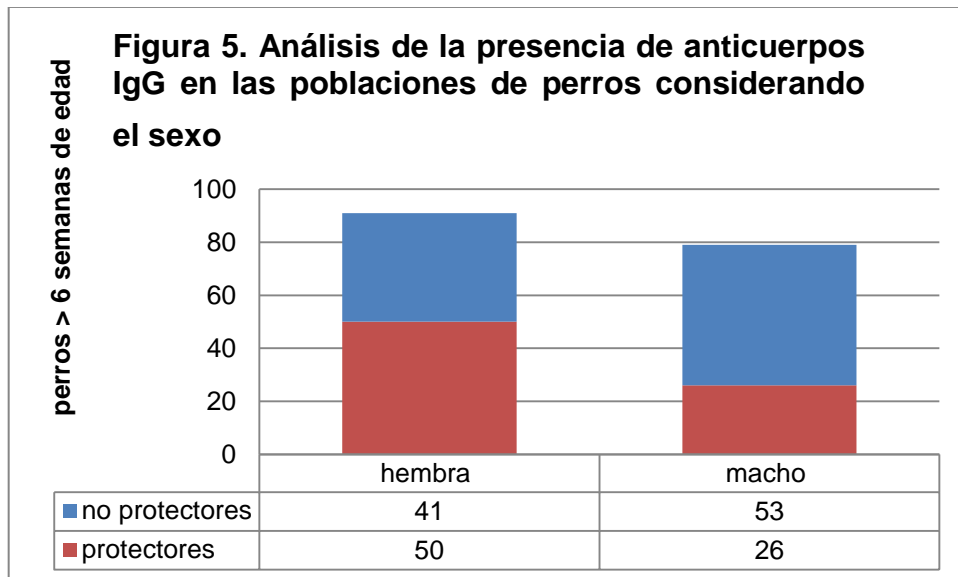
En relación a la población del grupo A, el 90.4% presentó títulos de anticuerpos $<1:256$ y solo el 9.6% $\geq 1:256$. El 53.8% y el 46.1% son machos y hembras respectivamente, solo el 7.1% de los machos tienen títulos $\geq 1:256$, mientras que el 9.3% de las hembras tienen títulos $\geq 1:256$. La mediana del grupo A fue de 1:96



En el caso del grupo B, de acuerdo a la edad los perros se distribuyeron de la siguiente porcentajes, el 13.5% de la población fueron cachorros menores de 1 año de edad, el 50.5% fueron perros mayores de un año y menores de 5 años de edad, mientras que el 35.8% fueron perros mayores a 5 años de edad (Figura 4).

Con relación a los títulos de anticuerpos IgG identificados en este grupo; 1:4, 1:8 y 1:2048 cada uno de estos estuvo presente en un 0.58%, el título 1:1:4096 en un 1.76%, 1:1024 en 2.9%, los títulos 1:16 y 1:32 están representados en un 3.5% y 8.2% respectivamente, 1:64 corresponde a 14.1%, la titulación 1:512 está representada por un 18.23%, mientras que el 21.1% corresponden a la titulación 1:256 y por último la titulación 1:128. Esta población solo el 44.7% de presento títulos de anticuerpos \geq 1:256, con una mediana de 1:128.

Con respecto al sexo el 53.5% y el 46.4% de la población son hembras y machos respectivamente, el 54.96% de las hembras tienen títulos \geq 1:256, mientras que el 32.91% de los machos tienen títulos \geq 1:256 (Figura 5).



11. DISCUSIÓN

La titulación de anticuerpos IgG contra PVC-2 es importante porque nos permite por ejemplo determinar en cachorros ADM que son útiles para establecer el momento de la vacunación, en perros adultos para determinar si la población está o no protegida contra la enfermedad o si los perros han sido recientemente infectados. Actualmente existen diferentes productos comerciales para realizar la titulación de estos anticuerpo; sin embargo en nuestro país no son ampliamente utilizados por lo tanto no existen datos de la factibilidad de su uso. En este estudio se analizaron dos kits comerciales para determinar si estos tienen una factibilidad apropiada para ser utilizados cotidianamente tanto en laboratorios como en clínicas para la titulación de anticuerpos contra parvovirus canino. Nuestro análisis indica que aunque el kit (Anigen Rapid CPV Ab test Kit 2.0) tiene una sensibilidad y especificidad del 100%; analizando otros parámetros tienen una factibilidad del 62%, la mayor desventaja que observamos en este producto es que no se encuentra disponible en el país y es necesaria su importación, lo cual podría incrementar sus costos, aunado a esto la interpretación de los resultados de esta técnica llegan a ser subjetivos (ver anexo 2). Por lo tanto dados los resultados obtenidos en este trabajo se recomienda que la técnica que es más factible de utilizar para este tipo de análisis sea la HI, aunque no está disponible comercialmente y se requiere de cierta infraestructura tiene parámetros de factibilidad más apropiados para su realización y reproducibilidad. En éste estudio se determinó que los títulos protectores contra PVC-2 son $\geq 1:256$, ya que en estudios anteriores (Taguchi *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2014) se mostró que esta titulación tal vez no confiere protección contra la infección, pero ayudará a disminuir la severidad de la enfermedad, factor determinante en la mortalidad de esta.

La distribución de los grupos se determinó de acuerdo a los objetivos planteados; el grupo A estaba conformado por 52 cachorros de seis semanas de edad sin

ninguna vacunación previa al muestreo, porque en este grupo se determinó analizar la tasa de títulos de anticuerpos derivados maternos que tenían los cachorros previos a la vacunación. Los resultados obtenidos indican que el 90.4% de estos cachorros tuvieron títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 $<1:256$, con una mediana de 1:96. La literatura refiere que perro que tienen títulos $\geq 1:256$ se encuentran protegidos contra la enfermedad, mostrando así que un alto porcentaje de la población analizada se presentaba un alto riesgo de infección al momento de hacer el muestreo. En otros estudios se ha reportado que los rangos de ADM van de 1:32 a 1:1280 (Decaro *et al.*, 2005; Waner *et al.*, 1996; Mila *et al.*, 2014; Elia *et al.*, 2005), sin embargo en nuestro estudio se observó que solo el 9.6% de los cachorros tenía una titulación $\geq 1:256$, estos cachorros son provenientes de calle y el grado de exposición ante cualquier agente infeccioso es mayor, y determinó que la titulación elevada se debe a una infección reciente, ya que esta titulación se ha observado en perros que han sufrido una infección. (Elia *et al.*, 2005; Decaro *et al.*, 2005).

Los títulos identificados en los cachorros de este grupo si bien no son considerados protectores, si son interferentes para los procesos de vacunación, por lo tanto es importante realizar estudios de titulación de anticuerpos antes de la primera vacunación, porque los cachorros de este grupo tenían seis semanas de edad y el 53.8% de estos tenían anticuerpos interferentes. De acuerdo a la guía para la vacunación de perros y gatos de WSAVA (the World Small Animal Veterinary Association) un cachorro de seis semanas de edad podría iniciar su calendario de vacunación (Day *et al.*, 2016), esta práctica es común en nuestro país, sin embargo, como lo señala este estudio la mayoría de los cachorros analizados no están aptos para iniciar la vacunación, de acuerdo a diferentes reporte la titulación adecuada para iniciar el calendario de vacunación es de $<1:32$ (Taguchi *et al.*, 2012). Aun cuando existen vacunas con alta masa antigénica, recomendadas para aplicarse en cachorros de menos de seis semanas de edad con la finalidad de interferencia por ADM, algunos estudios han demostrado que

estas vacunas no logran evitar dicha interferencia (Gómez y Guida, 2010), “es decir, que si un cachorro es vacunado a las seis semanas de edad, sin haber realizado la titulación de anticuerpos, aun utilizando una vacuna con alta masa antigénica es muy probable que se produzca interferencia por ADM, lo cual producirá una disminución de los anticuerpos circulantes y pondrá al cachorro en mayor riesgo ante una infección, produciendo así la mayor causa de falla vacunal”(Pollock y Carmichael, 1982; Castro, 1985; Day *et al.*, 2016).por lo tanto es necesaria la realización de técnicas de detección de anticuerpos que nos permitan determinar la tasa de títulos de los mismos y así establecer el momento idóneo para el inicio del esquema de vacunación, así como los subsecuentes refuerzos de la misma para lograr una inmunidad apropiada.

Para determinar si una población de perros que ha tenido contacto tanto con virus vacuna como con virus de campo posee títulos de anticuerpos protectores se analizaron 170 muestras de perros mayores de 6 semanas de edad pertenecientes al grupo B, ya que un estudio realizado por Schultz *et al.*, 2010 determinó que si mínimo el 50% de la población canina tienen títulos protectores contra la enfermedad, podremos tener un mejor control de la misma y así poder lograr su erradicación.

Sin embargo la literatura es confusa sobre que títulos se refieren a anticuerpos protectores, algunos autores indica que títulos de 1:64 son protectores contra la infección, mientras que algunos estudios han concluido que perros con títulos de 1:320 no son protectores y los perros se pueden infectar, incluso podrían cursar con cuadros atípicos de la enfermedad. (Wilson *et al.*, 2014; 2011; Elia *et al.*, 2005)

Mientras que, otros autores indican que títulos $>1:320$ son protectores contra la enfermedad (Pratelli *et al.*, 2001), el cuál evitara un cuadro típico de parvovirus canino. Tomando este parámetro como referencia en este estudio se determinó que la tasa de títulos de anticuerpos protectores son $\geq 1:256$. Por lo tanto se

observó que en los perros provenientes de casa, el 72.% tuvieron anticuerpos protectores, así como el 51.5% de los perros de calle, y contrario a lo que se pensaba, en último lugar están los perros de criadero con un 18.0%, en el caso de los perros que provienen de criaderos se puede asociar que al estar vacunando constantemente sin la previa titulación de anticuerpos se está produciendo el mismo fenómeno que ocurre en cachorros con ADM, si los anticuerpo circulantes son mayores a 1:64 al momento de la vacunación producirán un efecto de interferencia y no permitirán una buena respuesta vacunal al momento de la revacunación. En el caso de los perros que provenían de casa o de la calle, al haber sido inmunizados, ya sea por medio de vacuna o por virus de campo muchos de ellos no reciben una dosis de revacunación, o los periodos son muy largos, por lo tanto esto favorece a una mejor inmunización lo cual permite que la tasa de títulos de anticuerpos sea más elevada. En un estudio realizado por Riedl *et al.*, 2015 donde buscaron la prevalencia de anticuerpos en perros sanos provenientes de casas, determinaron que el 86% de su población tiene títulos protectores contra PVC-2, pero ellos consideraron como títulos protectores $>1:80$, titulación por debajo de la que se estableció como protector en este estudio, en un estudio similar, pero realizado en perros provenientes de calle que eran resguardados en refugios, se determinó que el 64.5% de los perro no tenían anticuerpos protectores contra PVC-2, pero del mismo modo que en el estudio realizado por Riedl *et al.*, 2015 su corte de anticuerpos protectores fue de $>1:80$, lo cual podría indicar que el porcentaje de perros con anticuerpos protectores es más bajo.

En general de los 222 muestras analizadas solo el 36.4% presentaron una tasa de título de anticuerpos $\geq 1:256$, en un estudio realizado por Lechner *et al.*, en el 2010 demostró que el 31.5% de la población poseía títulos de anticuerpos protectores contra PVC-2, así mismo en un estudio parecido Litster *et al.*, en el 2012 mostro un 84.3% de perros con anticuerpos protectores, sin embargo su corte de títulos protectores es de 1:80 en ambos estudios, debido a que no existe un acuerdo para

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

establecer cuáles son los títulos que se deben considerar protectores y bajo qué condiciones.

12. CONCLUSIÓN

El 36.4% de la población canina analizada tiene títulos de anticuerpos protectores contra PVC-2.

El porcentaje de perros que tienen títulos protectores contra PVC-2 en el grupo A fue de 9.6.

La inmunocromatografía es una técnica eficiente para la detección de anticuerpos, pero tiene la debilidad en la interpretación ya que esta se basa en la vista y el resultado puede ser subjetivo, como mostraron nuestros resultados. Por lo tanto actualmente sigue siendo mejor utilizar la técnica de HI debido a su costo, tiempo de realización y número de muestras que pueden ser analizadas por placa.

La mayoría de los perros de 6 semanas de edad inician sus calendarios de vacunación con títulos de anticuerpos interferentes.

13. SUGERENCIAS

Si bien este es un estudio piloto, los hallazgos encontrados proporcionan un punto de partida para estudios que aún no han sido realizados sobre una de las enfermedades en perros más importantes en México. Es conveniente realizar estudios con mayor número de perros y más pruebas que nos permitan hacer un análisis más detallado del comportamiento de los anticuerpos en poblaciones de perros.

14. LITERATURA CITADA

1. Acosta_Jamett G, Surot D, Cortes M, Marambio V, Valenzuela C (2015): Epidemiology of canine distemper and canine parvovirus in domestic dogs in urban and rural areas of the Araucanía region in Chile. *Veterinary Microbiology*. 178:260-264
2. Agbandje M, Parrish C, Rossmann M (1995): The structure of parvoviruses. *Virology*. 6:299-309.
3. Aguilar M (2014): Análisis de la sensibilidad de métodos diagnósticos comúnmente utilizados en hospitales veterinarios para el diagnóstico de parvovirus canino. Tesis de maestría. FMVZ Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México
4. Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE. (1979): Isolation and immunization studies of canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis. *The veterinary record*. 25:156-159.
5. Ariza-Pinzon S. (2003): Correlation between ELISA and latex agglutination tests for diagnosis of canine parvovirus.
6. Babalola ET, Ijaopo OK, Okonko IO. (2016): evaluation of immunity and seropositivity of IgG antibodies to canine parvovirus in vaccinated and unvaccinated dogs in Abeokuta, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*. 37(1): 16-28.
7. Basurto FJ, Marin J. (2003): Diplomado a distancia en medicina, cirugía y zootecnia en perros y gatos. Sexta edición. UNAM, México p.151-161
8. Blanco M, Orden J, Cutuli M, Gilbello A, Dominguez G, Domenech A, Gómez E, Miro G, Simarro (2013): Inmunología de enfermedades infecciosas del perro y gato. 1 edición. ULZAMA. España
9. Blount D, Pritchard D, Heaton P. (2005): Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*. 108:399-407
10. Böhm M, Thompson H, Weir A, Hasted AM, Maxwell NS, Herrtage ME. (2004): Serum antibody titres to canine parvovirus, adenovirus and distemper

virus in dogs in the UK which had not been vaccinated for at least three years. Veterinary record. 154:457-463

11. Boosinger TR, Rebar AH, DeNicola DB & Boon GD (1982) Bone marrow alterations associated with canine parvoviral enteritis. Veterinary Pathology 19: 558-561.

12. Burtonboy S, Charlier P, Hertoghs J, Lobmann M, Wiseman A, Woods S. (1991): Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccines in pups with maternally derived antibody. Veterinary record. 128:377-381

13. Carman PS, Povey RC. (1985): Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery. Research in Veterinary science. 38:134-140

14. Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH. (1979): Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. Am J Vet Res. 41 (5):784-791

15. Castro T, Cassia R, Garcia N, Goncalves L, Costa E, Marcello G, Labarthe N, Mendes-de-Almeida F (2013): Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. Can Vet J. 54: 885-888

16. Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe NV, Cubel Garcia RCN. (2011): Monitoring of canine parvovirus (PER) strain detected in vaccinated puppies in Brazil. Research in Veterinary Science. 90: 336-340

17. Chappuis G. (1998): Neonatal immunity and immunisation in early age: lessons from veterinary medicine. Vaccine 16 (13): 1468-1472

18. Cote E (2007): el consultor en la clínica veterinaria perros y gatos vol. 1 Sevier, Argentina

19. Cotmore S. (2014): The family *Parvoviridae*. Arch Virol. 159(5):1239-1247

20. Day M (1999): Clinical immunology of the dog and cat. 1ª edición. Press/Manson. Iowa state University

21. Day M, Horzinek M, Schultz R, Squires R. (2016): Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Journal of small animal practice. 57:1-57

22. Day M. (2006): Vaccine side effects: fact and fiction. *Veterinary microbiology*. 117:51-58.
23. De Cramer KGM, Stylianides E, van Vuuren M. (2011): Efficacy of vaccination at 4 and 6 weeks in the control of canine parvovirus. *Veterinary microbiology*. 149:126-132
24. Decaro N, Buonavoglia C. (2012): Canine parvovirus- A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*. 155: 1-12
25. Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, Buonavoglia C. (2005): Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*. 33: 261-267
26. Decaro N, Crescenzo G, Desario C, Cavalli A, Iosurdo M, Colaianni ML, Ventrella G, Rizzi S, Aulicino S, Lucete MS, Buonavoglia C. (2014): Long- term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine*. 32:3850-3853
27. Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, Lorusso E, Buonavoglia C. (2005): Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu.426 mutant. *J Vet Diagn Invest*. 17:133-138.
28. Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, Martella V, Buonavoglia C. (2007): Occurrence of severe gastroenteritis in pups after canine parvovirus vaccine administration: a clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 25: 1161-1166
29. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. (2008): Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New microbiological*. 31:125-130
30. Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, Martella V, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia C. (2005): Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus. *Journal of virological method*. 126:179-185

31. Doupovec M (2010): Conceptos básicos de la metodología de la investigación (26 de octubre del 2015).
32. Elia G, Cavalli A, Cirone F, Lorusso E, Camero M, Buonavoglia D, Tempesta M. (2005): Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J vet med.* 52:320-322
33. Flores R (1987): Parvovirus y aspectos de inmunización. *Ciencias veterinarias* 4: 131- 159
34. Goddard A, Leisewitz A. (2010): Canine parvovirus. *Vet clin small anim.* 40: 1041-1053
35. Gómez N, Guida N. (2010): Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. 1ª edición., Intemedica. Buenos Aires Argentina.
36. Gray L, Crawford P, Lecy J, Dubovi E. (2012): Comparison of two assays for detection of antibodies against canine parvovirus and canine distemper virus in dogs admitted to a Florida animal shelter. *J Am Vet Med Assoc.* 240(9):1084-1097
37. Greene C (2012): *infectious diseases of the dog and cat.* 4ª ed., Elsevier: EUA
38. Gutierrez J (2010): *Inmunología veterinaria.* 1ª ed., Manual moderno, México.
39. Hoelzer K, Parrish C, (2010): the emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res.* 41:39-52
40. Hoelzer K, Parrish C. (2010): The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.* 41(6):39-51.
41. Hueffer K, Parrish C. (2003): Parvovirus Host range, cell tropism and evolution. *Current opinion in microbiology.* 6:392-398
42. Jubb, Kennedy and Palmer's. (1985): *Pathology of domestic animals.* 3er ed., Elsevier. Missouri.
43. Laam C, Rezabek G (2008): Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet clin small anim.* 38:837-850.

44. Lamm G, Rezabek G (2008): Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet clin small anim.* 38: 837-850
45. Lechner E, Crawford C, Levy K, Edinboro Ch, Duvobi E, Caliguri R. (2010): Prevalence of protective antibody titers for canine distemper virus and canine parvovirus in dogs entering a Florida animal shelter. *JAVMA.* 236 (12): 1317-1321
46. Lenghaus C, Studdert MJ, Finnie JW (1980): Acute and chronic canine parvovirus myocarditis following intrauterine inoculation. *Aust vet J.* 56(10):465-468.
47. Litster A, Pressler B, Dubovi. (2012): Accuracy of a point-of-care ELISA test kit for predicting the presence of protective canine parvovirus and canine distemper virus antibody concentrations in dogs. *The veterinary journal.* 193:363-366
48. MacLachlan N, Dubovi E (2011): *Fenner's veterinary virology.* 4^a ed., Elsevier. EUA
49. Marcovich J, Stucker K, Carr A, Harbison C, Scarlett J, Parrish C. (2012): Effects of canine parvovirus strain variation on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 241:66-72.
50. Martella V, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. (2005): Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med.* 52: 312-315
51. Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Lanieu ME Slauson DO. (1985): Pathogenesis of canine Parvovirus Enteritis: sequential Virus Distribution and passive immunization studies. *Vet. Pathol.* 22: 617-624.
52. Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Slauson DO. (1985): Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet. Pathol.* 22:60-71
53. Mila H, Grellet A, Desario C, Feugier A, Decaro N, Buonavoglia C, Chastant-Maillard S (2014): Protection against canine parvovirus type 2 in puppies by colostrum- derived antibodies. *Journal of nutritional science.* 54 (3): 1-4

54. Miranda C, Carvalheira, Parrish C, Thompson G (2015): Factors affecting the occurrence of canine parvovirus in dogs. *Veterinary Microbiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.08.002>
55. Mittal M, Chakravarti S, Mohapatra JK, Chug PK, Dubey R, Upmanyu V, Narwak PS, Kumar A, Churamani CP, Kanward NS (2014): Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kekkel in India reveals the possibility of vaccination failure. *Infection, genetics and evolution*. 23:1-6.
56. Moore G, Glickman L. (2004): A perspective on vaccine guidelines and titer tests for dogs. *JAVMA* 224(2): 200-203.
57. Nandi S, Kumar M. (2010): Canine parvovirus: current perspective. *Indian J. Virol* 21 (1): 31-44.
58. Nelson R, Couton G. (2010): *Medicina interna de pequeños animales*. 4ª ed., Elsevier, España
59. Ottiger, HP, Neimeier_Förster M, Stärk KDC, Duchow K, Bruckner L. (2006): Serological responses of adult dogs to revaccination against distemper, parvovirus and rabies. *Veterinary Record*. 159:7-12.
60. Parrish C. (1999): Host range relationship and the evolution of canine parvovirus. *Veterinary microbiology*. 69:29-40
61. Pedroza-Roldan C, Páez-Magallan V, Charles-Niño C, Elizondo-Quiroga D, Cervantes-Mireles R, López-Amezcuca M. (2015): Genotyping of canine parvovirus in western Mexico. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 27(1):107-111.
62. Pollock RV. (1982): Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell. Vet*. 72:103-119
63. Potgieter LND, Jones JB, Patton CS, Webb_Martin TA. (1981): Experimental parvovirus infection in dogs. *Can J Comp Med*. 45(3): 212-216.
64. Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N, Carmichael L, Buonavoglia C. (2001): Canine Parvovirus (CPV) Vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV-2 or CPV-2b

modified live virus vaccine. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 8(3):612-615.

65. Proksh AL, Unterer S, Speck S, Truyen U, Hartmann K. (2015): Influence of clinical and laboratory variables on faecal antigen ELISA results in dogs with canine parvovirus infection. *The Veterinary Journal*. 204: 304-308.

66. Quiros A (1989). *Inmunología del tracto digestivo*. *Bol pediátr*. 30: 259-265

67. Rice JB, Winters KA, Krakowka S, Olsen RG. (1982): Comparison of systemic and local immunity in dogs with canine parvovirus gastroenteritis. *Infection and immunity*. 38 (3): 1003-1009

68. Riedl M, Truyen U, Reese S, Hartmann K. (2015): Prevalence of antibodies to canine parvovirus and reaction to vaccination in client-owned healthy dogs. *Veterinary Record*. 177(23):597.

69. Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel HJ, Neiger R. (2009): Comparison of three rapid commercial canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 21:344-345.

70. Schultz ED. (1999): Duration of immunity to canine vaccines: what we know and don't know. www.ivis.org. Document No.P0117.0899. (15 de Enero Del 2016).

71. Schultz RD, Thiel B, Mukhtar E, Sharp P, Larson J. (2010): Age and long-term protective immunity in dogs and cats. *J comp Path*. 142:102-108

72. Selbitz H, Moos M (2006): *Vacunación de los animales domésticos*. 2ª ed., Acribia. Alemania.

73. Shashidhara Y, Kapil S (2009): Simple test for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies. *Clinical and vaccine immunology*. 16(1):127-131

74. Shashidhara YM y Sanjay Kapil (2009): Simple test for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus –epecific antibodies. *Clinical and vaccine immunology*. 16 (1):127-131

75. Sundaran S, Ambily R, Nair S, Mini M (2015): Utility if a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compares with polymerase chain reaction. *Veterinary World*. 8:523-526
76. Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Orito K, Lynch J, Sahara H. (2011): Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. *Can Vet J*. 52:983-986
77. Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Orito K, Lynch J, Tsuchiya R, Sahara H. (2012): Booster effect of canine distemper, canine parvovirus infection and infectious canine hepatitis combination vaccine in domesticated adult dogs. *Microbiol Immunol*. 56:579-582.
78. Truyen U. (2006): Evolution of canine parvovirus- A need for new vaccine?. *Veterinary microbiology*. 117:9-13
79. Twark L, Dodds J. (2000): Clinical use of serum parvovirus and distemper virus antibody titers for determining revaccination strategies in healthy dogs. *JAVMA*. 217 (7): 1021-1024.
80. Wilson S, Illambas J, Siedek E, Stirling C, Thomas A, Plevová E, Sture G, Salt J (2014): Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody response to CPV-2c. *Vaccine*. 32: 5420-5424

15. ANEXOS

Anexo 1. Formulario para obtención de datos de perros muestreados

FORMULARIO		
FECHA:		ID:
DOMICILIADO	CRIADERO	CALLE
NOMBRE:		
EDAD:	SEXO:	RAZA:
NO DE VACUNAS:	ALIMENTACIÓN:	
LOCALIDAD A LA QUE PERTENECE:		

Anexo 2.

ONE STEP IgG antibodies to Canine Parvovirus RAPID TEST

Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0

■ Explanation of the Test

Canine parvovirus (CPV) is the most important cause of viral gastroenteritis in dogs world-wide. The disease is characterized by severe enteritis and lymphopenia with high mortality especially in non-immune dogs. Antibody titers to CPV are important in the prediction of canine health and preparing vaccination programs. The hemagglutination-inhibition (HI) test has been the most commonly used serological assay for CPV antibody.

[Intended Use] Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0 is a solid phase immunochromatographic assay for the rapid, quantitative detection of IgG antibodies to parvovirus in canine serum, plasma or whole blood. This test is intended for professional use as an aid in presumptive diagnosis, and preparation of vaccination programs. This test provides only a preliminary test result. Therefore, other tests like hemagglutination-inhibition test or serum neutralization test, or more specific alternative diagnosis methods must be used in order to obtain a confirmation of immune status.

[Principle] Anigen Rapid Ab Test Kit 2.0 is designed to detect IgG antibodies to CPV in serum, plasma or whole blood.

Anigen Rapid CPV Ab Test Kit 2.0 has a letter of "T" as test line and "C" as control line on the surface of the device. The test line and the control line in result window are not visible before applying any samples. The "C" line is used for procedural control. Control line should always appear if the test procedure is performed properly and the test reagents of the control line is working. A purple "T" line will be visible in the result window if there are IgG antibodies to CPV in the sample. If IgG antibodies to CPV are not present in the sample, then no color appears in the "T" line.

When a specimen is added to the test, anti-CPV IgG in the specimen sample reacts with purified CPV antigen, and then reacts with monoclonal anti-CPV (conjugated gold) and forms a complex of antibodies and colloidal gold conjugates.

As this mixture migrates along the length of the test kit by capillary action, the anti-CPV IgG complex is captured by the relevant anti-canine IgG, immobilized in the test line across the test kit and generates a colored line.

■ Materials provided(10Tests/Kit)

- 1) Ten(10) Anigen Rapid CPV Ab Test 2.0 Devices
- 2) Ten(10) Bottle containing 1ml of assay diluents
- 3) Ten(10) Disposable capillary tubes for specimen
- 4) Ten(10) Anticoagulant bottles
- 5) Ten(10) Disposable droppers
- 6) One(1) Color scale (1-6) measurement
- 7) One(1) Instruction for use

■ Precautions

- 1) For best results, strict adherence to these instructions is required.
- 2) All specimens should be handled as being potentially infectious.
- 3) Do not open or remove test kits from their individually sealed pouches until immediately before their use.
- 4) Do not reuse test kit.
- 5) All reagents must be at room temperature before running the assay.
- 6) Do not use reagents beyond the stated expiration date marked on the package label.
- 7) The components in this kit have been quality control tested as standard batch unit. Do not mix components from different lot numbers.
- 8) The assay diluents contains low concentration of sodium azide as a preservative. Sodium azide is toxic and should be handled carefully to avoid ingestion and skin contact.

■ Storage and Stability

The kit can be stored at room temperature (2 ~ 30°C) or refrigerated. The test kit is stable through the expiration date marked on the package label. DO NOT FREEZE. Do not store the test kit in direct sunlight.

■ Specimen Collection and Preparation

- 1) Serum, plasma or whole blood samples should be used for this test.
- 2) Handle all blood products as capable of transmitting infectious diseases.
- 3) Whole blood samples should be used immediately, if possible or should be stored at 2 ~ 8°C up to 24 hours.
- 4) If serum or plasma specimens cannot be tested immediately, they should be refrigerated at 2 ~ 8°C up to 2 weeks. Freezed specimen at -20°C or below is available up to 1 year.
- 5) Specimens containing precipitate may yield inconsistent test results. Such specimens must be clarified prior to assaying.
- 6) The use of hemolytic, lipaemic, icteric or bacterially contaminated specimens should be avoided. Erroneous result may occur.

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

■ Procedure of the Test

- 1) Allow all kit components and specimen to reach room temperature prior to testing.
- 2) Collect 5 μ l of sample using capillary tube (point line), and then add the specimen into the diluent tube.

♣ A dark color score line on the capillary tube is the indicator line for 5 μ l.

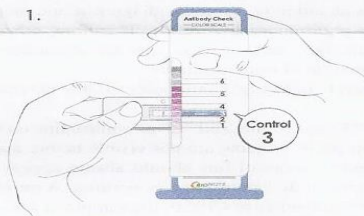


- 3) Remove the test kit from the foil pouch prior to use.
- 4) Using the disposable dropper provided, take the samples from the mixed assay diluent in the tube.
- 5) Add four (4) drops into the sample hole using the disposable dropper slowly drop by drop.
- 6) Interpret the test results at 10 minutes. Do not interpret after 20 minutes.

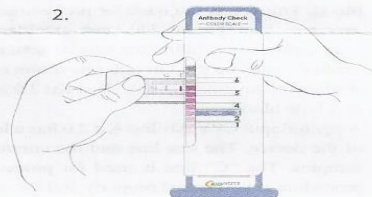
■ Use of color scale

- 1) Compare the color development on the control line with color scale and fix it to the scale 3.
- 2) Interpret the color intensity of the test line.

1.



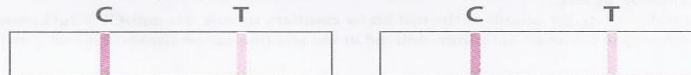
2.



■ Interpretation of the Result

- 1) **Low titer (Below 1:40 as HI titer)**

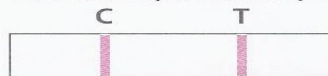
The color development of T line is weaker than that of C line. (Color scale 1-2)



***Antibody titer is low against CPV.

- 2) **Medium Titer (1:80 as HI titer)**

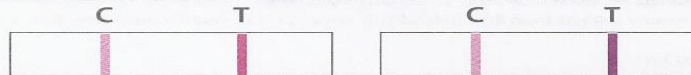
The T line has equal color development with C lines. (Color scale 3)



***Antibody titer is medium against CPV. This is indicative of a good immune status.

- 3) **High Titer (Above 1:160 as HI titer)**

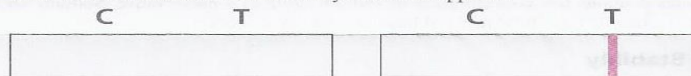
The color development of T line is higher or same with C line. (Color scale 4-6)



***Antibody titer is high against CPV. This is indicative of a good immune status.

- 4) **Retest**

Both lines are invisible or there is only a test line appears.



■ Limitation of the Test


- 1) This Test is for in-vitro diagnostic use only.
- 2) This test detects the presence of antibodies to CPV in the specimen and should not be used as the sole criterion for the diagnosis of CPV infection.
- 3) As with all diagnostic tests, all results must be considered with other clinical information available to the veterinarian.
- 4) For more accuracy of immune status, additional follow-up testing using other laboratory methods is recommended.

Doc. No. : I2151-00E
Issued date : Jul. 18, 2012



BioNote, Inc.
22 Samsung1ro 4-gil, Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-170, Republic of Korea
TEL: 82-31-211-0516 | FAX: 82-31-8003-0618 | www.bionote.co.kr

Anexo 3.

DRG 

DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475)

Revised 21 June 2012 rm (Ver. 10.1) **For Veterinary Use Only**

This kit is intended for Research Use Only.

Not for use in diagnostic procedures.

Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.

1 INTRODUCTION

For diagnosis of Canine Parvo Virus (CPV) infection or vaccination control, demonstration of antibody titer is the most commonly used method. The virus is attached to the solid phase by use of monoclonal antibodies catches antibodies induced through infection or vaccination.

IgG antibody titers above a dilution of 1:810 are considered protected.

2 INTENDED USE OF THE TESTKIT

The principle of the CPV test kit is based on the detection of antibodies against Parvo virus. The Parvo virus is attached to the solid phase by use of a monoclonal antibody. After the attachment of the antigen (Parvo virus) sera containing antibodies are able to react with the antigen. After the antigen/antibody reaction, the attached antibodies can be detected by use of a polyclonal conjugate.

3 PRINCIPLE OF THE TEST KIT

The test is based on the reaction of CPV proteins with dog antibodies. To this end CPV proteins have been coated to a 96-well microtiter plate.

The diluted dog serum/plasma sample is added to the wells of the coated plate.

After washing the bound dog antibodies are detected by a HRPO conjugated anti-species conjugate.

The colour reaction in the wells is directly related to the concentration of CPV antibodies in the serum/plasma sample.

4 CONTENTS

- 12 x 8 microtiter strips
- 1 x strip holder
- 1 x 11 ml Inactivated Canine Parvo Virus antigen
- 1 x 18 ml ELISA buffer
- 1 x 12 ml HRPO conjugate
- 1 x 0.5 ml Positive control (freeze dried)
- 1 x 1 ml Negative control (freeze dried)
- 1 x 20 ml Wash-solution (200 x concentrated), dilute in de-ionised water before use!
- 1 x 8 ml Substrate A
- 1 x 8 ml Substrate B
- 1 x 8 ml Stop-solution
- 1 x Plastic cover seal

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com 1

DRG



DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475)

Revised 21 June 2012 rm (Ver. 10.1)

For Veterinary Use Only

5 HANDLING AND STORAGE OF SPECIMENS.

The kit should be stored at +4°C.

An open packet should be used within 10 days.

Samples may be used fresh or may be kept frozen below -20°C before use.

Positive and negative controls may be stored after reconstitution in aliquots at -20°C and used until the expiry date.

Avoid repeated freezing and thawing as this increases non-specific reactivity.

6 WASH PROTOCOL

In ELISAs, un-complexed components must be removed efficiently between each incubation step. This is accomplished by appropriate washing. It should be stressed that each washing step must be carried out with care to guarantee reproducible inter- and intra-assay results. It is essential to follow the washing procedures outlined below. Washing may be done manually or with automatic equipment. Automatic washing equipment usually gives better results.

Manual washing

1. Empty each well by turning the microtiter plate upside down, followed by a firm vertical downward movement to remove the buffer.
2. Fill all the wells with 250 µl washing solution.
3. This washing cycle (1 and 2) should be carried out at least 4 times
4. Turn the plate upside down and empty the wells with a firm vertical movement
5. Place the inverted plate on absorbent paper towels and tap the plate firmly to remove any residual washing solution in the wells.
6. Take care that none of the wells dry out before the next reagent is dispensed

Washing with automatic equipment

When automatic plate washing equipment is used, check that all wells are aspirated completely and that the washing solution is correctly dispensed, reaching the rim of each well during each rinsing cycle. The washer should be programmed to execute at least 4 washing cycles.

7 TEST PROTOCOL

1. Open the packet of strips and take out the strips to be used (see 4). Cover the remaining strips with a part of the provided seal and store them at +4°C and use them within 10 days.
Wash the microtiter strip(s) with washing solution, according to washing protocol.
The washing solution provided must be diluted 200x in de-ionised water!
2. Reconstitute the positive control in 0.5 ml deionised water and negative control in 1 ml deionised water, store in aliquots at -20°C.
3. Dispense 100 µl of inactivated Canine Parvo Virus antigen to all wells to be used.

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com

2

DRG



DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475)

Revised 21 June 2012 rm (Ver. 10.1)

For Veterinary Use Only

4. Incubate 75 min. at 37°C.
5. Make 3-step dilutions of each sample in ELISA buffer, starting 1:30 (90; 270; 810) in a round bottomed microtiter plate. Make also a 3-step dilution of the positive and negative control
6. Wash the wells as pointed out in the wash protocol.
7. Transfer 100 µl of this dilution to the CPV coated microtiter strips. Seal and incubate for 60 min. at 37°C.
8. Wash as pointed out in wash protocol.
9. Dispense 100 µl conjugated anti-species antibody to all wells.
10. Seal and incubate 60 min. at 37°C.
11. Wash as pointed out in wash protocol.
12. Mix equal parts of buffer A and buffer B with gentle shaking. Prepare immediately before use! Dispense 100 µl substrate solution to each well. Incubate 10-15 min. at room temperature (21°C). If temperature is higher (above 28°C) than incubate 5-10 min instead of 10-15 min.
13. Add 50 µl stop solution to each well; mix well.
14. Read the absorbency values immediately (within 10 min.!) at 450 nm (ref 620 nm).

8 PRECAUTIONS

- Handle all biological material as though capable of transmitting CPV.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke or prepare foods, or apply cosmetics within the designated working area.
- TMB substrate (buffer A/B) is toxic by inhalation, through contact with skin or when swallowed; observe care when handling the substrate.
- Do not use components past the expiry date and do not mix components from different serial lots.
- Optimal results will be obtained by strict adherence to this protocol. Careful pipetting and washing throughout this procedure are necessary to maintain precision and accuracy.
- Each well is ultimately used as an optical cuvette. Therefore, do not touch the under-surface of the microtiter plate and protect it from damage and dirt.

9 VALIDATION OF THE TEST

The negative control should give an OD < 0.400.

The end point titer of the positive control should be between 1:150 and 1:450 according to the instructions for interpretation of test results.

10 INTERPRETATION OF TEST RESULTS

The titer of the sample is the dilution which gives an extinction above 2 times the OD value of the negative control.

The test is valid if the first two dilutions of the positive control are above 0.700 OD (450 nm).

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com

3

Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona conurbada de Toluca

DRG



DRG® Canine Parvo Virus IgG ELISA (EIA-2475)

Revised 21 June 2012 rm (Ver. 10.1)

For Veterinary Use Only

In summary: 30 = no antibodies found.
 90-270 = antibodies found.
 ≥ 810 = high titer of antibodies found.

*The entire risk as to the performance of these products is assumed by the purchaser. DRG shall not be liable for indirect, special or consequential damages of any kind resulting from use of the products.
In case of problems or questions contact DRG.*

Rev. 6/4/12cc

DRG International, Inc., USA Fax: (973) 564-7556 e-mail: corp@drg-international.com

4