



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG CONTRA  
PARVOVIRUS CANINO TIPO 2 EN PERROS  
INMUNIZADOS CON DOS DIFERENTES PROTOCOLOS DE  
VACUNACIÓN”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

**DULCE YESENIA MORALES MADUEÑA**

**ASESORES:**

DR. JOSÉ SIMÓN MARTINEZ CASTAÑEDA.

M. en C. LEMUEL LEÓN LARA.

**REVISORES:**

Dr. en C. ISRAEL ALEJANDRO QUIJANO HERNÁNDEZ

Dr. en C. JAVIER DEL ÁNGEL CARAZA



TOLUCA, MÉXICO, OCTUBRE DE 2016.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1 Etiología y estructura del virión.....	3
2.2 Ciclo viral.....	5
2.2 Epidemiología.....	6
2.3 Patogénesis.....	8
2.4 Signos Clínicos.....	10
2.5 Patología .....	12
2.7 Inmunología.....	14
2.7.1 Respuesta inmune frente al virus .....	15
2.7.2 Respuesta inmune a la vacuna .....	18
2.8 Vacunología.....	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	23
4. HIPOTESIS.....	24
5. OBJETIVO GENERAL.....	25
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
7.- METODOLOGÍA.....	27
7.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	27
8. MATERIAL Y MÉTODO.....	28
8.1 MATERIAL.....	28
8.2 MÉTODO.....	30
8.3 MÉTODOS DE VACUNACIÓN.....	30

9. ANÁLISIS DE DATOS .....	34
10. LÍMITE DE ESPACIO .....	35
11. LÍMITE DE TIEMPO.....	36
12. RESULTADOS .....	37
13. DISCUSIÓN.....	46
14. CONCLUSIONES .....	50
15. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....	51

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

FIGURA 1. Estructura de PVC por cristalografía de rayos X.....	4
FIGURA 2. Diagrama esquemático del proceso de la infección por parvovirus..	6
FIGURA 3. Anticuerpos Derivados Maternos IgG de perros de 1 mes y medio a 2 meses de edad .....	38
FIGURA 4. Determinación de la vida media de Ac. IgG Derivados Maternos en 5 perros de dos meses de edad .....	39
FIGURA 5. Vacunación VSPTA a una sola dosis vacunal.....	41
FIGURA 6. Vacunación VSPTA a dos dosis vacunal .....	42
FIGURA 7. Vacunación VCPTA a una sola dosis vacunal.....	43
FIGURA 8. Vacunación VCPTA a dos dosis vacunal .....	45

## **ÍNDICE DE TABLAS**

TABLA 1. ADM de tipo IgG contra PVC-2 identificados en perros sin historia de vacunación (1 ½ a 2 meses de edad) .....	37
TABLA 2. Determinación de la vida media de Ac. IgG Derivados Maternos en una camada de perros de 2 meses de edad.....	39
TABLA 3. Títulos de IgG identificados 15 días después de la primera vacunación en perros VSPTA.....	40
TABLA 4. Títulos de IgG identificados 15 días después de la primera vacuna en perros con procedimiento VCPTA .....	43

## **RESUMEN**

Parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) es considerada una de las principales enfermedades infecciosas que afectan a los perros, presenta altos índices de morbilidad y mortalidad, generando cuadros clínicos entéricos de moderados a severos caracterizados por presencia de vómito, diarrea mucoide a hemorrágica y cambios hematológicos como leucopenia.

La vacunación se considera el método más eficaz para la prevención de PVC-2; sin embargo se han identificado factores que producen falla vacunal, por ejemplo la interferencia de anticuerpos maternos y el mal manejo de los calendarios de vacunación. Actualmente se considera que hay un procedimiento más adecuado de vacunación basado en la previa determinación de títulos de anticuerpos que no causen interferencia con el antígeno vacunal. Sin embargo en nuestro país la práctica de vacunación se basa en periodos de tiempo sin considerar los títulos de anticuerpos que poseen los perros.

En este estudio se realizaron dos protocolos de vacunación, el primero sin previa titulación de anticuerpos y el segundo con previa titulación de anticuerpos; en el primer protocolo se vacunaron 23 perros al mes y medio de edad, 20 perros mostraron franca interferencia a la primera dosis vacunal y 3 seroconvirtieron.

17/23 perros recibieron una segunda dosis de vacunación, fueron vacunados a los 2 meses de edad y como respuesta solo 14 perros seroconvirtieron.

En el segundo protocolo se vacunaron 5 perros con ADM de  $\leq 1:32$  y como respuesta todos seroconvirtieron a la primera dosis vacunal y otro grupo de 5 perros vacunados con ADM de  $\leq 1:32$ , todos seroconvirtieron a la primera dosis vacunal, este grupo de perros fueron titulados cada 15 días hasta identificar nuevamente títulos de  $\leq 1:32$  para proceder a la aplicación de la segunda dosis vacunal y como respuesta todos seroconvirtieron nuevamente.

Observamos que la vacunación con previa titulación de anticuerpos es la manera más efectiva para lograr la inmunización contra la enfermedad.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) es uno de los agentes infecciosos más comunes que causan altos índices de morbilidad y mortalidad en perros, particularmente en cachorros, la enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo (Pedroza *et al.* 2015).

Esta enfermedad se caracteriza por causar una enteritis severa (diarrea catarral o hemorrágica), depresión, pérdida del apetito, vómito y leucopenia principalmente; el virus fue referido como PVC-2 para distinguirlo del virus diminuto de los caninos (MVC o PVC-1) responsable de la muerte neonatal en cachorros, con el cual se encuentra genética y antigénicamente relacionado (Mohan *et al.*, 2010; Gallo *et al.* 2009).

PVC-2 fue reconocido rápidamente alrededor del mundo pero fue remplazado de forma global por otras variantes, a principios de 1980, surge una nueva variante designada como PVC-2a. El virus muta de nuevo y surge en 1984 la variante, PVC-2b (Goddard y Leisewitz, 2010). Las variantes PVC-2a y PVC-2b se asociaron a cuadros clínicos severos de diarrea hemorrágica, shock y muerte en los pacientes infectados principalmente cachorros, mientras que en el año 2000 una nueva variante PVC-2c, se le ha señalado como la causante de altas tasas de mortalidad y existen reportes de infección en perros adultos, hembras gestantes y pacientes regularmente vacunados (Decaro *et al.*, 2005, Decaro *et al.*, 2008, Buonavoglia *et al.*, 2001).

Se han reportado diversos brotes de la infección en perros con un esquema de vacunación completo y pacientes adultos, lo que sugiere una falla vacunal, con relación a esto existen tres teorías de porque se produce la falla vacunal, una que es la diversidad genética que sufren los virus con su consecuente evasión del sistema inmune, otra es el mal procedimiento de la vacunación por parte de los médicos veterinarios y el tercero es la interferencia de altos títulos de anticuerpos IgG maternos en el momento de la primera vacunación (Decaro, *et al.* 2008).

La mayoría de los cachorros están protegidos por los ADM en las primeras semanas de vida, siendo el declive de estos a las 8-12 semanas de edad que permite la inmunización activa. Por otro lado, los cachorros con anticuerpos derivados maternos bajos pueden ser vulnerables (y capaz de responder a la vacunación) a una edad temprana, mientras que otros pueden poseer altos títulos de anticuerpos y ser incapaces de responder a la vacunación hasta las 12 semanas de edad (Friedrich y Truyen, 2000). En nuestro país no existen datos precisos de cuáles son los títulos de anticuerpos IgG contra parvovirus canino que poseen los perros al momento de su vacunación y si estos interfieren con la respuesta vacunal. Por lo tanto, se hace necesario realizar un estudio de investigación utilizando el procedimiento clásico de vacunación con base a un calendario que establece las semanas de edad a las cuales los cachorros deben de ser inmunizados y determinar si este procedimiento es eficiente para obtener títulos protectores de anticuerpos contra PVC-2 o si se requiere realizar el procedimiento denominado vacunación individualizada que se basa en determinar los títulos de anticuerpos IgG contra PVC-2 en cada uno de los perros, para determinar si deben de recibir o no inmunización mediante la vacuna (Day *et. al.* 2015).



## **2. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Etiología y estructura del virión**

Parvovirus canino tipo 2 (PVC-2), actualmente está ubicado en la especie *Protoparvovirus de los carnívoros 1*, la cual pertenece a la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, genero *Protoparvovirus* (Cotmore, *et. al.*, 2014).

El PVC-2, es un virus no envuelto, cuenta con una cápside de 25 nm de diámetro, se compone de un total de 60 moléculas de proteínas (VP1, VP2 Y VP3), aproximadamente 90% siendo VP2 y el 10% siendo la proteína VP1 pero más largo. VP1 y VP2 están formadas por corte y empalme alternativo del mismo ARN mensajero (ARNm), y toda la secuencia de VP2 se codifica dentro del gen VP1. La cápside de parvovirus es altamente antigénica y juega un papel importante en determinar el rango del hospedador y su tropismo hacia los tejidos (Hoelzer y Parrish, 2010). Contiene una molécula lineal de hebra simple de ADN (Decaro *et. al.*, 2011), posee un peso molecular de 1.5 a 2.2 x 10<sup>6</sup> daltons y un genoma de alrededor de 5000 kb en el cual se encuentran codificados dos marcos de lectura abierta (ORF por sus siglas en inglés). El ORF1 codifica proteínas no estructurales (NS1 y NS2), las cuales son generadas a través del ARNm viral y el ORF2 codifica tres proteínas de la cápside (VP1, VP2, VP3) (Mengyu *et. al.*, 2015).

Todos los parvovirus son altamente estables en el medio ambiente, ya que son extremadamente resistentes a los cambios de pH, temperatura, al tratamiento con solventes de lípidos y a la mayoría de los desinfectantes (Decaro y Bounavoglia, 2012). El virus sobrevive de 10 – 15 min a 80°C, 1 hora a 60 °C y varios meses a temperaturas entre 20 y 4°C. Conservado en ambiente frio puede sobrevivir por años (Gómez y Guida, 2010).

Los viriones pueden ser inactivados con formalina, hipoclorito de sodio, beta propiolactona, hidroxilamina, agentes oxidantes e irradiación ultravioleta (Decaro y Bounavoglia, 2012).

PVC-2 es capaz de aglutinar eritrocitos de cerdo, propiedad conferida por los aminoácidos presentes en la posición 323 Asn y 375 Asp de VP2 (Figura 1), que a su vez determinan la dependencia del pH de la Hemoaglutinación, el pH que favorece este fenómeno es de 6.2 a 7.4 (Chang *et. al.* 1992), por lo tanto la prueba de Hemoaglutinación para el diagnóstico de parvovirus canino se basa en esta actividad (Decaro y Bounavoglia, 2012).

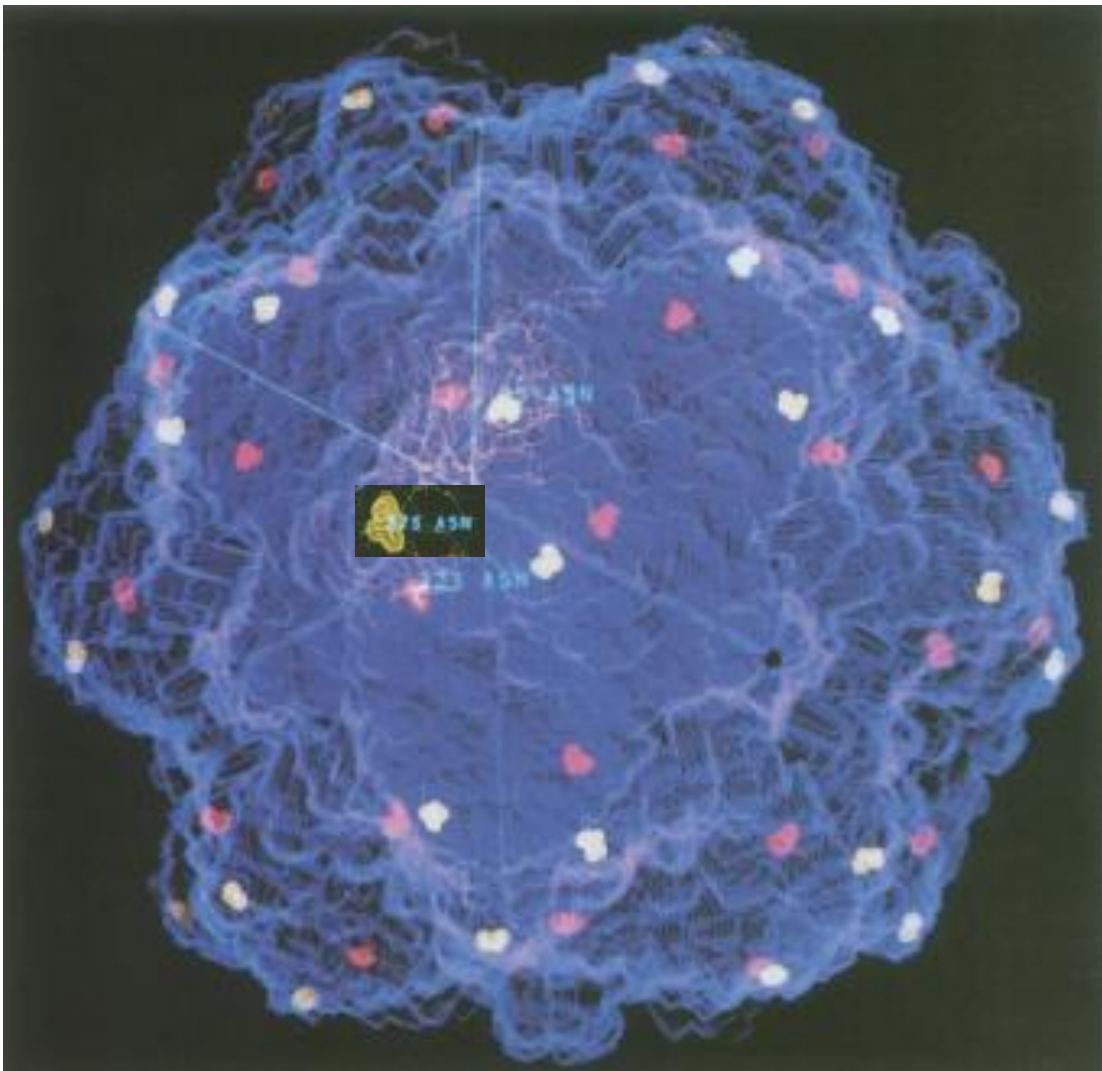


Figura 1.- Estructura de PVC por cristalografía de rayos X, en donde se aprecia la ubicación de los residuos 323 y 375 en la superficie de la cápside (Chang *et. al.* 1992).

## **2.2 Ciclo viral**

La replicación del virus tiene lugar en el núcleo celular, por lo tanto requiere de células del hospedador que se encuentren en constante división, como en el caso de los fetos o recién nacidos, en general el virus afecta principalmente a los enterocitos y precursores celulares en médula ósea; en animales muy jóvenes se llegan a ver afectados los cardiomiocitos ( pero en el caso de estas últimas células conforme avanza la edad del perro dejan de ser células diana debido a la disminución de su mitosis). La replicación del virus en las células resulta en muerte celular, debido a un fallo de la mitosis. No toda la población de células de división rápida se afecta de igual forma, lo que sugiere un tropismo por ciertos órganos diana (Goddard and Leisewitz, 2010, Decaro *et. al.*, 2012).

La cápside, regula varias de las funciones durante la infección como es la adsorción y la entrada del virus a la célula huésped, el transporte intracelular y la localización, la salida viral y la inducción de la respuesta inmune (Mengyu *et. al.*, 2015).

El proceso de entrada de parvovirus a la célula es mediada por la vía endocítica dependiente de clatrina. Esta internalización es mediada por la unión al receptor celular de PVC llamada transferrina tipo 1 (TfR) (Cureton *et. al.*, 2012). El endosoma necesita un pH inicial de 6.0 a 6.5 y para transformarse en endosoma tardío se necesitan condiciones de pH más bajos (pH 5). Terminado este paso se continúa transformando en el lisosoma y la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) con un pH de 4,0 destruye la integridad de la membrana lisosomal, así el virus se libera en el citosol. Después los virus son transportados hacia el núcleo con la ayuda de la señal de localización nuclear ubicada en VP1 (SLN). El movimiento de los microtúbulos y los filamentos de actina participan en todo el proceso de infección viral, a partir del endosoma hacia la periferia del núcleo, por lo tanto la replicación genómica del virus se lleva a cabo en el núcleo celular, posteriormente el ensamble de las partículas virales comienza durante su tránsito a través del complejo del poro nuclear. Los viriones maduros finalmente se mueven a través de

estos complejos del poro nuclear y a través del citoplasma para liberarse a nivel extracelular (Mengyu *et. al.*, 2015).

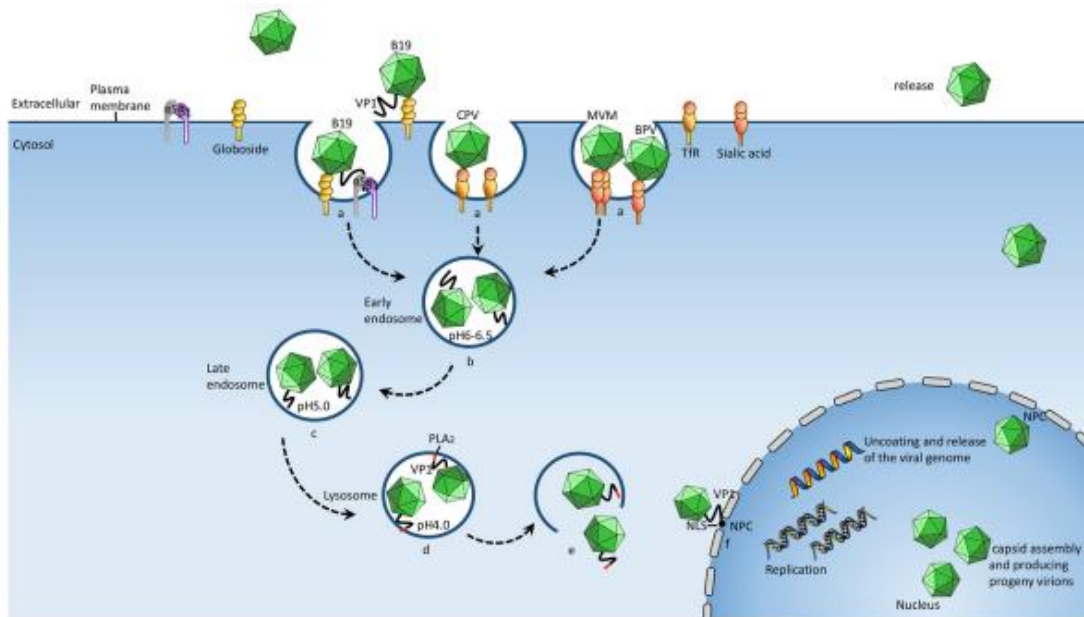


Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de la infección por parvovirus, B19 y MVM. La internalización del virus está mediada por la vía de endocitosis, principalmente a través de los siguientes pasos: A) Un receptor de internalización mediada por la unión. El receptor celular para el parvovirus B19 es globósido, el receptor celular para PVC es receptor de transferrina (TfR), y el receptor celular para MVM y BPV es el ácido siálico. B) Formación del endosoma temprano (pH 6,0-6,5). C) Transformación en el endosoma tardío en condiciones de pH más bajos (pH 5). D) Transformación en el lisosoma y la activación de la fosfolipasa A2 (PLA2) (pH 4,0). E) El PLA2 activada destruye la integridad de la membrana lisosomal. Por lo tanto, los virus se liberan en el citosol. F) Los virus son transportados hacia el núcleo con la ayuda de la señal de localización nuclear ubicada en VP1 (SLN). El movimiento de los microtúbulos y los filamentos de actina participan en todo el proceso de la infección viral, de principios del endosoma al núcleo periférica. El genoma viral comienza a replicar y ensamblarse a través del complejo de poro nuclear (APN). Los viriones maduros, finalmente, se mueven a través de la APN y se liberan extracelularmente (Mengyu *et. al.*, 2015).

## 2.2 Epidemiología

El parvovirus canino tipo 2, fue nombrado así debido a que fue el segundo parvovirus descrito en perros. A diferencia del PVC-1 denominado virus diminuto

canino en el cual la mayoría de los pacientes infectados son asintomáticos (Lamm y Rezabek, 2008).

En 1967, CPV-2 fue descrito por primera vez como una causa de trastornos gastrointestinales y enfermedades respiratorias en los perros; en 1978, se reportaron brotes de una enfermedad entérica contagiosa desconocida en Estados Unidos. El agente causal fue aislado y los datos mostraron que se trataba de una nueva especie del género parvoviridae, debido a la falta de inmunidad preexistente en la población canina, el virus se extendió rápidamente y en 1980 se confirmó su distribución mundial. Durante los últimos años PVC-2 ha sufrido alteraciones genéticas y ha desarrollado nuevas cepas del virus. En 1980 evoluciona la cepa original CPV-2 hacia el tipo 2a (CPV-2a) en 1984 apareció otra variante designada tipo 2b (CPV-2b) ambas identificadas mediante anticuerpos monoclonales (Truyen, 2006). Las diferentes variantes antigénicas son prevalentes en diferente proporción en muchos países. La prevalencia de PVC-2b ha sido reportada por varios autores en varios países como Brasil, E.U.A, Japón, Suiza y el sur de África. En contraste, se encontró PVC-2a a ser el tipo antigénico prevalente en Francia, Taiwán e Italia. Sin embargo, tanto PVC-2a y PVC-2b se han encontrado distribuidos en la misma proporción en España y U.K. PVC-2c tiene también ha encontrado en Vietnam, España, Reino Unido, América del Sur, América del Norte (Chang *et. al.*, 1992; Martella *et. al.*, 2005; Kapil *et. al.*, 2007).

Después se aisló PVC-2 por primera vez en la India en 1982, registrándose prevalencia de PVC-2a en el 2001 y también variantes de PVC-2b siendo más comunes en el norte de la India (Narayanan *et. al.*, 2001).

En Italia en el año 2001 fue detectada una nueva variante antigénica, PVC-2c que ya ha sido identificada también en Vietnam, España, Estados Unidos, América del sur, Portugal, Alemania y Reino Unido (Decaro *et. al.*, 2007); y en el año 2014 Pedroza y Roldan publican la frecuencia dominante de este virus en una población de perros en el oriente de México (Pedroza *et. al.*, 2015).

Por otra parte, la enteritis aguda por PVC-2 se puede observar en perros de cualquier raza, edad, o sexo, pero los cachorros entre 6 semanas y 6 meses de edad tienden a ser más susceptibles (Prittie, 2004). Si la perra tiene anticuerpos contra PVC, ya sea por infección o vacunación, los cachorros están protegidos contra la infección durante las primeras semanas de vida por los ADM. El título de anticuerpos transferidos al recién nacido mediante el calostro es equivalente al 50-60% de título de la madre. Por lo tanto, el título de ADM se determina por el suero de la madre en el parto, la cantidad de calostro ingerido, y tamaño de la camada (Mason, 1987).

Los ADM contra PVC-2 tiene una vida media de aproximadamente 10 días. Como este título de anticuerpos disminuye, los cachorros se vuelven susceptibles a la infección, y se requiere la inmunización activa para la protección contra la enfermedad. La ventana de susceptibilidad a la infección viral se produce cuando los anticuerpos maternos interfieren con la respuesta inmune de la vacuna y a la vez no protege contra la infección por PVC-2 (Wilson *et. al.*, 2014).

### **2.3 Patogénesis**

PVC-2 se propaga a través del contacto oronasal con heces y superficies contaminadas (Nandi y kumar, 2010). La replicación viral comienza en el tejido linfóide de la orofaringe, nódulos linfoides mesentéricos, y en el timo, una viremia temprana se observa del primero al séptimo día después de la infección, alcanzando el pico máximo el quinto día; posteriormente el virus se diseminará a la médula ósea y a las criptas del intestino delgado que son órganos con rápida división celular; pudiéndose aislar también de pulmones, bazo, hígado, riñón y miocardio (Greene, 2012).

Normalmente, las células epiteliales de las criptas intestinales maduran en intestino delgado y a continuación migran del epitelio germinal de las criptas intestinales a las puntas de las vellosidades. Al llegar a estas últimas, las células

epiteliales intestinales adquieren su capacidad de absorción y ayudan en la asimilación de nutrientes. PVC-2 infecta el epitelio germinal de las criptas intestinales y origina la destrucción y colapso del epitelio, como resultado se deteriora el recambio normal de las células (por lo general entre uno a tres días en intestino delgado) y se acortan las vellosidades. Este virus también destruye precursores activos de leucocitos circulantes y células linfoides. En infecciones graves los resultados suelen ser neutropenia y linfopenia. Pueden detectarse títulos séricos de anticuerpos 3 a 4 días después de la infección y permanecer constantes por lo menos durante un año (Hoskins, 2000; Goddard y Leisewitz, 2010).

En los cachorros, el virus invade las células epiteliales en división activa de las criptas del intestino delgado, la pérdida de células en este tejido conduce a un acortamiento de las vellosidades y la reducción de la capacidad de absorción y digestión; que da paso a la diarrea, lo cual produce una intensa hemorragia en la luz intestinal en los cachorros gravemente afectados (Flores, 2008). El PVC- 2 también destruyen los precursores con actividad mitótica de las células linfáticas y leucocitos circulantes. La destrucción de los tejidos linfoides de la mucosa intestinal y los ganglios linfáticos mesentéricos contribuye a una inmunosupresión del animal, lo que permite la proliferación de las bacterias gramnegativas como: *Salmonella spp.* y *E. coli* principalmente enterohemorrágica o de parásitos oportunistas tal como coccidias, giardias, helmintos y cestodos (Honskinks. 2009). La invasión secundaria de los tejidos intestinales dañados puede presentar una endotoxemia o coagulación intravascular diseminada; La excreción activa del PVC- 2 comienza en el tercer o cuarto día después de la exposición, en general antes de que se manifiesten signos clínicos, el virus se libera ampliamente en la materia fecal por un máximo de 7 a 10 días (Quinn, 2011), aunque se ha observado excreción viral 3 días después de la inoculación experimental con una excreción continua de partículas virales por un periodo de 3 a 4 semanas después

de la enfermedad clínica o subclínica (Goddard y Leisewitz, 2010), sin embargo existen reportes de excreción de partículas virales hasta por 54 días post infección (Decaro *et al.*, 2005). En la forma miocárdica de la enfermedad, que en la actualidad es rara, los cachorros afectados suelen presentar síntomas de fallo cardiaco agudo antes de las 6 semanas de edad, algunos cachorros pueden sufrir una insuficiencia cardiaca congestiva meses después de la miocarditis (Honskinks. 2009). En la actualidad esto se observa con poca frecuencia ya que los cachorros están protegidos por anticuerpos maternos (Prittie, 2004; Decaro y Buonavoglia, 2012).

## **2.4 Signos Clínicos**

La infección por PVC-2 en los perros puede dar origen a dos formas clínicas; una de carácter entérico y una forma cardiaca o miocardial (Flores 1987).

La enteritis aguda es la manifestación más común de la enfermedad y se observa sobre todo en los cachorros de hasta 6 meses de edad. Los signos clínicos iniciales asociados con la enteritis por PVC son inespecíficos, incluyen la anorexia, depresión y fiebre. Los cachorros más afectados comienzan a desarrollar vómitos y diarrea dentro de las 24-48 horas post infección (Prittie, 2004).

Las grandes pérdidas de líquidos y proteínas a través del tracto gastrointestinal pueden causar deshidratación severa y shock hipovolémico. Los signos clásicos asociados con el deterioro de la perfusión tisular, incluyendo cambios en el estado mental, tiempo de llenado capilar retardado, taquicardia, la mala calidad del pulso / hipotensión, extremidades frías, y baja temperatura rectal, pueden ser evidentes. La enfermedad clínica es más grave en los cachorros con compromiso subyacente de la inmunidad humoral asociado con infecciones secundarias, bajos títulos de anticuerpos maternos, o estrés ambiental (Schoeman, *et al.*, 2013).



El hallazgo hematológico más consistente asociado con la infección por PVC-2 es linfopenia, pero se puede observar en casos graves la panleucopenia. Las anormalidades en el análisis de la química sérica son inespecíficos y pueden incluir: azotemia prerrenal y elevaciones de enzimas hepatocelulares secundaria a la deshidratación severa e hipoperfusión tisular; hipoalbuminemia secundaria a pérdidas gastrointestinales; hipopotasemia secundaria a pérdidas gastrointestinales y la ingesta inadecuada; e hipoglucemia asociada con desnutrición severa y/o sepsis subyacente (Schoeman, Goddard y Leisewitz, 2013).

La miocarditis por parvovirus puede desarrollarse por infección *in útero* o en cachorros menores de ocho semanas, dentro de una camada infectada, 70% de las crías morirán por insuficiencia cardíaca con 8 semanas de edad y el 30% restante tendrá cambios patológicos que pueden resultar en la muerte, muchos meses o incluso años después (Nandi, 2010). Por lo general afecta a todos los perros de una camada, con frecuencia los que tienen miocarditis por PVC-2 se encuentran muertos o sucumben después de un episodio de disnea, llanto y arcadas. Los signos de distensión cardíaca van precedidos por la forma entérica de la enfermedad o bien ocurren de manera súbita sin afección previa aparente (Hoskins, 2000).

En la actualidad el tipo cardíaco es raro, debido a la inmunidad materna protectora y a la inmunización frecuente en hembras (Prittie, 2004).

También existen reportes de signos neurológicos presentes en pacientes infectados con parvovirus canino, esta enfermedad neurológica primaria no se debe a PVC-2, pero ocurre como resultado de hemorragias en SNC, por coagulación intravascular diseminada (CID) o hipoglucemia durante el proceso patológico, la sepsis o a alteraciones ácido-base electrolíticas (Hoskins, 2000).

El efecto en medula ósea tiene una gran importancia clínica. La infección causa necrosis de las células mieloides y eritroides y su alteración pueden ocasionar neutropenia transitoria o prolongada haciendo al paciente susceptible a infecciones bacterianas graves, en especial si las lesiones del aparato digestivo permiten la entrada de bacterias, lo que causa shock endotóxico caracterizado por hipotermia, coagulación intravascular diseminada e ictericia (Basurto y Marín, 2003).

## **2.5 Patología**

Los cambios patológicos producidos por CPV-2 están asociados estrechamente con órganos de rápida división celular (corazón de neonatos, criptas de intestino delgado y los órganos linfoides), las lesiones macroscópicas en infección por PVC son sumamente variables y no específicas (Nandi y Kumar, 2010).

- **Lesiones macroscópicas**

En la enfermedad entérica, las lesiones pueden ser distribuidas por segmentos en el tracto gastrointestinal. Las lesiones suelen afectar el yeyuno y el íleon, pero no el duodeno y el colon. Los segmentos afectados pueden estar flácidos con hemorragias subserosas y congestionados (Robinson *et. al.*, 1980). El lumen del intestino a menudo está vacío pero puede contener diversa ingesta acuosa. La superficie de la mucosa está congestionada, pero carente de exudado. Los ganglios linfáticos mesentéricos se encuentran aumentados de tamaño y edematosos. Las hemorragias petequiales multifocal en la zona cortical de los ganglios linfáticos afectados es común durante la etapa aguda de la enfermedad. La necrosis cortical de timo y atrofia son encontradas con frecuencia en perros jóvenes (Cooper *et. al.*, 1979; Hayes *et. al.*, 1979; Robinson *et. al.*, 1980). En la médula ósea se produce necrosis y por consiguiente se reduce notablemente la población de células precursoras y células maduras de las series mieloides y eritroides (Flores, 1987).

En los casos de miocarditis por PVC-2, las lesiones macroscópicas incluyen cardiomegalia con dilatación importante de la aurícula y el ventrículo izquierdo. En la disección de los pulmones no hay colapso pero puede presentarse líquido espumoso blanco en la tráquea y los bronquios. La evidencia de edema pulmonar y congestión pasiva del hígado a menudo está presente, con un grado variable de ascitis y derrame pleural. El miocardio ventricular contiene rayas blancas visibles, asociadas con la presencia de algún infiltrado celular (Meunier *et. al.*, 1985).

- **Lesiones microscópicas**

En las lesiones microscópicas la pared intestinal suele estar engrosada y con alteraciones segmentarias de coloración, denudación de la mucosa intestinal y presencia de material acuoso oscuro, en ocasiones hay material sanguinolento, en la cavidad gástrica y la luz intestinal. En casos leves las lesiones no se diferencian con facilidad de la enteritis inespecífica. Se ha observado crecimiento y edema de ganglios linfáticos torácicos y abdominales (Haligur *et. al.* 2009).

Las lesiones intestinales se caracterizan por necrosis del epitelio de las criptas del intestino delgado. Es posible observar cuerpos de inclusión viral intranucleares en estas células epiteliales y en la totalidad de los epitelios escamosos del tubo gastrointestinal superior. Las alteraciones histopatológicas varían de inflamación leve a enteritis hemorrágica difusa. Las vellosidades están acortadas o destruidas debido a la falta de restitución epitelial por células de la cripta en maduración, que da por resultado el colapso de la lámina propia. Hay necrosis y agotamiento de tejido linfoide (placas de Peyer, ganglios linfáticos, mesentéricos, hígado timo y bazo). En perros que mueren por complicación septicémica es posible observar edema pulmonar o alveolitis. La lesión miocárdica consiste en miocarditis no supurativa, con infiltración multifocal de linfocitos y células plasmáticas dentro del miocardio (Hoskins, 2000).

## **2.7 Inmunología**

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. Los perros tienen una placenta endotelio-corial, en el cual el epitelio corial del embrión está en contacto con el endotelio de los capilares maternos, por esta razón solo una pequeña cantidad de IgG, 5-10% (protege de las enfermedades de tipo septicémico) puede ser transferida de la madre al feto, por lo tanto la mayor parte debe obtenerse del calostro (Chappuis, 1998).

El calostro es rico en IgG e IgA y algunas cantidades de IgM e IgE, la inmunoglobulina predominante en la mayor parte de los animales es la IgG que constituye el 65%-90% de las inmunoglobulinas. Posteriormente la absorción del calostro es muy importante, para que las inmunoglobulinas lleguen a la circulación sistémica y los recién nacidos obtengan una transfusión masiva de inmunoglobulinas de origen materno. Los perros que no han tomado ese calostro, en condiciones normales, poseen concentraciones extremadamente bajas de inmunoglobulinas en la sangre y debido a la naturaleza de los procesos de absorción, los valores máximos de inmunoglobulinas séricas se alcanzan entre 12 y 24 horas tras el nacimiento, después de terminar la absorción, esos anticuerpos adquiridos de forma pasiva empiezan a declinar inmediatamente mediante los procesos catabólicos normales (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).

### **2.7.1 Respuesta inmune frente al virus**

La entrada principal de PVC-2 al organismo es por vía oronasal, por lo tanto, el primer mecanismo de defensa contra esta infección es mediado por la inmunidad de mucosas, las cuales revisten tanto el tracto gastrointestinal como el respiratorio, el componente inmunitario de estas superficies se localizan en amplias zonas denominadas tejido linfoide asociado a mucosas donde los mecanismos inmunitario protectores, están mediados tanto por células como por anticuerpos (Hans-Joachim y Moos, 2006).

Al entrar el virus en contacto con las mucosas, las células epiteliales de estas, producen interferones tipo IFN- $\alpha$ , su función es inhibir la replicación del DNA viral de los virus en diversas etapas, también induciendo apoptosis de las células infectadas (Billiau, 2006). La expresión de IFN- $\alpha$  es controlada por receptores en células nucleadas y en especial en células dendríticas que reconocen la presencia del virus, siendo así, una respuesta inmune inespecífica (Gutiérrez, 2010).

Si el virus logra evadir esta primera barrera, posteriormente en el tejido conectivo es fagocitado por los macrófagos, así como las células dendríticas (células presentadoras de antígeno), por su parte, las células NK que son linfocitos granulares grandes, muestran actividad citotóxica contra células infectadas por virus y células tumorales, debido a que las células infectadas disminuyen su expresión de CMH-I, lo que permite la activación de células NK, las cuales secretan citosinas (perforinas y granzimas), y por lo tanto producen muerte celular (Biron *et. al.* 1999).

Por otro lado se desarrolla una respuesta inflamatoria, que favorece la llegada de más leucocitos como neutrófilos, así como un mayor número de células NK con actividad citotóxica innata inmediata. Las células dendríticas maduran al contacto con el virus y se desplazan a nódulos linfáticos regionales; donde

presentan los antígenos virales a los linfocitos, para iniciar una respuesta inmune adquirida.

El antígeno viral captado vía endocitosis es presentado con las moléculas de CMH-II a los Th-CD4, mientras que el antígeno viral derivado de la replicación de los virus a nivel intracelular es presentado con el CMH-I a los Tc-CD8 (Gutiérrez, 2010). Este complejo se expresa en la superficie de las células infectadas por lo que son reconocidas como extrañas y pueden ser eliminadas. En algunas circunstancias, las células CD8<sup>+</sup> pueden eliminar al virus sin destruir a la célula infectada. Esta respuesta antiviral es mediada por IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  derivadas de células T. Estas citosinas activan una vía para eliminar las partículas de la nucleocápside viral, incluyendo el genoma (Vega, 2009). Los macrófagos también tienen una actividad antiviral una vez que son activados. El virus puede ser fagocitado por estos para su destrucción, sin embargo algunos virus pueden sobrevivir dentro del macrófago, por lo que la infección puede ser persistente (Weiskopf, 2009).

Una vez que los antígenos han sido detectados y reconocidos por las células presentadoras de antígeno: macrófagos, células dendríticas y linfocitos B, éstos son internalizados y procesados a pequeños péptidos mediante la vía endocítica para ser mostrados en la superficie celular asociados a las moléculas CMH-II (Vega, 2009) A partir de este momento se desarrollan eventos celulares y moleculares que tendrán como objetivo la producción de una respuesta humoral basada en la producción de grandes cantidades de anticuerpos de elevada especificidad y afinidad contra PVC-2. Si la molécula presentada resulta extraña, la célula CD4<sup>+</sup> se activa y secreta citocinas. Estas citocinas, pueden activar a la célula presentadora, a linfocitos y células circundantes (respuesta predominante Th1), así como estimular la producción de anticuerpos (respuesta de predominio Th2). En todos los casos existe una regulación que, al término del estímulo

antigénico: frena la respuesta, induce apoptosis de células activadas, inhibe la inflamación e inicia la reparación (Mori, 2008).

Entre los anticuerpos más importantes para la neutralización de PVC-2 se encuentran los IgM, IgG e IgA (Blanco, 2006).

Las IgM se encuentran en la superficie de las células B. Estas son producidas tras el desarrollo de la primera respuesta inmune y se produce durante la primera exposición ante el antígeno. A pesar de que los anticuerpos IgM son producidos durante la segunda respuesta inmune, esta inmunoglobulina no es la clase de anticuerpo predominante en esta segunda respuesta contra el antígeno viral (Gonda, 2015).

Aunque las inmunoglobulinas IgG son producidos durante la primera respuesta inmune, estas están en bajas concentraciones. Durante la segunda respuesta inmune, IgG es el anticuerpo predominante contra el virus. Esta clase de anticuerpo a diferencia de la IgM tiene mayor tiempo de vida, por lo tanto, las IgG son los anticuerpos que proveen mayor protección durante la vida a los animales para prevenir infecciones o re-infecciones (Tizard, 2009).

Las IgA aunque están presentes en suero, son predominantes en la superficie de las mucosas (tracto gastrointestinal, respiratorio y urogenital) y en secreciones (calostro, leche, saliva, lágrimas), 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. Debido a que la entrada principal del CPV-2 es oronasal, la participación de estas inmunoglobulinas es importante, debido a que pueden realizar la neutralización del virus a nivel gastrointestinal (Day, 2007).

### **2.7.2 Respuesta inmune a la vacuna**

Una vez que el animal recibe un antígeno vacunal éste debe ser liberado eficientemente, de manera que las células presentadoras de antígeno puedan procesarlo y secretar las citoquinas apropiadas; después, se deben estimular tanto las células B como las células T, de manera que se genere un gran número de células de memoria; y posteriormente se deben estimular los linfocitos T colaboradores y efectores frente a varios epitopes de la vacuna, de manera que se minimicen las variaciones individuales en el polimorfismo de las moléculas de clase II del CMH y en las propiedades del epitope; finalmente, el antígeno debe ser capaz de estimular a las células de memoria de tal forma que la protección dure tanto como sea posible (Tizard, 2009).

Las vacunas vivas modificadas permiten la replicación del virus vacunal en las células del hospedador, pero debido a que son virus atenuados la cantidad de partículas virales replicativas son en menor número que las que se obtienen con un virus patógeno; por este motivo la mayoría de las vacunas poseen un adyuvante vacunal, que se adiciona cuando el antígeno pueda no ser capaz de despertar la respuesta inmune, tiene como misión informar al organismo la necesidad de respuesta inmune, las cuales constituyen en las llamadas muestras moleculares patogénicas asociadas (PAMPs por sus siglas en inglés) los cuales serán reconocidos por los receptores inmunológicos de reconocimiento (PRRs por sus siglas en inglés), ubicados en las células dendríticas del hospedador. Un importante grupo de PRRs son los receptores toll-like (TLR) que se hallan principalmente en células dendríticas y macrófagos, los cuales reconocen específicamente los PAMPs de los componentes vacunales permitiendo una activación inmunológica eficiente (Hans-Joachim y Moos, 2006).

Posteriormente las células dendríticas identifican y fagocitan el antígeno para transportarlo a tejido linfático secundario (linfocitos, placas de Peyer, bazo). Los antígenos vacunales que han llegado a tejido linfático secundario son



transformados intracelularmente en péptidos mediante proteólisis, y transportados a la superficie celular mediante el CMH para ser presentados a los linfocitos T, los cuales reconocen al péptido mediante un receptor antigénico. La unión establecida entre el complejo CMH/antígeno y el receptor antígeno-célula T se estabiliza mediante un co-receptor: el CD8<sup>+</sup>. Los antígenos vacunales se localizan en el citoplasma, por lo que se habilita la activación de Tc. De esta manera, se estimula una respuesta Th1 dominada por los CD8<sup>+</sup>, lo cual resulta fundamental por la formación de células T de memoria de larga vida (además de células B de memoria) (HogenEsch y Thompson, 2010).

Las células B de memoria estimulan la producción de anticuerpos IgM, esta es la principal inmunoglobulina producida durante la respuesta inmune primaria. También se produce en las respuestas secundarias, pero esto tiende a pasar desapercibido por el predominio de IgG. Aunque se produce en cantidades pequeñas, la IgM es más eficaz que la IgG en la activación del complemento, opsonización, neutralización de virus y aglutinación. Dado que son muy grandes, las moléculas de IgM rara vez entran en los fluidos tisulares, ni siquiera en los lugares de inflamación aguda (Tizard, 2009).

Posteriormente los anticuerpos IgG si son producidos durante la primera respuesta inmune. Durante la segunda respuesta inmune, IgG es el anticuerpo predominante contra el virus. Esta clase de anticuerpo a diferencia de la IgM tiene mayor tiempo de vida, por lo tanto, las IgG son los anticuerpos que proveen mayor protección durante la vida a los animales para prevenir infecciones o re-infecciones (HogenEsch y Felsburg, 1992).

## **2.8 Vacunología**

Entre los factores de riesgo que predisponen a la infección por PVC-2 en cachorros incluyen inmunidad deficiente, ambiente contaminado, densidad

poblacional, época del año, endoparasitismo y vacunación primaria incompleta o ineficaz debido a la interferencia de ADM (Goddard y Leisewitz, 2010).

Las vacunas del PVC, junto con Distemper canino, hepatitis infecciosa canina y 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 activa. Como el PVC-2 es ubicuo y, debido a que posee estabilidad fuera del hospedero y la facilidad con que se transporta en los fómites, la posibilidad de prevenir la exposición es mínima, por lo tanto la vacunación es el método más adecuado para la prevención de la misma (Gómez y Guida, 2010).

De forma general, existen 2 tipos de vacunas contra PVC-2: atenuadas e inactivadas, las inactivadas no tienen tanto éxito como las atenuadas, y parece ser mejor administrar varias aplicaciones seriadas. Las atenuadas suelen ser mejores a la hora de conseguir una inmunidad de larga duración. Cuando no se conoce el estado inmunitario del cachorro, suele ser adecuado administrar una vacuna atenuada a las 6, 9 y 12 semanas. Si se hace imprescindible vacunar al cachorro antes de las 5 o 6 semanas, resulta seguro emplear una vacuna inactivada para evitar lesiones debido a que esa edad es más rápida la tasa de replicación celular (Nelson y Couto, 2010).

La inmunidad pasiva juega un papel muy importante durante la vacunación. Los títulos de anticuerpos derivados maternos son determinantes para una correcta inmunización, debido a que la presencia de altos títulos puede interferir con la reacción vacunal. Pueden ser detectados residuos de anticuerpos maternos hasta las 15 semanas de edad. La receptividad y susceptibilidad al virus depende más del nivel residual de anticuerpos maternos que de la edad, donde títulos de anticuerpos por debajo de 1:64 – 1:80 se consideran bajos y el cachorro puede ser infectado por aislados de campo de parvovirus (Chappuis, 1998).

Aunado a esto, la transferencia de inmunidad pasiva varía acorde al tamaño de camada siendo alta en camadas pequeñas (95% de la tasa de anticuerpos que

tenga la madre) mientras que en más de 6 cachorros hay una transferencia baja (65%) (Kruth y Ellis, 1998).

Independientemente de qué tipo de vacuna se utilice, existe una ventana de susceptibilidad, reportada entre los 40 y 69 días de edad, durante la cual el cachorro aún no está correctamente inmunizado y los anticuerpos transferidos por la madre pueden interferir con la reacción vacunal (Decaro, 2005).

- **Edad de vacunación**

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 ADM, 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).

Aunque generalmente la vacunación de los cachorros comienza entre las 6 y 8 semanas de edad en la cual el paciente es más susceptible. También se puede prevenir a los cachorros, vacunando a la madre antes del apareamiento (Nelson y Couto, 2010).

- **Interacciones con inmunógenos**

Algunos inmunógenos producen inmunosupresión, tales como: distemper, adenovirus tipo 2 y CPV-2 de bajo pasaje, esto regularmente no afecta a los animales de manera importante; sin embargo, la combinación de éstos en una vacuna múltiple exacerba el efecto inmunosupresor. Si el animal se encuentra parasitado, enfermo, con desnutrición grave, la acción de la combinación de los agentes vacunales puede ser fatal (Larson y Schultz, 1997).

- **Procedimiento de vacunación individualizado**

Este proceso se realiza dependiendo de los títulos de anticuerpos circulantes en suero con los que llega el perro. La mayoría de los cachorros están protegidos por los ADM en las primeras semanas de vida, siendo el declive de estos a las 8-12 semanas de edad que permite la inmunización activa. Por otro lado, los cachorros con anticuerpos derivados maternos bajos pueden ser vulnerables a la infección, pero también capaces de responder inmunológicamente a la vacunación, mientras que otros pueden poseer altos títulos de anticuerpos y ser incapaces de responder a la vacunación (Friedrich y Truyen, 2000).

Existen diversos estudios que demuestran que se obtiene una vacunación exitosa cuando el cachorro tiene títulos de anticuerpos entre 1:20 y 1:40, ya que estos no son interferentes (Waner, 1996). Así como también estudios demuestran que si se vacunan perros con títulos de anticuerpos mayores a 1:128 son interferentes con la respuesta vacunal y por lo tanto no seroconvierten (Pratelli *et. al.*, 2000).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Parvovirus canina es una de las enfermedades virales que afecta de forma frecuente a los perros en nuestro país, llegando a producir en algunos casos la muerte, actualmente se utiliza la vacunación como el método más eficaz para la prevención de esta enfermedad ; sin embargo se han reportado diversos brotes de la infección en perros con un esquema de vacunación completo y pacientes adultos, lo que sugiere una falla vacunal, con relación a esto existen tres teorías de porque se produce la falla vacunal, una que es la diversidad genética que sufren los virus con su consecuente evasión del sistema inmune, otra es el mal procedimiento de la vacunación por parte de los médicos veterinarios y el tercero es la interferencia de altos títulos de anticuerpos IgG maternos en el momento de la primera vacunación. En nuestro país no existen datos precisos de cuáles son los títulos de anticuerpos IgG contra parvovirus canino que poseen los perros al momento de su vacunación y si estos interfieren con la respuesta vacunal. Por lo tanto se hace necesario realizar un estudio de investigación en esta área para que esta información permita a los médicos veterinarios conocer si sus pacientes presentan una respuesta eficaz a la vacunación y por lo tanto tener una mayor protección contra la enfermedad en cuestión.

#### **4. HIPOTESIS**

Los cachorros que llegan a primera vacunación tienen títulos de anticuerpos  $\geq 1:64$  y estos tienen efecto de interferencia contra la respuesta inmune vacunal; mientras que cachorros que son vacunados contra PVC-2 cuando tienen títulos de anticuerpos IgG  $\leq 1:32$  desarrollan títulos de anticuerpos protectores contra la enfermedad ( $\geq 1:128$ ) después de una sola dosis de vacuna.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la respuesta inmune mediada por anticuerpos IgG contra PVC-2 en cachorros utilizando 2 diferentes protocolos de vacunación.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los títulos de anticuerpos IgG que poseen los cachorros que llegan a su primera vacunación.
- Determinar en perros sin previa titulación de anticuerpos su respuesta a la primera y segunda dosis vacunal.
- Determinar en perros con previa titulación de anticuerpos su respuesta a la primera y segunda dosis vacunal.



## **7.- METODOLOGÍA**

### **7.1.- CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

#### **INCLUSIÓN**

- 39 perros de mes y medio a dos meses de edad.
- Sin vacunas.
- Clínicamente sanos evaluados con examen físico general en donde se determinaron los siguientes parámetros: Frecuencia Cardíaca (**F.C**):110-120, Frecuencia Respiratoria (**F.R**):10-30, Temperatura (**Tº**): 37.5-39.2, Tiempo de Llenado Capilar (**TLLC**): 2 segundos. Nódulos Linfáticos (**N.L**): Normal, Palpación Abdominal (**P.A**): Normal.
- Sin distinción de raza y sexo.
- Desparasitados.
- Para los 5 perros del protocolo VCPTA (vacunación con previa titulación de anticuerpos) se requirió que tuvieran títulos  $\leq 1:32$ .

#### **EXCLUSIÓN**

- Perros que desarrollen reacción adversa a la vacuna.
- Perros que desarrollen enfermedad durante el periodo de evaluación serán descartados.

## **8. MATERIAL Y MÉTODO**

### **8.1 MATERIAL**

#### **Biológico**

- Antígeno tipificado: PVC-2C
- Eritrocitos de cerdo: 2ml

#### **Reactivos**

- Solución Alsever's
- Albúmina de suero bovino
- Solución salina fisiológica Buferada pH:7.0

#### **Material de laboratorio**

- Microplacas en V
- Puntas para micropipetas de la marca Corning inc. de 10 a 100 µl.
- Puntas para micropipetas de la marca Corning incorpórate de 100 a 1000 µl.
- Tubos de ensayo
- Matraces de 500 ml.
- Tubos sin anticoagulante.
- Jeringas estériles de 3 ml. de la marca terumo.
- Jeringas estériles de 10 ml. de la marca terumo.
- Torundas de algodón
- Alcohol 96 grados.
- Viales estériles.

#### **EQUIPO**

- Centrifuga de temperatura ajustable la marca HERMLE Z 233 MK-2
- Congelador de la marca LG
- Baño seco
- Refrigerador

- Vortex
- Micropipetas marca Boeco de 20  $\mu$ l. a 200  $\mu$ l.
- Micropipeta multicanal de 50  $\mu$ l.
- Microcentrífuga
- Campana blanca

## **8.2 MÉTODO**

Se realizó un estudio exploratorio mediante un análisis transversal, el tipo de muestreo fue dirigido no aleatorio y obtenido por cuota durante los primeros 6 meses de la investigación.

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

## **8.3 MÉTODOS DE VACUNACIÓN**

- **Determinación de los títulos de anticuerpos IgG que poseen los cachorros que llegan a su primera vacunación.**

Los perros que llegaron a su primera vacunación, se les tomó suero sanguíneo mediante venopunción yugular o cefálica y se les tituló Ac de tipo IgG maternos contra PVC con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación.

Aunque existen diferentes métodos para la titulación de anticuerpos, en el caso de parvovirus canino se ha determinado que la inhibición de la hemoaglutinación es la técnica más sensible y específica para determinar títulos IgG contra PVC-2 (Cramer et. al, 2011).

Se evaluaron un total de 39 pacientes.

- **Vacunación VSPTA\* a una dosis vacunal (\*Vacunación Sin Previa Titulación de Anticuerpos)**

Se seleccionaron 6 perros y 1 perro control de entre mes y medio y dos meses de edad, a los que se les tomó muestra de sangre para titular Ac de tipo IgG contra PVC con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación antes de aplicar la vacuna, siempre que el perro estuviera clínicamente sano se procedió a aplicar la vacuna contra Parvovirus Canino y Distemper, vía subcutánea en la región interescapular, esto quiere decir que se aplicó la vacuna sin saber con qué título

de anticuerpos llegó el paciente, tal como se hace regularmente en los protocolos en clínicas veterinarias.

A los 15 días post-vacunación se volvió a titular Ac para evaluar la respuesta a la primera vacuna. Al perro control se tituló Ac para evaluar su comportamiento de ADM, posteriormente se vacuno de forma rutinaria.

- **Vacunación VSPTA a dos dosis vacunal**

Se seleccionaron 17 perros y 4 perros control de entre mes y medio y dos meses de edad, a los que se les tomó muestra de sangre para titular Ac de tipo IgG contra PVC con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación antes de aplicar la vacuna, siempre que el perro estuviera clínicamente sano se procedió a aplicar la vacuna contra Parvovirus Canino y Distemper, vía subcutánea en la región interescapular.

A los 15 días posteriores se revacunó a los perros y se volvió a titular Ac y 15 días después se volvió a titular Ac (0, 15 y 30 post vacunación). A los perros controles se les tituló Ac cada 15 días (día 0, 15 y 30) para evaluar su comportamiento, posteriormente se vacunaron de forma rutinaria.

- **Vacunación VCPTA\* a una dosis vacunal (\*Vacunación Con Previa Titulación de Anticuerpos)**

Llegaron 5 pacientes a vacunación y 1 perro control al mes y medio de edad y antes de vacunar se le tomó muestra de sangre para medir títulos de anticuerpos IgG maternos con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, se tituló al siguiente día y se seleccionaron perros con titulación igual o menor de 1:32 y se procedió a aplicar la vacuna de Parvovirus canino y Distemper, vía subcutánea en la región interescapular.

Posteriormente a los 15 días se tomó otra muestra de sangre para medir la respuesta a esta primera vacuna. Al perro control se tituló Ac para evaluar su comportamiento de ADM, posteriormente se vacuno de forma rutinaria.

- **Vacunación VCPTA a dos dosis vacunal**

Llegó el paciente a vacunación al mes y medio de edad y antes de vacunar se le tomó muestra de sangre para medir títulos de anticuerpos IgG maternos con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación, se tituló al siguiente día y si tuvo titulación igual o menor de 1:32 se procedió a aplicar la vacuna de Parvovirus canino y Distemper a 5 perros, vía subcutánea en la región interescapular, si poseía títulos mayores a 1:32 no se vacunó y se midió a ese paciente cada 15 días hasta que sus anticuerpos alcanzaron ese título y se procedió a aplicar la vacuna.

Posteriormente a los 15 días se tomó otra muestra de sangre para medir la respuesta a esta primera vacuna, acorde a la respuesta de los títulos siendo altos, se procedió a volver a medir cada 15 días hasta que los títulos vacunales bajaron a 1:32 nuevamente y así se procedió a aplicar la segunda dosis vacunal midiendo la respuesta de esta a los 15 días post vacuna y así se finalizó este método de vacunación.

- **Procedimiento para la obtención de suero en los pacientes:**

Se hizo una previa limpieza y desinfección del área yugular. Se realizó una venopunción y se extrajo 3ml de sangre. Se colocó la muestra sanguínea en un tubo sin anticoagulante y se mantuvo en reposo a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 5000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos y se extrajo el suero y se colocó en un vial estéril de 1.5 ml y se mantuvo en congelación a menos 20°C hasta su utilización.

- **Obtención de eritrocitos de cerdo y procedimiento para la Hemoaglutinación**

Se colectaron los eritrocitos de cerdo en solución Alserver's y se dejaron reposar 24 hrs. a 4 °C. Después se lavaron los eritrocitos 3 veces con Solución Salina Fisiológica Buferada pH: 7.0 a 2500 rpm por 10 minutos. Una vez lavados los

eritrocitos tuvieron una duración de 3 días, no se usaron si estaban hemolizados. Se diluyeron los eritrocitos con 0.1 % de albumina de suero bovino. Se recomendó usar microplacas en “V”, a un volumen de .05 µl e iniciar con la dilución 1:2. Se mantuvieron los eritrocitos en agua helada al agregarlos en la prueba. Una vez finalizado se dejó incubar la placa de 2-4 °C por 4 horas y se leyó la prueba cuando los controles habían sedimentado.

- **Procedimiento para la inhibición de la hemoaglutinación**

Se inactivaron los sueros a 56°C/30 minutos diluidos 1:10 en solución salina fisiológica bufferada. Se adsorbieron los eritrocitos: una parte de suero y una parte de eritrocitos en concentración al 50% por 2 horas a temperatura de laboratorio o toda la noche a 4°C. Se centrifugaron los eritrocitos y suero a 1500 rpm/5min. Se realizó la prueba con 25 µl en microplacas con pozo en “V”. Se utilizó la HA en 4-8 U Hemaglutinantes. Se dejaron Incubar por una hora a temperatura ambiente. Después se agregaron 50 µl de eritrocitos mantenidos en hielo a cada pozo (se usó control positivo y suero control negativo, además de sueros de los presuntivos). Una vez finalizado se dejó incubar la placa de 2-4 °C por 4 horas y se leyó la prueba cuando los controles se habían sedimentado (Carmichael *et. al.*, 1979).

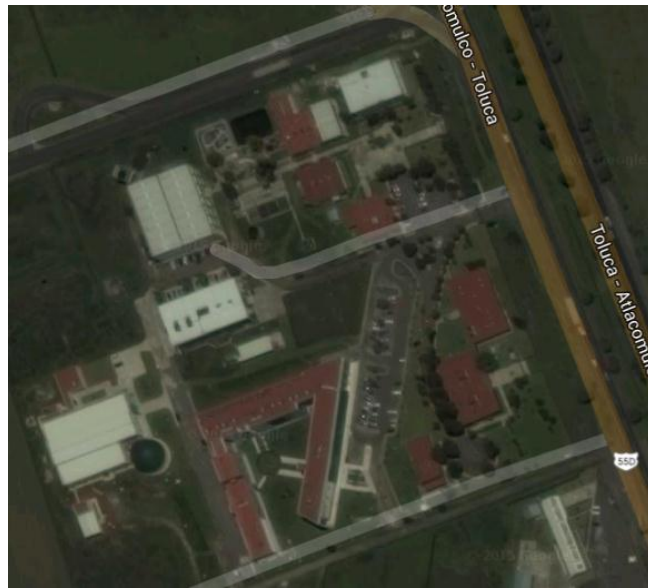
## **9. ANÁLISIS DE DATOS**

Los resultados de los grupos formados por los cachorros con procedimiento de VSPTA y VCPTA se presentaron mediante tablas y gráficas de barras.



## **10. LÍMITE DE ESPACIO**

Se desarrolla 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, de diferentes dueños de Ixtlahuaca, La Estación, San Ildefonso, Tenancingo, San Cayetano y de Toluca.

### 11. LÍMITE DE TIEMPO

ACTIVIDADES	MES																	
	2015												2016					
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8
Elaboración del protocolo																		
Aprobación del protocolo																		
Muestreo de camadas de cachorros para titulación de anticuerpos y aplicación del primer procedimiento de vacunación.																		
Muestreo de camada de cachorros para titulación de anticuerpos y aplicación del segundo procedimiento de vacunación.																		
Análisis de los títulos de anticuerpos en los diferentes procedimientos de vacunación.																		
Análisis de resultados																		
Redacción de tesis																		

## 12. RESULTADOS

Para determinar los ADM, se analizaron Ac IgG contra Parvovirus Canino en 39 perros, los cuales no habían recibido ninguna inmunización y no presentaban historia de algún tipo de infección; el rango de edad fue de 1 mes y medio a 2 meses y las razas más comunes en este grupo fueron: Pitbull, Chihuahua y Mestizo (Tabla 1).

Tabla 1. ADM de tipo IgG contra PVC-2 identificados en perros sin historia de vacunación (1 ½ a 2 meses de edad).

ID.	Raza	Títulos IgG ADM	ID.	Raza	Títulos IgG ADM
1	Pitbull blue	1:256	21	Pitbull blue	1:128
2	Chihuahua	1:128	22	Pitbull blue	1:128
3	Chihuahua	1:128	23	Mestizo	1:64
4	Chihuahua	1:128	24	Pitbull blue	1:64
5	Chihuahua	1:128	25	Cocker	1:32
6	Chihuahua	1:128	26	Cocker	1:32
7	Chihuahua	1:128	27	Cocker	1:32
8	Chihuahua	1:128	28	Cocker	1:32
9	Mestizo	1:128	29	Cocker	1:32
10	Mestizo	1:128	30	Chihuahua	1:32
11	Mestizo	1:128	31	Chihuahua	1:32
12	Mestizo	1:128	32	Chihuahua	1:16
13	Mestizo	1:128	33	Chihuahua	1:16
14	Mestizo	1:128	34	Chihuahua	1:16
15	Mestizo	1:128	35	Chihuahua	1:16
16	Mestizo	1:128	36	Pug	1:16
17	Mestizo	1:128	37	Bully	1:16
18	Pitbull blue	1:128	38	Pug	1:8
19	Pitbull blue	1:128	39	Pug	1:8
20	Pitbull blue	1:128			

De estos perros, 21/39 (54%) tuvieron títulos de anticuerpos 1:128, 2/39 (5%) 1:64, 7/39 (19%) 1:32, 6/39 (17%) 1:16, 2/39 (5%) 1:8 y 1/39 (3%) 1:256. El título más frecuente fue de 1:128 y el menos frecuente de 1:8 y 1:256 (Figura 3).

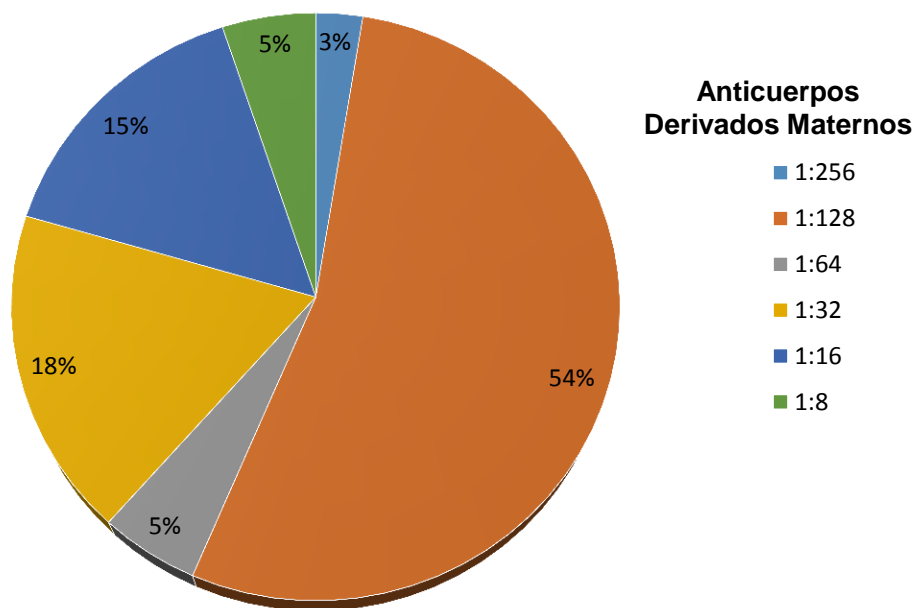


Figura 3. Anticuerpos Derivados Maternos IgG de perros de 1 mes y medio a 2 meses de edad. Los números ubicados a la derecha de la figura representan los diferentes títulos IgG contra CPV-2 identificados en esta población de perros.

Para determinar el tiempo en que estos ADM disminuyen, a un grupo de **5** perros se les valoró los títulos de IgG CPV-2 al día 0 (mes y medio de edad), al día 15 (dos meses) y al día 30 (dos meses y medio de edad).

En la primera muestra que corresponde al día 0, tres perros tuvieron 1:32 y dos perros 1:64, al día 15 todos los perros presentaron títulos de 1:32 y al día 30 el 60% de estos perros presentaron títulos de 1:16, disminuyendo una unidad (tabla 2 y figura 4).

Tabla 2. Determinación de la vida media de Ac. IgG Derivados Maternos en una camada de perros de 2 meses de edad.

ID.	Raza	Día 0	Día 15	Día 30
1	Cocker	1:64	1:32	1:32
2	Cocker	1:64	1:32	1:32
3	Cocker	1:32	1:32	1:16
4	Cocker	1:32	1:32	1:16
5	Cocker	1:32	1:32	1:16

### Anticuerpos Derivados Maternos

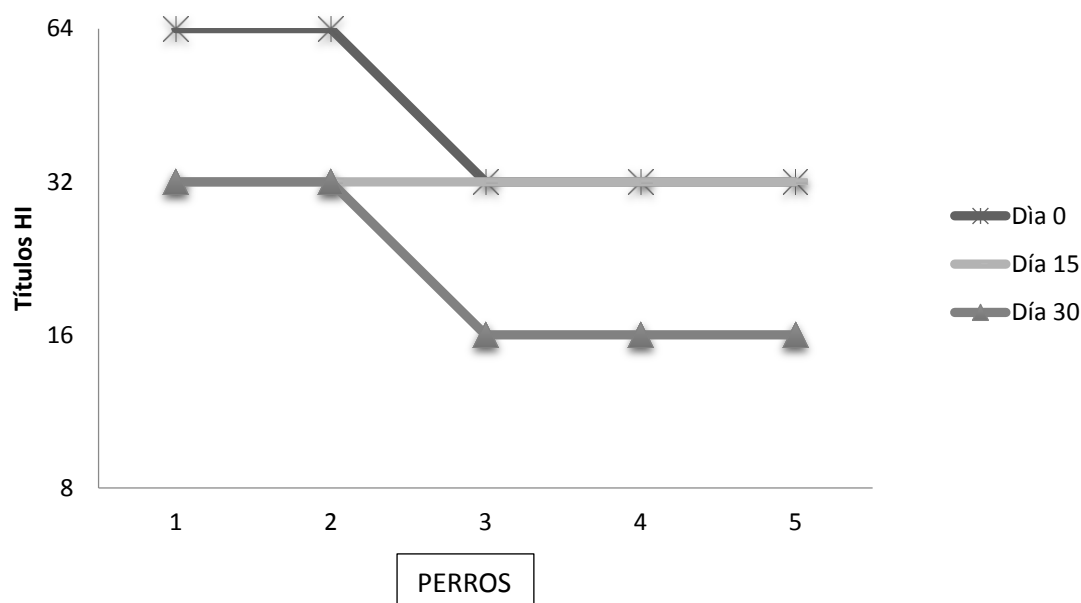


Figura 4.- Determinación de la vida media de Ac. IgG Derivados Maternos en 5 perros de dos meses de edad, mostrando el comportamiento individual el día 0,15 y 30. El día 15 todos los perros mostraron ADM de 1:32.

Para los dos procedimientos de vacunación, los 39 perros se clasificaron en dos grupos; en el primer grupo, **28** de los perros recibieron el tratamiento de VSPTA,

dividiéndose de la siguiente manera: seis perros recibieron una sola dosis de vacuna y 1 perro control al cual solo se le aplicó agua estéril. A los 15 días post vacunación 4/6 perros, presentaron títulos IgG de 1:64 y 2/6 de 1:128, y los datos del perro control se muestran con el número 7 en la gráfica, ambas barras de color verde (tabla 3 y figura 5).

Tabla 3. Títulos de IgG identificados 15 días después de la primera vacunación en perros VSPTA.

ID.	Raza	Ac. ADM	Respuesta a primera vacuna
1	Pitbull blue	1:64	1:64
2	Pitbull blue	1:128	1:64
3	Pitbull blue	1:128	1:64
4	Pitbull blue	1:128	1:64
5	Pitbull blue	1:128	1:128
6	Pitbull blue	1:256	1:128
7	Pitbull blue (control)	1:128	1:64* (sin vacunación)

\*Este registro de los títulos en el perro control corresponde a ADM, debido a que no recibió dosis de la vacuna, como en el caso de los otros perros.

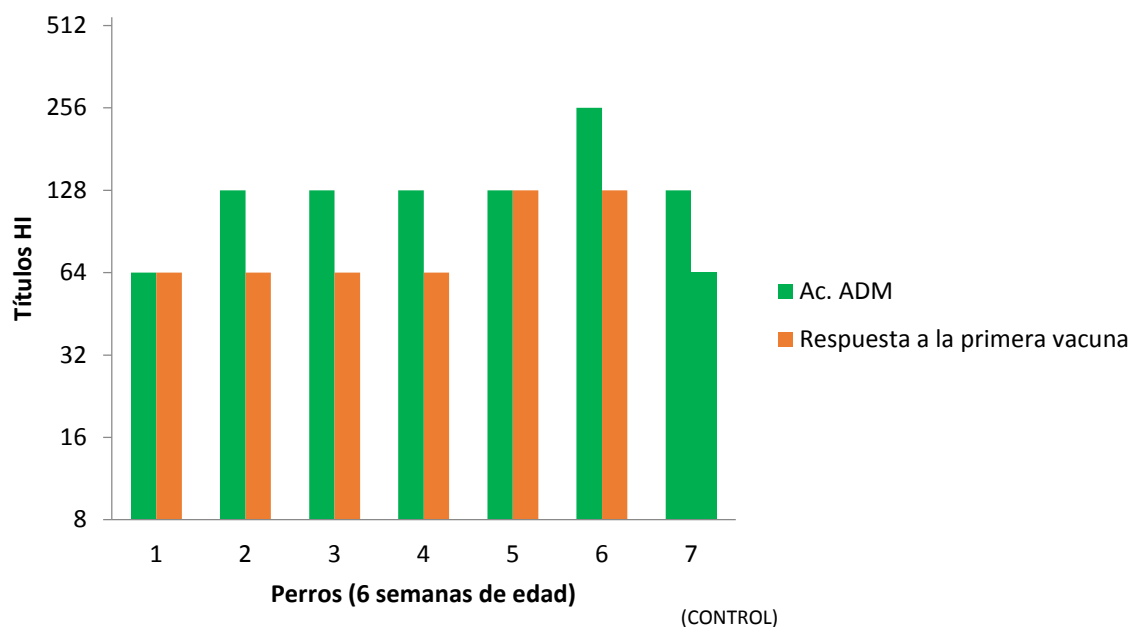


Figura 5. Vacunación VSPTA a una sola dosis vacunal, se midió la respuesta de Ac. 15 días después de la primera vacunación.

Los otros **17** perros recibieron dos dosis de vacuna y se incluyeron a este grupo 4 perros controles. El perro uno presentó títulos IgG ADM de 1:8, y como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:16 y a la segunda vacunación de 1:32, el perro dos presentó títulos IgG ADM de 1:16, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:32 y a la segunda vacunación de 1:64, los perros del tres al cinco, presentaron títulos IgG ADM de 1:128, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:64 y a la segunda vacunación de 1:64, los perros del seis al catorce, presentaron títulos IgG ADM de 1:128, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:64 y a la segunda vacunación de 1:128, los perros quince y dieciséis presentaron títulos IgG ADM de 1:128, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:64 y a la segunda vacunación de 1:256, el perro diecisiete presentó títulos IgG ADM de 1:16, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:64 y a la segunda vacunación de 1:256.

Los datos de los perros controles se muestran en la gráfica con las barras en color azul (figura 6).

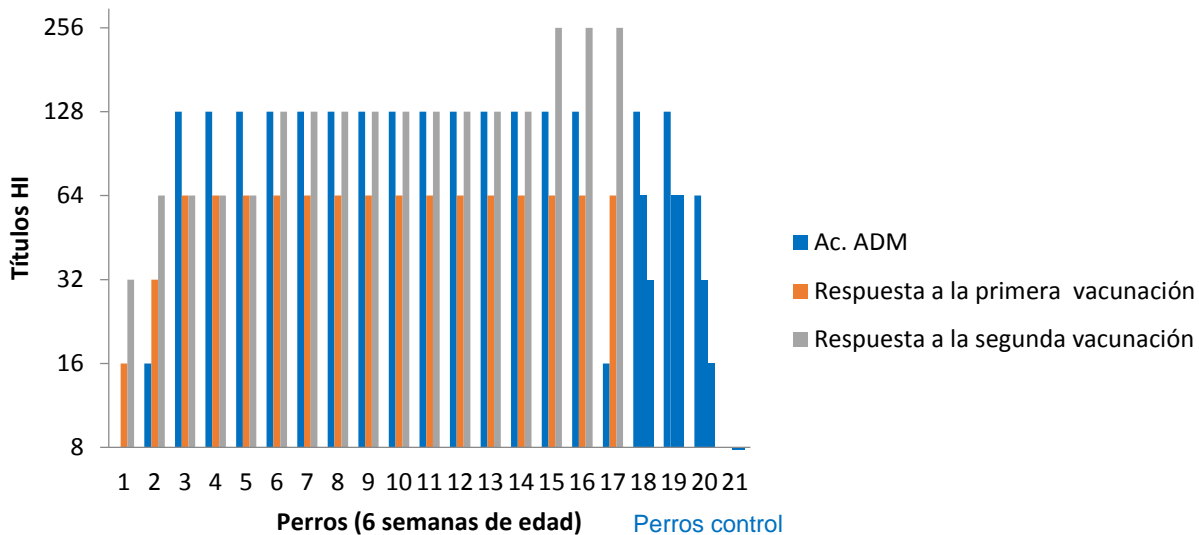


Figura 6. Vacunación VSPTA a dos dosis vacunal, se midió la respuesta de Ac. 15 días después de la primera y segunda vacunación.

En el segundo grupo, **11** perros recibieron el tratamiento de VCPTA, dividiéndose de la siguiente manera: **5** perros recibieron una sola dosis de vacuna. A los 15 días post vacunación, 4/5 presentaron títulos IgG de 1:128 y 1/5 de 1:256. Los datos del perro control se observan en la gráfica con el número 6, con barras en color amarillo (tabla 4 y figura 7).



Tabla 4. Títulos de IgG identificados 15 días después de la primera vacuna en perros con procedimiento VCPTA.

ID.	Raza	Ac. ADM	Respuesta a la primera vacunación
1	Chihuahua	1:16	1:128
2	Chihuahua	1:16	1:128
3	Chihuahua	1:16	1:128
4	Chihuahua	1:32	1:128
5	Chihuahua	1:32	1:256
6	Chihuahua (control)	1:16	1:8* (sin vacunación)

\*Este registro de los títulos en el perro control corresponde a ADM, debido a que no recibió dosis de la vacuna, como en el caso de los otros perros.

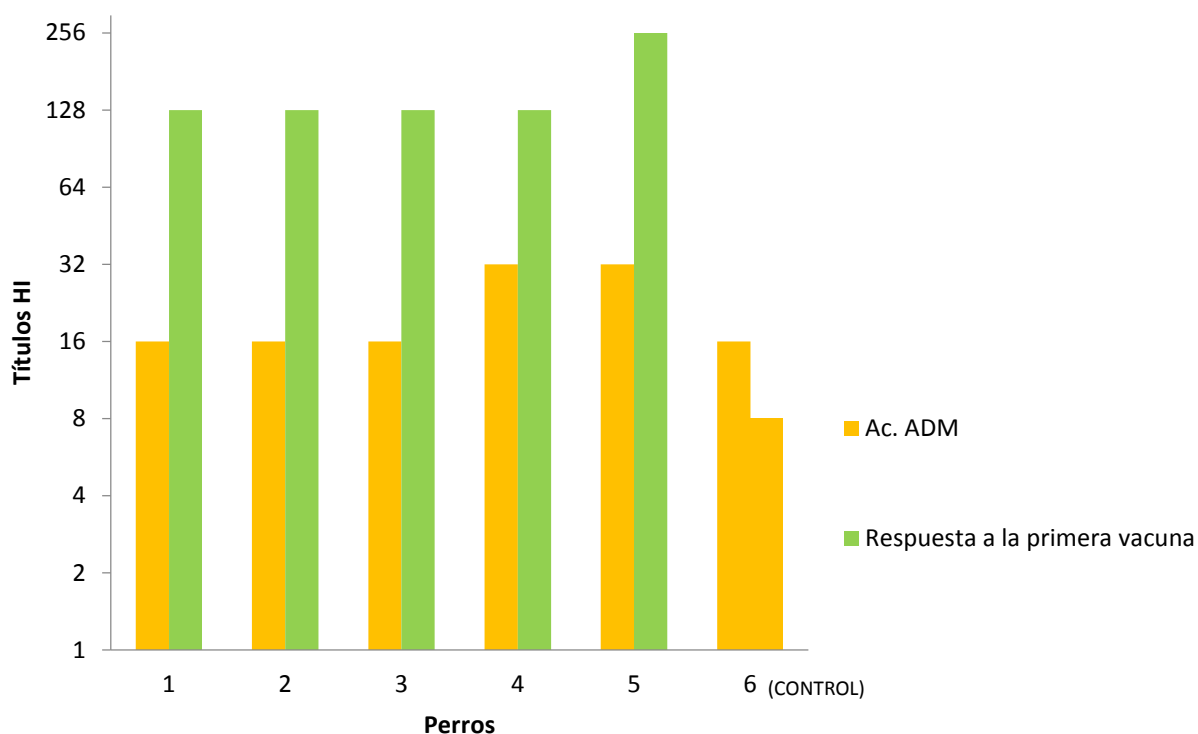


Figura 7. Las barras de color amarillo corresponde a los ADM, los cuales se midieron a las 8 semanas de edad, mientras que las barras de color verde corresponden a VCPTA, esta respuesta se midió 15 días después de la primera vacunación.

Los otros **5** perros recibieron dos dosis de la vacuna y el perro control se inyectó con agua estéril. El perro uno presentó títulos IgG ADM de 1:32, como respuesta a su primera y segunda vacunación se observaron títulos de 1:128, los perros dos y tres presentaron títulos IgG ADM de 1:32, como respuesta a su primera vacunación se observaron en ambos, títulos de 1:128 y a la segunda vacunación de 1:256, el perro cuatro presentó títulos IgG ADM de 1:16, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:256 y a la segunda vacunación de 1:256, el perro cinco presentó títulos IgG ADM de 1:16, como respuesta a su primera vacunación se observaron títulos de 1:128 y a la segunda vacunación de 1:512 ( figura 8).

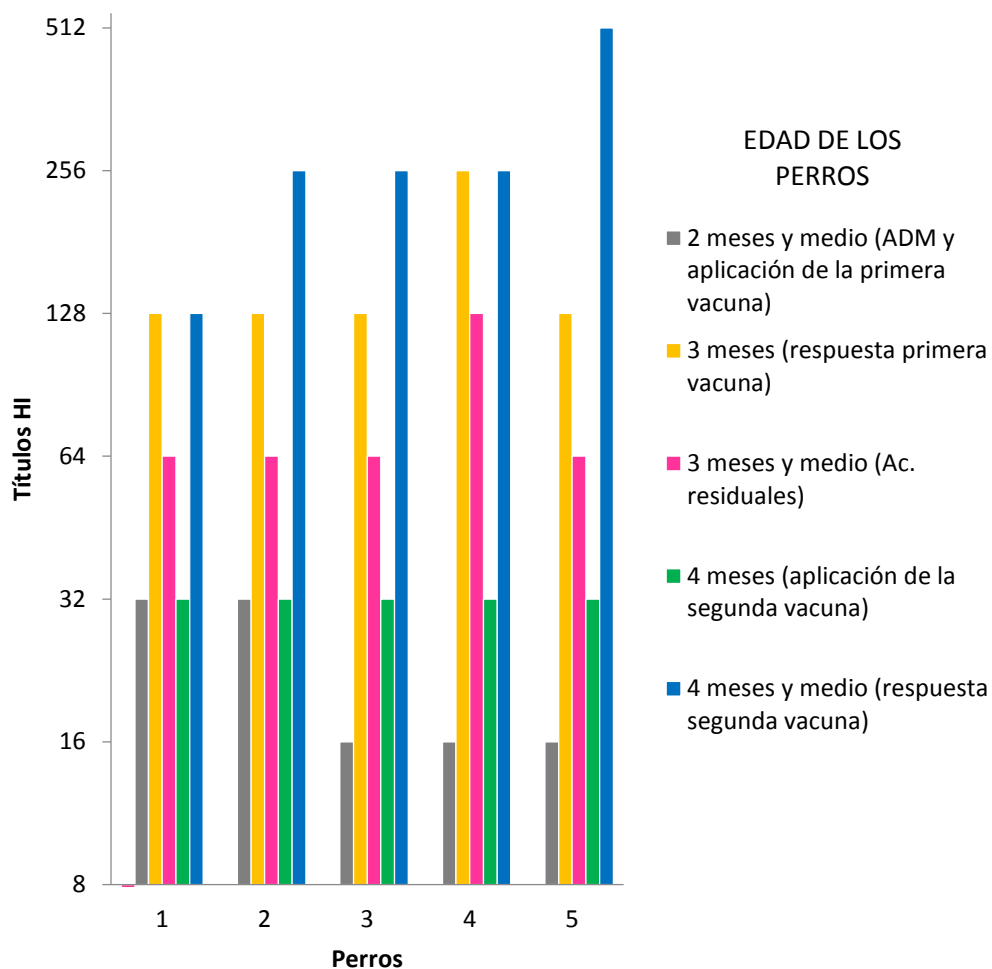


Figura 8. Vacunación VCPTA a dos dosis vacunal, se midió la respuesta de Ac. 15 días después de la primera y segunda vacunación. A los dos meses y medio se aplicó la primera dosis vacunal y a los 4 meses se aplicó la segunda dosis vacunal; el tiempo que se dejó pasar entre la primera y segunda aplicación vacunal dependió de identificar títulos  $\leq 1:32$  en cada perro.

### **13. DISCUSIÓN**

La vacunación se considera como el método más eficaz para la prevención de PVC-2 (Miranda y Thompson, 2016); sin embargo se han identificado factores que producen falla vacunal, por ejemplo la interferencia de anticuerpos maternos y el mal manejo de los calendarios de vacunación. Actualmente se considera que hay un procedimiento más adecuado de vacunación basado en la previa determinación de títulos anticuerpos que no causen interferencia con el antígeno vacunal (Day *et. al.*, 2016; Schultz, 1998).

Los ADM  $\geq 1:64$  es una de las principales causas de interferencia con el antígeno vacunal; en este trabajo el 62% de los pacientes que llegaron a su primera vacunación presentaron ADM de  $\geq 1:64$  y el 38% presentaron ADM de  $\leq 1:32$ , considerados como títulos apropiados para la vacunación; se sugiere que el procedimiento más adecuado para vacunar esté basado en la titulación de anticuerpos antes de la aplicación de la dosis vacunal, además se observó que aproximadamente cada 15 días los ADM disminuyen una unidad hemoaglutinante (aunque el tiempo que transcurrirá hasta que estos anticuerpos desaparezcan variará entre perros)). Como fue publicado por Böhm *et. al.*, 2004, Carmichael y Pollock, 1982, De Cramer *et. al.*, 2011, títulos  $\geq 1:64$  son protectores contra la enfermedad y además son interferentes al momento de la vacunación y Waner *et.al.*, 1996 y Pratelli *et. al.*, 2000 reportaron que los títulos  $\leq 1:32$  no son interferentes y se consideran ideales para aplicar la vacuna, sin embargo, no existen muchos estudios que reporten un parámetro estándar sobre los títulos de anticuerpos que produzcan interferencia sobre la vacunación, por lo tanto en este estudio, primero se determinaron los títulos ADM que poseen un grupo de perros al mes y medio de edad para después evaluar dos protocolos de vacunación y determinar cuál de ellos produjo en los animales títulos de anticuerpos apropiados para la prevención de la enfermedad.

Desde los 70's hasta ahora, el procedimiento más común para vacunar se basa en intervalos de tiempo, con la suposición de que la inmunidad podría disminuir en

algunos perros y asegurar la inmunidad en la población, todos los perros requieren la revacunación, ya que no era práctico poner a prueba a cada animal para medir sus títulos de anticuerpos y además no existían las pruebas necesarias para este fin. También esa recomendación se basa en un conocimiento general de la inmunidad vacunal, especialmente la importancia de la memoria inmunológica y en la duración de la protección después de las infecciones subclínicas o clínicas (Schultz, 1998). En relación a esto se siguió el protocolo de vacunación sin previa titulación de anticuerpos en un grupo de perros a los que se aplicó una sola dosis de vacuna a las 6 semanas de edad y se observó que 40% de los perros vacunados no mostraron respuesta (incremento de títulos de Ac) y 60% de éstos mostraron franca interferencia, éstos llegaron con Ac ADM IgG  $\geq 1:64$ , que de acuerdo a la literatura se consideran como títulos interferentes al momento de la vacunación, pero continúa en discusión. Después, se vacunaron 17 perros a las 6 y 8 semanas de edad. El 54% de estos perros mostraron franca interferencia a la primera vacuna y no muestran respuesta a la segunda vacuna quedando con títulos de 1:64, 28% seroconvirtieron a la segunda vacuna quedando con títulos de 1:128, 9% seroconvirtieron a la segunda vacuna quedando con títulos de 1:256 y solo 3% seroconvirtieron a la primera y segunda vacuna. Siendo así, solo 37% tuvieron títulos de Ac IgG protectores contra PVC-2 con dos vacunas.

Aunado a esto, Cramer, 2011, publicó un estudio en donde vacunaron a 128 perros de diferentes razas a las 4, 6, 9 y 12 semanas de edad. La mayoría seroconvirtieron en la segunda vacuna, otros seroconvirtieron en la tercera vacuna y algunos no seroconvirtieron ni en la segunda ni en la tercera vacuna. Los perros que seroconvirtieron tuvieron títulos máximos de 1:120.

Como se sabe, en la mayoría de los cachorros, la inmunidad pasiva habrá disminuido entre las 8-12 semanas de edad a un nivel que permite la inmunización activa. Los cachorros con títulos bajos de ADM pueden ser vulnerables (y capaces de responder a la vacunación) a una edad temprana, mientras que otros pueden tener títulos altos de ADM que son incapaces de responder a la vacunación hasta

≥ 12 semanas de edad (Friedrich y Truyen 2000). Por lo tanto, la recomendación para la vacunación inicial es basada en los títulos ADM del cachorro. Siendo esto, el inicio de la vacunación y el número de vacunaciones, será determinado por los títulos de anticuerpos presentes en el animal (Day *et. al.*, 2016). En relación a esto seguimos el protocolo de vacunación con previa titulación de anticuerpos en un grupo de perros que se les aplicó una sola dosis de vacuna a las 8 semanas de edad con títulos ADM ≤1:32 y observamos que el 100% de los perros muestran respuesta a la primera vacunación alcanzando títulos 1:128 y 1:256 protectores contra PVC-2. Se vacunó a otro grupo de 5 perros que a las 10 y 16 semanas de edad presentaron Ac. ≤1:32, el 100% de éstos seroconvirtieron a la primera vacuna, alcanzando títulos mínimos de 1:128 y máximos de 1:256, se dejó un intervalo de 6 semanas (tiempo en que disminuyeron los títulos vacunales a 1:32) para aplicar la segunda vacuna y nuevamente el 100% de los perros seroconvirtieron alcanzando títulos mínimos de 1:128 y máximos de 1:512, considerados en la literatura como títulos protectores contra la enfermedad. A los perros del experimento solo se les midió dos vacunas por la disponibilidad de tiempo marcado por los dueños.

Autores como Waner, 1996 y Pratelli, 2000, publicaron que de los cachorros vacunados con ADM de 1:10 a 1:40, el 100% seroconvirtieron a la primera vacuna. Por lo tanto, es importante realizar calendarios personalizados y dejar de correlacionar la edad con los títulos de anticuerpos que presentarían los perros, en el caso de los cachorros éste dependerá del estado fisiológico de la madre, el número de cachorros de la camada, si adquirieron calostro, ya que la tasa de títulos de anticuerpos va a variar incluso dentro de la misma camada, así que el tiempo que transcurrirá hasta que estos anticuerpos desaparezcan variará en cada uno de los cachorros y el procedimiento más apropiado para vacunar es midiendo los ADM IgG de los pacientes que llegan a su primera vacunación y con base a esto, se debe aplicar la vacuna en perros con títulos ≤1:32 para obtener anticuerpos protectores contra la enfermedad.

Recientemente, se han producido avances en la disponibilidad de pruebas serológicas rápidas y sencillas, como es las pruebas de inmunocromatografía y la Inhibición de la Hemoaglutinación, que nos permiten detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos para PVC-2 en perros individuales y así poder ofrecer a nuestros clientes una nueva alternativa para vacunar y revacunar a sus mascotas, con el objetivo de tener mejor control de la enfermedad y más seguridad en saber si realmente se obtiene una respuesta eficaz al momento de la vacunación.

## **14. CONCLUSIONES**

- 1.- La mayoría de los cachorros (61.5%) de este estudio presentaron títulos ADM  $\geq 1:64$  al mes y medio o dos meses de edad, los cuales son interferentes al momento de la vacunación.
- 2.- Los perros que recibieron su primera vacunación sin previa titulación de anticuerpos no mostraron respuesta apropiada a la inmunización; probablemente por la interferencia de los ADM.
- 3.- Este mismo grupo de perros a la segunda inmunización presentaron una respuesta de anticuerpos débil e inconsistente, por lo que se consideró que el grupo de animales a la segunda dosis vacunal no alcanzó el estado inmune necesario para la protección contra la enfermedad.
- 4.- Los perros que recibieron su primera vacunación con previa titulación de anticuerpos ( $\leq 1:32$ ) mostraron una respuesta de títulos de anticuerpos de 1:128 a 1:256, por lo tanto en este trabajo consideramos que títulos de anticuerpos  $\leq 1:32$  no son interferentes a la vacunación.
- 5.- La segunda vacunación para este grupo de perros se realizó 4 semanas posteriores a la aplicación de la primera vacuna, porque fue el tiempo necesario para que los perros volvieran a presentar títulos de anticuerpos  $\leq 1:32$  y el 100% de estos perros presentaron incremento de títulos IgG contra PVC-2 hasta de 1:512, los cuales se consideran títulos de anticuerpos protectores contra la enfermedad.
- 6.- De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo el mejor procedimiento para vacunación contra parvovirus canino es con previa titulación de anticuerpos considerando que los cachorros deben de presentar títulos  $\leq 1:32$  y que por lo tanto los calendarios de vacunación realizados en base a periodos de tiempo no son prácticos para conseguir la inmunización contra la enfermedad.



## **15. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

1. Barsuto AF, Marín HJ. (2003): Diplomado a distancia en medicina, cirugía y zootecnia en perros y gatos módulo 2: enfermedades infecciosas. Universidad Autónoma del Estado de México.
2. Biron C, Nguyen K, Pien G, Cousens L, Salazar-Mather T. (1999): Natural killer cells in anti-viral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Ann Rev Immunol.*, 17: 189-220.
3. Billiau A. (2006): Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17:381-409.
4. Blanco M, Orden J, Cutuli M, Doménech A, Domínguez A, Gómez E, Miró G, Simarro I. (2006): Inmunología y enfermedades infecciosas del perro y el gato. SERVET.
5. Buonavoglia C, V Martella, A Pratelli, M Tempesta, A Cavalli, D Buonavoglia, G Bozzo, G Elia, N Decaro, L Carmichael. (2001): Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology.*, 82: 3021-3025.
6. Carmichael, L. E., Joubert, J. C., Pollock, R. V. (1983): A modified live canine parvovirus vaccine: II immune response. *Cornell Vet.*, 73: 13-19.
7. Cooper, B (1979): Canine viral enteritis II. Morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. *Cornell Vet.*, 69: 134-144.
8. Cotmore F, Agbandje-McKenna M, Chiorini J, Mukha D, Pintel D, Qiu J, Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison A. (2014): The family Parvoviridae. *Virology Division News.* 159: 1239- 1247.
9. Cramer K, 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.
10. Cureton D, Harbison C, Cocucci E, Parrish C, Kirchhausen T. (2012): Limited Transferrin Receptor Clustering Allows Rapid Diffusion of Canine

- Parvovirus into Clathrin Endocytic Structures. Journals.ASM.org., 5330-5340.
11. Chappuis G. (1998): Neonatal immunity and immunization in early age: lessons from Veterinary Medicine, Vaccine. 16 (14): 1468- 1472.
  12. Chang S., Sgro J. and Parrish C. (1992): Multiple Amino Acids in the Capsid Structure of Canine Parvovirus Coordinately Determine the Canine Host Range and Specific Antigenic and Hemagglutination Properties. 66 (12): 6858-6867.
  13. Day M. (2007): Immune System Development in the dog and cat: J. Comp. path. Vol. 137, S10-S15.
  14. Day M, Horzinek M, Schultz R, Squires R. (2016): Guidelines for the vaccination of dogs and cats. Compiled by the vaccination guidelines group (VGG) of the world small animal veterinary association (WSAVA). Journal of Small Animal Practice. Vol. 57.
  15. Decaro N., Buonavoglia C. (2011): Canine parvovirus- A review epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Veterinary Microbiology. 155: 1-12.
  16. Decaro N, Desario C, Addi D, Martella V, Vieira M, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. (2007): Molecular Epidemiology of canine parvovirus, Europe. Emerging Infectious Disease. Vol. 13.
  17. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza V, Nardi M, Buonavoglia C. (2008): Evidence for immunization failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. New Microbiologica. 31, 125-130.
  18. 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. Department of Animal Health and Well-being. Vol. 33 : 261-267

19. Flores Castro R. (1987): Parvovirus canina y aspectos de inmunización. *Ciencia Veterinaria*. 4: 132-153.
20. Truyen, U. (2000): Efficacy of parvovirus vaccines and effectiveness of two vaccination protocols. *Journal Praktische Tierarzt*. Vol. 81: 988-994
21. Gallo M, Nora M, Bucafusco D, Fogel F, Patricia R, La Torre J. (2009): Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of Virological Methods* 159: 141–145.
22. Goddard A, Lisewitz A. (2010): Canine Parvovirus. *Vet. Clin. Small Anim*. 40: 1041-1053.
23. Gomez N, Guida N. (2010): Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. 1ª edición., Intemédica. Buenos Aires Argentina.
24. Gonda G. (2015): Understanding the Major Histocompatibility Complex and Immunoglobulin Genes. *Molecular and Quantitative Animal Genetics*.
25. Greene E. (2012): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4ta Edición. ELSEVIER
26. Gutiérrez P. (2010): *Inmunología veterinaria*. 1ª ed., Manual Moderno, México.
27. Haligur M, Ozmen O, Sezer K. y Sahinduran S. (2009): Clinical, Pathological and Immunohistochemical Findings in Diarrhic Dogs and Evaluation of Canine Parvoviral and Coronaviral Enteritis. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 8 (4): 720-725.
28. Hans-Joachim S, Moos M. (2006): *Vacunación de los animales domésticos* 2ª ed., Acribia, Alemania.
29. Hayes M, Russell R, Baibiuk L. (1979): Sudden death in young does with myocarditis caused by parvovirus. *J. Am. Vet. Assn.*, 174: 1197-1203
30. Hoelzer K., Colin R. Parrish (2010): The emergence of parvoviruses of carnivores. *EDP Sciences.*, 41:39.

31. HogenEsch y Thompson S. (2010): Effect of Ageing on the immune Response of Dogs to Vaccines. *J. Comp. Path.*, 142: S74-S77.
32. Hoskins J. (2009): *Canine parvovirus: an update on variants*. DVM: The News magazine of Veterinary Medicine., 40(8), 6S-8S.
33. Hoskins J. (2000): *Enteritis viral canina en Enfermedades Infecciosas en perros y gatos*. 2<sup>a</sup> ed., McGraw- Hill.
34. Kapil S, Cooper E, Lamm C, (2007): Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol.*, 45 (12): 4044-7.
35. Kruth A, Ellis A. (1998): Vaccination of dogs and cats: General principles and duration of immunity. *Can Vet J.*, Vol. 39.
36. Lamm C, Rezabek G. (2008): Parvovirus infection in domestic companion animals. *Veterinary Clinical Small Animal Practice*. 38: 837-850.
37. Larson L, Schultz D. (1997): Comparison of selected canine vaccines for their ability to induced protective immunity against canine parvovirus infection. *Am J Vet Res.*, 58: 360-363.
38. Martella V, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. (2005): Surveillance activity for canine parvovirus in Italy. *J Vet Med*. 52: 312-315.
39. Mason MJ, Gillert NA, Muggenburg BA. (1987): Clinical and pathological and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed Beagle colony: 1978-1985. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 23, 183-92.
40. Meunier P, Cooper J, Appel G, y Slauson O. (1985): Pathogenesis of Canine Parvovirus Enteritis: The Importance of Viremia. *Vet. Pathol.*, 22: 60-71.
41. Menyu T, Fei L, Shun Ch, Mingshu W, Anchun Ch. (2015): Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology Journal.*, 12:114.
42. Miranda C y Thompson G. (2016): Canine parvovirus: the worldwide occurrence of antigenic variants. *Journal of General Virology*. 21:46:04.

43. Mohan R, Mukhopadhyay H, Thanislass J, Antony P, Pillai R. (2010): Isolation, molecular characterization and phylogenetic analysis of canine Parvovirus. *Infection, Genetics and Evolution.*, 10 (2010) 1237–1241.
44. Mori L, de Libero G. (2008): Presentation of lipid antigens to T cell. *Immunol Letters.*, 117: 1-8.
45. Nandi S, Manoj K. (2010): Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian Virology Society.* 21: 31-44.
46. Narayanan S, Kumar A, Chug PK, Bhawn S, Yadav RK, Sharma ML. (2001): Strain characterization of Indian isolates of canine parvovirus by PCR-RFLP. *J Remount Vet Corps.* 40:67–74
47. Nelson R, Couto C. (2010): *Medicina interna.* 4<sup>a</sup> ed., Elsevier.
48. Sundaran S, Ambily R, Sreeja R, Nair and Mangattumuruppel Mini. (2015): Utility of a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compared with polymerase chain reaction. *Veterinary World* 8 (4); 523-526.
49. Pedroza-Roldán C, Varinia P, Claudia Ch, Darwin E, Raül C, Mario L. (2015): Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.*, 27: 107-111.
50. Pollock R, Carmichael L. (1982): Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: Transfer, decline, and interference with vaccination. *J. Am. Vet. Med. Assn.*, 180: 37-42.
51. Pratelli A, Cavalli A, Normanno G, de Palma M, Pastorelli G, Martella V, y Buonavoglia C. (2000): Immunization of pups with Maternally Derived Antibodies to Canine Parvovirus (CPV) Using a Modified-Lived Variant (CPV-2b). *J. Vet. Med.*, 47: 273-276.
52. Prittie J. (2004): Canine Parvoviral Enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *Clinical Practice Review.*, 14: 167-176.
53. Quinn D. J. (2011). *Veterinary microbiology and Microbial Disease.*, Blackwell, Londres.

54. Robinson V, Wilcox G, Flower R. (1980): Canine Parvoviral disease: Experimental Reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of myocarditis. *Vet. Pathol.*, 17: 589-599.
55. Schoeman J, Goddard A, Leisewitz A. (2013): Biomarkers in canine parvovirus enteritis. *New Zealand Veterinary Journal.*, 6, 217-222.
56. Schultz RD. Current and Future Canine and feline vaccination programs. *Vet Med* 3: No. 3, 233-254, 1998.
57. Tizard R. (2009): *Inmunología Veterinaria.*, 8<sup>a</sup>. ed., ELSEVIER
58. Vega R. (2009): Complejo Mayor de Histocompatibilidad. *Rev. Fac. Med. UNAM.*, 52: 2.
59. Waner T, Naveh A, Wudovsky H, y Carmichael E. (1996): Assessment of maternal antibody decay and response to canine parvovirus vaccination using a clinic-based enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 427-432.
60. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. (2009): The aging of the immune system. *Transpl Int.*, 22(11):1041-1050.
61. Wilson S, Siedek E, Thomas A, King V, Stirling C, Plevová E, Salt J, Sture G. (2014): Influence of maternally-derived antibodies in 6-week old dogs for the efficacy of a new vaccine to protect dogs against virulent challenge with canine distemper virus, adenovirus or parvovirus. *ELSEVIER.* 107-113; 1879-4378.