



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Título: Obtención de un suero hiperinmune polivalente
contra enfermedades virales en caninos.

Tesis presentada en Opción al Título Académico de Máster en Biotecnología.
Mención Industrial.

Autor: Lic. Yenís Del Toro Yen.

Tutor: DCV. Digna Contreras González
MsC. Humberto J. Morris Quevedo.

Año 2005.
“Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas”

*“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente.
No os desaliente ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las
naciones.
Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas.
Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? Y después, a medida
que vayáis progresando: ¿Qué he hecho por mi patria?
Hasta que llegue el día que tenéis la inmensa satisfacción de pensar que
habéis contribuido de alguna manera al progreso y al bienestar de la
humanidad”.*

Luis Pasteur

Agradecimientos

A mis profesores que me han educado y formado.

A mi estimada tutora D.C.V. Digna Contreras González por ser ejemplo de sabiduría, y por confiar en mí.

Al MSc. Humberto J. Morris Quevedo, por su incondicional ayuda, por su exquisitez en el trabajo y por ser fuente de conocimiento.

A todo el colectivo de profesionales y técnicos de LABIOFAM, que siempre estuvieron pendiente del desarrollo de este trabajo, en especial a Tania Campos, Orbe Luis, Clara Noriega, Regla T., Verónica, Nayla, Obsiel, Tony, Llanes, y a Julio López y su equipo de trabajo.

Al D.C. Mario Cruz por su valiosa ayuda.

A mi querida mamá porque ella lo es todo.

A mis hermanos y a mi gran familia por su constante preocupación.

A Fabio por su comprensión y paciencia.

A mis amistades que en los momentos difíciles siempre estuvieron conmigo y con las que compartí momentos de tristeza y alegría, en especial a Reyna, Yamy, Ariadne, Margarita, Dulce, Alexander, Alberto y George.

A Margarita una vez más, por la excelente encuadernación del trabajo y por tanto y todo, mi agradecimiento especial.

A todos, gracias.

A mi querida mamá, por ser fuente inspiración....

Índice.

Contenidos	Pág.
Introducción	1
Capítulo 1: Revisión bibliográfica	3
1.1 Consideraciones generales sobre las principales enfermedades caninas de etiología viral.	3
1.1.1 Moquillo canino.	3
1.1.2 Hepatitis canina.	5
1.2.3 Parvovirus canina.	8
1.2 Inmunoglobulinas y su papel en la inmunidad.	10
1.2.1 Generalidades.	10
1.2.2 Características de la respuesta inmunitaria humoral.	11
1.2.2.1 Dinámica de los anticuerpos en la especie canina.	12
1.2.3 Obtención de anticuerpos.	13
1.3 Sueros hiperinmunes. Aplicación.	14
1.4 Estrategias de prevención y control de las enfermedades virales caninas.	15
Capítulo 2: Materiales y Métodos	20
2.1 Materiales	20
2.1.1 Equipamiento básico.	20
2.1.2 Medios nutritivos, productos biológicos y sistemas biológicos	20
2.2 Métodos	21
2.2.1 Obtención del suero polivalente hiperinmune contra las principales enfermedades virales en perros (Moquillo, Hepatitis y Parvovirus canina)	21
2.2.1.1 Inmunógenos.	21
2.2.1.2 Animal donante.	21
2.2.1.3 Esquema de inmunización.	21
2.2.1.4 Sangrados parciales, obtención y filtración del suero polivalente hiperinmune.	21
2.2.2 Titulación de anticuerpos por la técnica de seroneutralización	22
2.2.3 Determinación de esterilidad.	24
2.2.4 Determinación de proteínas en el suero hiperinmune.	24
2.2.5 Determinación de mertiolato residual.	25
2.2.6 Determinación de pH en el suero hiperinmune	25
2.2.7 Determinación de la inocuidad específica.	25
2.2.8 Determinación de la inocuidad inespecífica.	26
2.2.9 Determinación de la eficacia del inmunosuero en perros enfermos con parvovirus canina.	26
2.2.10 Consideraciones estadísticas.	27
Capítulo 3: Resultados y Discusión.	28
3.1 Esquema de inmunización.	28
3.1.1 Titulación de anticuerpos mediante la técnica de seroneutralización.	30
3.1.1.1 Titulación de moquillo canino por SN.	30
3.1.1.2 Titulación de hepatitis y parvovirus canino por SN.	31
3.2 Evaluación de los indicadores de calidad del inmunosuero.	32
3.2.1 Determinación de esterilidad.	32
3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas por Biuret.	32
3.2.3 Determinación de mertiolato	32
3.2.4 Determinación de pH	33
3.3 Resultados de las pruebas de inocuidad.	33
3.3.1 Determinación de inocuidad específica.	33
3.3.2 Determinación de inocuidad inespecífica (toxicidad)	34
3.4 Evaluación de la eficacia del suero hiperinmune en perros enfermos con parvovirus.	34
3.5 Valoración Económica.	38
Conclusiones	39
Recomendaciones	40
Bibliografías	41
Anexos	

RESUMEN

En el presente trabajo, a partir de las cepas virales de moquillo, hepatitis y parvovirus canino, se hiperinmunizó un bovino para obtener un inmunosuero con efecto terapéutico contra estas enfermedades de amplia circulación en Cuba. La especie animal seleccionada y el esquema de inmunización desarrollado con cuatro inoculaciones subcutáneas de la mezcla viral, resultaron apropiadas para la obtención de volúmenes de suero de 1L con títulos elevados de anticuerpos contra los tres virus inoculados, particularmente contra el parvovirus canino con valores de 504 U/mL. Los tres lotes producidos cumplieron con las especificaciones de calidad microbiológica, bioquímica y físico-química, establecidas para este tipo de producto. Los ensayos de inocuidad específica e inespecífica resultaron satisfactorios, al no observarse en los animales reacciones adversas de carácter local o sistémico. La administración del producto a perros Beagles enfermos con la parvovirus conllevó a una recuperación del 80%, siendo su eficacia superior a la del tratamiento paliativo convencional (37.5%). Con la metodología productiva desarrollada, la obtención de 1L de suero aporta utilidades de \$ 3293.25 MN.

ABSTRACT

This thesis presents the hyperimmunization of a bovine, using the viral strains of distemper, hepatitis and canine parvovirus to obtain an immunoserum with therapeutic effect against the diseases mentioned, which are very common in Cuba. The animal species chosen and the immunization scheme developed with four subcutaneous inoculations of the viral mixture, were appropriate for obtaining 1L serum volumes having high titres of antibodies against the three virus inoculated, particularly against canine parvovirus, with values of 504 U/mL. The three lots produced met the microbiological, biochemical and physicochemical quality requirements established for this type of product. The specific and unspecific innocuousness tests were satisfactory, for no adverse reactions of local or systemic character were observed in the animals. The administration of the product to Beagles dogs with parvovirus produced a recovery of 80 %, its efficacy being greater than that of the conventional palliative treatment (37.5%). Employing the production methodology described, the obtaining of 1L of serum provides profits of \$ 3293.25 CUP.

INTRODUCCIÓN

La Biotecnología en Cuba en el sector Agropecuario, resulta promisorio y es una rama en ascenso; posibilitando entre otras cosas, la obtención y la aplicación de medicamentos biotecnológicos en el campo de la veterinaria en función de garantizar el bienestar de la salud animal.

Los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), como entidad productora de más del 95% de los medicamentos de uso veterinario empleados en el país, desarrolla productos farmacéuticos y biológicos que permiten un nivel epidemiológico óptimo, garantizando que los índices de morbilidad, mortalidad y letalidad, sean bajos o estén dentro de los parámetros permisibles. Sin embargo, la situación económica actual que afronta nuestro país, y las limitaciones de acceso al mercado exterior, han frenado en gran medida la elaboración de vacunas contra enfermedades infecciosas tanto en especies de interés económico como afectivo.

Como reflexión importante debemos asumir que nuestras ciudades comienzan a estar superpobladas de animales domésticos, cuya salud es nuestra obligación y que los mecanismos de contagio en cualquier enfermedad infecciosa tiene una relación muy estrecha con la densidad de animales. Además, en nuestro país existen centros regionales de adiestramiento canino, que utilizan a éstos con fines policiales (rastreo de drogas, búsquedas de pertenencias), así como en labores de rescate y salvamento.

La crianza y explotación canina es afectada por muchas enfermedades. Dentro de ellas, el Moquillo Canino por su elevada contagiosidad y morbiletalidad ha sido punto común de diversas investigaciones. Esta entidad se encuentra referida en todo el país y todas las razas son susceptibles, pero las refinadas lo son mucho más que las bastardas. A nivel mundial causa más morbiletalidad que cualquier otro virus que infecte a los perros. Esta varía del 25-75% y la fatalidad asociada a menudo alcanza 50-90% dependiendo de la cepa de virus actuante. Solamente la morbiletalidad en Cuba es superada por la Parvovirus Canina y la Rabia lo supera en lo que a mortalidad se refiere (Schoning, 1996).

Clínicamente parecida al Moquillo canino, la Hepatitis viral canina, descubierta en 1947, es una enfermedad aguda altamente contagiosa y fatal, producida por el *Adenovirus canino* tipo 1.

Por otra parte, el *Parvovirus canino* (CPV) fue identificado por primera vez en 1978 como el agente etiológico de la gastroenteritis hemorrágica y desde entonces ha causado una alta morbilidad y mortalidad en el mundo entero.

La parvovirus canina es una enfermedad cosmopolita y en nuestro país, posiblemente sea la más frecuente en la población de cachorros, superando al resto de las enfermedades infecciosas más diseminadas, como la hepatitis infecciosa, moquillo y leptospirosis canina. Esta causa una alta morbilidad y aunque Schultz (1998), plantea que la morbilidad es menor del 20% y la mortalidad inferior al 5%, en nuestro país superan estas cifras.

En la actualidad se ha incrementado en este sentido, el empleo de los sueros hiperinmunes, tanto en el tratamiento como en la prevención de muchas enfermedades infecciosas. Estos bioproductos representan para la medicina veterinaria una nueva y formidable arma en la lucha contra dichas enfermedades.

Es por ello, que el Laboratorio de Virología de la Empresa de Control de la Calidad del Grupo Empresarial LABIOFAM, se ha propuesto entre sus líneas de trabajo la elaboración de un suero hiperinmune heterólogo no existente en el mercado nacional, con la finalidad de disponer de un biopreparado contra las principales enfermedades caninas de etiología viral circulantes en nuestro país: Moquillo, Hepatitis y Parvovirus canina.

Teniendo en cuenta estos elementos, nos propusimos en el trabajo la siguiente hipótesis:
“Si se desarrolla un esquema de inmunización apropiado para la obtención de un suero hiperinmune de origen bovino contra los virus del Moquillo, Hepatitis y Parvovirus canino, entonces sería posible disponer de un biopreparado nacional que confiera inmunidad pasiva contra las principales enfermedades caninas, que circulan actualmente en nuestro país”.

OBJETIVO GENERAL

- Producir un suero hiperinmune que confiera inmunidad pasiva contra las principales enfermedades virales caninas de circulación en Cuba .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un esquema de inmunización en bovinos para la obtención de sueros hiperinmunes polivalentes contra los virus causantes del Moquillo, Hepatitis y Parvovirus canina.
- Evaluar los indicadores de calidad microbiológica, bioquímica y físico-químico del suero hiperinmune polivalente.
- Determinar la inocuidad específica e inespecífica del suero hiperinmune polivalente.
- Evaluar la eficacia del suero hiperinmune en la recuperación de los animales enfermos con la parvovirus canina.

CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Consideraciones generales sobre las principales enfermedades caninas de etiología viral.

1.1.1 Moquillo canino

El Moquillo o Distemper canino, también denominado enfermedad de Carré en honor al científico que lo descubrió en el año 1905, se conoce como Catarro del perro, Muermo del perro, Peste canina y para los de habla inglesa se denomina Canine distemper. Representa una enfermedad importante y generalmente mortal no sólo para la especie canina, sino para varias especies de carnívoros domésticos desde hace aproximadamente doscientos años (Adelus y col.1998).

La enfermedad del moquillo canino es un padecimiento viral de alta prevalencia, alta morbilidad y alta mortalidad que se presenta en todo el mundo y afecta a caninos en cualquier etapa de la vida. Sin embargo, los cachorros de menos de un año de edad son más susceptibles, así como animales que no han llevado un programa de inmunización adecuado (Blixenkrone y col. 1998).

El virus del moquillo canino (VMC) está muy relacionado con el virus del sarampión (VS), el virus de la peste bovina, el virus de la peste de los pequeños rumiantes, el virus del moquillo de la foca, y el virus del moquillo del delfín. Todos son clasificados como *Morbilivirus* dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Es un virus relativamente grande (150-300nm de diámetro) con una única cadena de RNA y una enzima RNA polimerasa, con una nucleocápside de simetría helicoidal y cubierta lipoprotéica (Appel, 1996).

Además del virus, hay diversas especies bacterianas en el cuerpo del perro que intervienen en la etiología del VMC como agentes secundarios, los cuales pueden agravar el proceso morboso iniciado por aquel. Entre ellos se destacan: la *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus sp* y *Staphylococcus sp*. En un estudio realizado por Neu y col. (1995) en un perro Beagle positivo a Moquillo Canino se apreció coccidiosis pulmonar, aislando estadíos asexuales de Coccidias y al análisis anatomopatológico se evidenció consolidación multifocal en pulmones y fibrosis pericárdica. Por otra parte, Iwanaka y col. (1996) encontraron coadyuvancia del *Bacillus piliformis* (Moraillón, 1998 y Thulen, 1998).

El VMC es relativamente lábil. Al calentarlo a 50°C, se inactiva en 60 min y a 55°C en 10 minutos. Se conserva durante varias semanas a 4°C, y es inactivado a un pH ácido. Lo inactiva el formol al 0.1% en 2 horas; el ácido fénico al 0.5% de 48-72 horas y el cloroformo al 0.3% en 10 minutos.

Revisión Bibliográfica

Las preparaciones del virus se preservan por liofilización con la adición de una solución al 2% de dimetil sulfoxida (DMSO) almacenándolo a -4° C. Debido a la presencia de la envoltura externa el virus es rápidamente inactivado a 4° C.

En los climas cálidos el VMC no persiste en el ambiente después que los animales infectados son eliminados, por el contrario, sobrevive un tiempo en los ambientes fríos y durante meses en invierno (Merck, 2000).

Es un virus pantropo y en este sentido, varios autores han demostrado que el efecto citopático *in vitro* del VMC en células de riñón y cerebro, es el mismo sin diferenciación de tejidos. Este virus produce inmunosupresión del animal, ya que reacciona con el tejido linfoide y la replicación viral ocurre dentro del sistema retículo endotelial. Según Appel y col. (1996) el Virus del Moquillo Canino ataca preferentemente a linfocitos y macrófagos, especialmente en pulmones.

La puerta de entrada del virus del moquillo canino, es la inhalación del virus. Pasa a las amígdalas palatinas y a los ganglios bronquiales, siguiendo su recorrido hasta el torrente sanguíneo en aproximadamente 48 horas, y se distribuye así a todo el organismo.

El VMC virulento se replica fácilmente en linfocitos caninos activados y en macrófagos caninos *in vitro*, pero solo después de la adaptación en monocapas de células epiteliales o fibroblásticas. Por el contrario, el virus atenuado de las vacunas se replica tanto en linfocitos/macrófagos como en células de cultivo epiteliales o fibroblásticas *in vitro* (Blixenkrone y; Svansson, V. 1998).

La duración y severidad del moquillo canino es muy variable, siendo los signos clínicos diversos. Al comienzo de la enfermedad la pirexia es intermitente, usualmente se asocia con secreciones serosas y posteriormente mucopurulentas oculares. Hay depresión y anorexia y en este lapso se pueden presentar signos gastrointestinales, como vómitos y diarreas. En ocasiones se presentan lesiones cutáneas, que también pueden ser leves o severas, desde una dermatitis pustular hasta zonas alopécicas y ulceraciones de gran tamaño. Los pulpejos de las patas (almohadillas plantares) se encuentran endurecidos y resquebrajados (hiperqueratosis), el hocico también se encuentra endurecido, seco y resquebrajado. Algunos perros desarrollan signos nerviosos generalmente después de la enfermedad sistémica. Otros pacientes desarrollan neuritis óptica y daño a la retina provocando ceguera (Tipold y col.1997; Raw y col.1995).

Según Bell y col. (1995) se encontraron casos de artritis reumatoide producto de infecciones con el VMC, observando concentraciones elevadas de anticuerpos en el líquido articular.

Schoning y col. (1996) plantearon que este virus produce linfopenia y Ettinger y col. (1997), encontraron que también produce trombocitopenia en el curso temprano de la enfermedad.

Revisión Bibliográfica

El diagnóstico se puede confirmar después de la sospecha en base a los signos clínicos y los hallazgos hematológicos (Ramírez, 1998). Esto puede realizarse a través de técnicas tales como:

Inmunocitoquímica - En los casos agudos pueden hallarse antígenos virales y/o cuerpos de inclusión en células blancas, improntas vaginales o conjuntivales, células de lavado bronquial, sedimentos urinarios o líquido cefalorraquídeo (LCR). En casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) - Esta prueba permite detectar ácido nucleico y puede resultar positiva, aún cuando las pruebas de aislamiento de virus y la Inmunocitoquímica no logren su detección.

Hematología - En casos agudos se encuentra linfopenia, trombocitopenia, y los monocitos pueden estar aumentados.

Aislamiento viral - El virus puede ser aislado de las mismas muestras usadas para inmunofluorescencia. Sin embargo, el aislamiento viral no se realiza de forma rutinaria en los laboratorios de diagnóstico.

Análisis de LCR - Es habitual que perros con compromiso nervioso tengan aumentada la concentración de proteínas y células mononucleares en el LCR. También es posible hallar antígenos virales en células del LCR en casos agudos de encefalitis.

Serología - La detección de anticuerpos neutralizantes, precipitantes o citotóxicos no es suficiente para el diagnóstico. Perros infectados en forma aguda pueden morir sin aparición de anticuerpos neutralizantes, mientras que los infectados en forma subaguda o crónica pueden tener niveles de anticuerpos comparables con los perros vacunados.

ELISA para la detección de IgM específica contra el virus de moquillo canino - Es una prueba útil ya que la IgM en perros infectados persiste por 5 semanas a 3 meses dependiendo de la cepa y la respuesta del huésped. En perros vacunados la IgM persiste aproximadamente 3 semanas.

1.1.2 Hepatitis canina

La hepatitis canina es una enfermedad viral altamente contagiosa y fatal, producida por el Adenovirus canino tipo 1. Esta enfermedad es conocida con el nombre de enfermedad de Rubarth quien publicó una detallada información de la misma en 1947.

Revisión Bibliográfica

Su transmisión se realiza por contacto directo con animales infectados o sus secreciones (orina, saliva o heces) contaminadas. A diferencia del Moquillo, el Adenovirus no se encuentra en el aire y ninguno de los dos afecta al ser humano. Los síntomas iniciales son similares a los ocasionados por el Moquillo canino, mostrando más tarde sintomatología compatible con hepatitis y problemas sanguíneos (Kobayashi y col. 1996).

Esta enfermedad aguda, fatal y clínicamente parecida al moquillo canino, es producida por un virus de la familia *Adenoviridae*, del grupo de los virus ADN. Es un virus pequeño de alrededor de 75 a 80 milimicras con nucleocápside icosaédrica desnuda. Se cultiva bien en tejidos de células renales de perro donde puede ser mantenido indefinidamente. De los 78 serotipos existentes solo dos afectan al perro: el **cav-1** y el **cav-2**, ambos muy semejantes en su estructura. Sin embargo, el tipo 1 es más virulento y mas patógeno que el tipo 2, siendo esta la razón por lo que a nivel mundial se ha sustituido el serotipo 1 por el 2 en la confección de vacunas. Como beneficio se ha logrado la disminución de resultados adversos, siendo la opacidad de la córnea la reacción más característica (Merck, 2000).

Este virus tiene las características de todos los Adenovirus. Contiene hemaglutininas para los glóbulos rojos del grupo humano O y de curieles.

Las células infectadas con este Adenovirus no producen interferón y no son sensibles a la acción de esta citoquina. Por esta razón, no ocurre el fenómeno de interferencia entre el virus de la hepatitis infecciosa canina y el moquillo canino en la vacuna viva atenuada bivalente y ambos se replican satisfactoriamente en los animales inoculados (Hernández, 1987).

La resistencia del *cav-1* es moderada y sobrevive en el medio durante días y meses según la temperatura y humedad. La inactivación es lograda por el calentamiento a 56°C (132°F) lo que permite la desinfección de los caniles y del área con vapor. Además, la temperatura de ebullición del agua (100°C) también es eficaz como método más práctico. Los compuestos de amonio cuaternario lo inactivan en 10 minutos y pueden utilizarse también formol o formalina al 5%, sosa cáustica al 2% e hipoclorito de sodio de 1% al 3% (Zupanci, 1998).

La infección se produce por la vía oronasal, infecta las tonsilas y linfoglándulas regionales donde ocurre la primera replicación viral o replicación primaria. El virus liberado desde las células infectadas causa viremia con viriones libres en el plasma. El virus infecta las células del parénquima hepático y reticuloendoteliales en la mayoría de los órganos como células blanco para la replicación viral secundaria. Afecta al endotelio corneal provocando un edema corneal que conlleva a una opacidad del ojo que se puede complicar y formar un glaucoma. Daña, además, el endotelio renal provocando glomerulonefritis y el daño en el endotelio vascular puede provocar una diátesis hemorrágica (Ettinger, 1997).

Revisión Bibliográfica

El *cav-1* tiende a localizarse en los túbulos renales donde pueden persistir un año después de la posible recuperación.

Los síntomas de la hepatitis infecciosa canina, no son síntomas característicos de esta enfermedad; por lo tanto, muy frecuentemente pueden confundirse con los síntomas de otras enfermedades infectocontagiosas como el moquillo canino, la toxoplasmosis, la leptospirosis y la rabia (Birchard y col. 1997).

Los signos clínicos más frecuentes en perros que sobreviven al periodo virémico agudo, incluyen vómitos, dolor abdominal y diarreas con o sin sangre y se deben al daño celular como resultado de los efectos de la replicación. En perros muy graves suelen ser obvias la hipersensibilidad abdominal y la hepatomegalia. El enturbamiento de la córnea (imagen de “ojo azul”) suele iniciarse en el limbo y difundirse hacia el centro y puede acabar con glaucoma o úlcera corneal (Kobayashi, 1996).

El diagnóstico clínico es difícil debido a que los síntomas son muy variados y similares a los provocados por otras enfermedades.

Las pruebas de laboratorio nos confirman el diagnóstico de esta enfermedad y las más utilizadas son: (Zamora, 1992)

- Conteo total de leucocitos, con cifras en ocasiones bajas como 2500 células en casos serios.
- En los estadios iniciales de la infección se produce una neutropenia y linfopenia combinadas.
- Después puede haber una neutrofilia con una leucocitosis como resultado de la presencia de agentes bacterianos.
- Debido a los daños hepáticos, es frecuente encontrar una trombocitopenia, además de un tiempo de sangramiento prolongado con anormalidades de la hemostasia.
- Las enzimas aminotransferasas hepatoespecíficas ASAT y ALAT pueden estar elevadas.
- Aislamiento del virus en cultivos de células de riñón y testículos, a partir de hisopos de orofaringe, aunque en los primeros estadios se pueden determinar en cualquier secreción.
- Ocasionalmente una hipoglicemia.
- Se realiza un análisis de orina buscando la albuminuria que se presenta por los daños en el sistema renal

Aplicación de pruebas serológicas para determinar títulos de anticuerpos elevados

Existen varias pruebas serológicas que se pueden utilizar para la confirmación de esta enfermedad, mediante las mismas podemos comprobar la presencia de anticuerpos desarrollados contra este agente etiológico. Algunas de las pruebas son: prueba de fijación de complemento, inmunodifusión, inhibición de la hemoaglutinación, la inmunofluorescencia directa e indirecta como una prueba muy confirmativa y ELISA (Larraga y col. 1987).

1.1.3 Parvovirus canina

Desde finales de la década de 1970, se ha reconocido a la enteritis viral como una de las causas más comunes de diarrea infecciosa en perros menores de seis meses de edad. Esta enfermedad altamente contagiosa y con frecuencia mortal es causada por *Parvovirus canino* tipo 2 (CPV-2), un ADN virus que requiere células en división rápida para replicarse (Larson y col, 1996).

Existen 2 tipos de *Parvovirus canino*: (CPV): CPV-1 descrito en 1970 y CPV-2 descrito en 1978. Este último por mutaciones genéticas se clasifica actualmente como CPV-2a y CPV-2b. Estas variantes son adaptaciones que les permiten reproducirse y diseminarse más fácilmente; además de poseer periodos de incubación más cortos (4 a 5 días) y mayor patogenicidad (Peter, 1997)

Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es un virus pequeño y desnudo, el cual es muy resistente a la mayoría de los desinfectantes, antisépticos y al calor (30 min a 60 °C). Puede resistir las condiciones ambientales durante muchos meses o años. El virus tiene alta afinidad por células en mitosis (intestinales, linfáticas, células hematopoyéticas y en cachorros susceptibles menores de 15 días en células del miocardio)

Parvovirus es uno de los virus más resistentes a condiciones ambientales extremas, pudiendo sobrevivir por más de 5 meses en material fecal, ropa, platos de comida, suelo, etc. El desinfectante que lo elimina es el hipoclorito de sodio; y es adecuada la concentración que normalmente se vende para uso doméstico o al 5%, aplicado en soluciones de 1:30. Debe permanecer al menos 60 minutos en contacto con la superficie a desinfectar, para asegurar su efectividad (Pratelli y col. 1999).

Las lesiones resultantes están determinadas por el hecho de que el virus necesita para su replicación el núcleo de las células en activa división. Al respecto, los *parvovirus* precisan de algunas funciones celulares que se generan tan solo al final de la fase S o al principio de la fase G2 del ciclo mitótico

Revisión Bibliográfica

Los factores que inducen a que la célula entre al ciclo mitótico favorecen la replicación viral e incrementan la severidad de las lesiones y la enfermedad clínica. Por lo tanto, la exposición previa a coronavirus puede favorecer la acción de CPV-2, ya que el primero estimula la proliferación del epitelio germinal de las criptas intestinales

De acuerdo con lo anterior, la replicación viral se presenta principalmente en tejidos con alta tasa de división, como son el timo, el tejido linfóide y la médula ósea. Las células deben poseer los receptores apropiados, ya que no se afectan todas las activamente proliferantes (Truyen y col. 1996).

Tras la ingestión, el virus se replica en el tejido linfático faríngeo, desde allí pasa a la circulación sanguínea, y se localiza en los tejidos que contienen células en rápida división (médula ósea, tejido linfático, el epitelio de las criptas del intestino delgado). Esto produce una inmunodeficiencia, y en el intestino, la destrucción de las vellosidades intestinales, úlceras y diarrea hemorrágica. La necrosis linfóide y la destrucción de las células mieloproliferativas, conducen a la linfopenia. Como resultado de la grave caída de las defensas, las lesiones ulcerosas del intestino son invadidas por bacterias del género *Clostridium* y *Escherichia coli*, produciendo una severa bacteriemia y septicemia (Peter, 1997).

Se cree que el período de incubación es de 3 a 8 días, con una eliminación del virus a partir de los 3 días, normalmente antes de que se presenten los signos clínicos.

Los síntomas más frecuentes se observarán a nivel del aparato digestivo consistiendo en anorexia, vómitos, fiebre inicial, diarrea gris-amarillenta y/o hemorrágica. Ello conllevará a la deshidratación y pérdida de peso. Puede suceder la muerte en 24-48 horas si el animal se deteriora rápidamente o una recuperación a los 5-7 días en casos no complicados o tratados (Zimmer, 1997).

También está descrito un cuadro de enfermedad miocárdica que principalmente puede afectar a cachorros menores de 2 semanas, aunque actualmente es poco frecuente gracias a la adquisición de inmunidad materna. La elevada temperatura rectal y leucopenia pueden estar presentes especialmente en casos severos (Sharp y col. 1999).

La forma gastroentérica es frecuente en perros de 6 a 20 semanas de vida, que no han sido vacunados. La mayoría de los perros afectados (85%) son menores de 1 año. Hay casos en los que las lesiones son tan generalizadas que les puede quedar un síndrome de malabsorción. Otra complicación puede ser el edema pulmonar (Edsall, 1998).

El Pastor Alemán, el Doberman y el Rottweiler son las razas de perros más predispuestas a sufrir la enfermedad en su forma más grave. (Day, 1999).

Los signos característicos del PVC-2, raramente se presentan en un tiempo determinado. La leucopenia, aunque no se encuentre en todos los perros, usualmente es proporcional a la severidad de la enfermedad. La prueba de ELISA es una prueba de antígenos, disponible para infección aguda en PVC-2; sin embargo, el período de antígeno fecal es cíclico. El PVC-2 rara vez es detectable después de 10-12 días en infección natural, esto se corresponde con 5 a 7 días de enfermedad clínica. Además las vacunas vivas modificadas también eliminan virus entre los 4 a 10 días posteriores a la vacunación (Zinder, 1997).

Los métodos inmunoquímicos también pueden ser utilizados para detectar el virus en el tejido o en los cultivos.

1.2. Inmunoglobulinas y su papel en la inmunidad.

1.2.1 Generalidades.

En general, los anticuerpos (Ac_s) son glicoproteínas (proteínas que contienen residuos de glúcidos) producidas por los organismo superiores en virtud de la evolución de la respuesta inmune o de rechazo a la presencia de moléculas reconocidas como no propias, denominadas antígenos (Ags). Son moléculas bifuncionales con sitios para unirse específicamente al Ag, conocidas como Fab y otros llamados Fc, que se unen a efectores que realizan fenómenos secundarios, independientemente de la especificidad, y que contribuyen a la eliminación del Ag, como la activación del complemento y la opsonización, entre los más importantes.

Son moléculas globulares, presentes en la sangre, efectoras de la respuesta inmune humoral. Se producen por las células plasmáticas, provenientes de la transformación de los linfocitos B (Goodman and Parslow, 1994). La estructura básica de todas ellas está constituida por cuatro cadenas polipeptídicas, identificadas por dos tipos diferentes de acuerdo con su tamaño. A las de mayor peso molecular se les denomina cadenas pesadas o H (del inglés "heavy"), con un peso molecular de entre 55 a 77 kDa y a las menores se les denomina ligeras o L (del inglés "light"), con un peso molecular de entre 23 a 26 kDa. Por lo que su fórmula general podría representarse como $(H_2L_2)_n$. Las dos cadenas pesadas se unen entre sí covalentemente mediante puentes disulfuro y la cadena pesada se une a la ligera mediante un puente disulfuro, de tal manera que la molécula presenta simetría bilateral. Cada una de las cadenas consta de una región constante y otra variable (Abbas y col. 2000).

De acuerdo con la nomenclatura aprobada por la OMS en 1964, todas las inmunoglobulinas están divididas en 5 clases: M, G, A, D, E. La actividad serológica de uno u otro suero de sangre depende, principalmente, de la concentración de inmunoglobulinas M y G.

La inmunoglobulina G es el isotipo de Ig que se encuentra en mayor concentración en la sangre y por esta razón, tiene el papel más importante en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos.

Revisión Bibliográfica

Debido a su pequeño tamaño escapa de los vasos con mayor facilidad. Por eso participa con rapidez en la defensa de los espacios tisulares y superficies corporales. La IgG puede opsonizar, aglutinar y precipitar a los antígenos.

La inmunoglobulina M es el isotipo de Ig que se produce en mayor cantidad en la respuesta inmunitaria primaria. También, se produce en la respuesta secundaria, pero este fenómeno tiende a enmascararse por la predominancia de la Ig G. La Ig M es mucho más eficiente que la Ig G en lo relativo a la activación del complemento, opsonización, neutralización y aglutinación de virus.

La inmunoglobulina A es el isotipo de Ig de mayor importancia en las secreciones externas de los animales no rumiantes. Tiene una importancia crítica en la protección de las vías respiratorias y urogenitales, así como tubo digestivo, glándulas mamarias y ojos, contra las invasiones microbianas.

La inmunoglobulina E, se puede encontrar en concentraciones extremadamente bajas en el suero de muchas especies, no obstante es de gran importancia, ya que es el mediador de las reacciones de hipersensibilidad de tipo I (alérgicas y anafilaxia).

La inmunoglobulina D es una Ig que se encuentra principalmente en la superficies de algunos linfocitos B, donde funciona como receptor de antígenos (Fenner, 1993).

Los primeros anticuerpos que se detectan a la primera inoculación del antígeno, corresponden a la clase M. Sus títulos crecen y disminuyen rápidamente. Pocas semanas después pueden desaparecer por completo y reemplazarse por las Ig G, las cuales se han acumulado, poco a poco y se mantienen por largo tiempo (Fainboin, 1995).

1.2.2. Características de la respuesta inmunitaria humoral.

Después de una inyección única de antígeno a un animal que nunca había sido expuesto al mismo, durante varios días no existen anticuerpos detectables. A este período se le llama "latente". Los anticuerpos pueden identificarse alrededor de una semana después de la inyección y su concentración sérica aumenta hasta llegar a un máximo entre 10 y 14 días, después disminuye y desaparece en pocas semanas. La cantidad de anticuerpos formados durante esta respuesta primaria es relativamente pequeña, y también lo es la protección que durante ella se obtiene.

Si después de la 1^{ra} exposición al Ag se administra una segunda dosis, se observará que el periodo latente no dura más de dos a tres días. La concentración sérica de anticuerpos aumentará entonces con rapidez, llega a un alto nivel, y luego declina con lentitud. Dichos anticuerpos pueden detectarse durante muchos meses y aún años después de dicha inyección. Si al mismo animal se le inyecta una tercera dosis, su respuesta inmunitaria se caracterizará por un período latente aún más corto, y por una respuesta de anticuerpos que llega a un mayor nivel y es más prolongada.

La estimulación de la resistencia a las enfermedades después de inyecciones repetidas de antígenos realizadas de la manera descrita, constituye la base de las técnicas comunes de la vacunación, que se utilizan contra las distintas enfermedades infecciosas (Miyamoto y Taura, 1995).

La respuesta secundaria es específica, ya que sólo puede producirse por la acción de un antígeno idéntico al que se administró primero. La respuesta secundaria puede provocarse muchos meses, o aun años, después de la primera inyección del antígeno, aunque su magnitud tiende a disminuir con el tiempo. Puede inducirse en el animal una respuesta secundaria, aunque la respuesta que haya tenido en la primera inyección de antígeno sea tan débil que no se pueda detectar. Estas características de la respuesta secundaria indican que el sistema formador de anticuerpos tiene la capacidad de "recordar" la exposición previa a un antígeno, propiedad conocida como memoria inmunológica. Por esta razón, la respuesta inmunitaria secundaria se denomina a veces "respuesta anamnésica" (Harrus y Waner, 2002; Scott y col. 2002).

1.2.2.1 Dinámica de los anticuerpos en la especie canina.

En la especie canina la inmunidad pasiva es transmitida de la madre al cachorro en proporción al título sérico de la misma y se efectúa en un 5% por vía placentaria y un 95% por vía calostrala. Esto significa que el nivel de inmunización que adquiere el cachorro y la fecha de anulación del título de anticuerpos depende del título de la madre, de la cantidad de calostro ingerido y del número de la camada. Hay tres grandes causas por las que fracasa una transferencia adecuada del calostro: ser insuficiente o de mala calidad, puede existir suficiente calostro, pero la ingestión por el recién nacido es inadecuada y la falla en la absorción por el intestino, a pesar de que la ingestión sea adecuada y el calostro sea de buena calidad (Méndez, 1997).

En el nacimiento los títulos del cachorro son débiles y aumentan luego de tomar el calostro, para alcanzar entre el tercero y cuarto día de vida un máximo. Luego disminuye a la mitad a los 8 días aproximadamente, manteniéndose en niveles protectores hasta la semana 6 donde declinan hasta hacerse cero.

El cachorro transita por un período crítico denominado "vacío inmunitario", durante el cual los títulos de anticuerpos de origen materno disminuyen progresivamente con el paso de la primera semana de vida. Éstos resultan demasiado bajos para asegurar una protección válida contra la infección natural, pero son aún suficientemente elevados para interferir con la actividad de las vacunaciones tradicionales normalmente utilizadas (Meyer, 2001).

Ha sido evidenciado que los anticuerpos maternos con relación al CPV pueden persistir en el cachorro hasta las 12-14 semanas de edad. Títulos de derivación materna superiores a 1:20 son capaces de interferir con la vacuna, mientras los títulos de anticuerpos superiores a 1:80 confieren una protección completa contra la infección.

Revisión Bibliográfica

Existe, por lo tanto, un período crítico que dura alrededor de 2-4 semanas y que generalmente sucede entre las 8-12 semanas, en las cuales se crea un “vacío inmunitario” debido al hecho de que los títulos de anticuerpos maternos están comprendidos entre 1:80 y 1:20 y por lo tanto, el cachorro es receptivo a la infección, pero refractario a las vacunaciones. Los cachorros regularmente vacunados en estas condiciones pueden sucesivamente contrarrestar la enfermedad (Mc Ewan y col. 1995).

Según algunos investigadores este periodo puede durar hasta 5 semanas. La solución óptima es la de reducir al mínimo este periodo. Otros factores intervienen, además, en la duración del “vacío inmunitario” (Castellano, 1996).

Cada perra antes del parto está provista de un determinado nivel de anticuerpos, y de ello dependerá el tiempo de persistencia de estos en el cachorro.

Frente a vacunas de parvovirus canino con bajos títulos, los anticuerpos maternos pueden interferir, haciendo la ventana de susceptibilidad muy ancha. Las vacunas con altos títulos reducen dicha ventana (Hoskins y col. 1996). Los cachorros pueden ser susceptibles de 2 a 3 semanas antes de que puedan ser inmunizados y no existe vacuna que elimine en forma completa este periodo de susceptibilidad (Coyne, 2000).

Investigaciones realizadas en Francia han revelado el nivel de anticuerpos contra CPV de origen materno en 138 cachorros de diversas razas. En el momento de la primera visita ambulatoria: 50 cachorros tenían los anticuerpos maternos entre 1:8-1:16 otros 50 entre 1:32-1:64 y el resto entre 1:128-1:256. Con una vacuna tradicional quedaron inmunizados el 36% de los cachorros. Aquellos que portaban un títulos maternos entre 1:8-1:16, ya habían pasado el vacío inmunitario y el resto no respondió. Con una vacuna con elevados títulos y bajos números de pases fueron inmunizados el 87% de los cachorros, hasta un título de anticuerpos maternos de 1:128. Esto significa que respondieron a esta vacuna, tanto los cachorros que estaban en el periodo de vacío inmunitario, como los que no estaban y un grupo de 21 animales que tenían menos de 6 semanas de edad (Schultz, 2000).

1.2.3 Obtención de anticuerpos.

Para el éxito en la obtención de anticuerpos (Acs) para uso en el profiláctico, es imprescindible conocer los principios básicos de la respuesta inmune y las características y propiedades de las inmunoglobulinas. Aunque la mayoría de los vertebrados presentan respuesta inmune, son los mamíferos los que poseen este mecanismo más perfeccionado, por lo que se prefieren para obtener Acs con estos fines: ovinos (carneros, ovejas), caprinos (chivos) y equinos (caballo, burro) (Margini, 1989).

La elección del animal está en dependencia de los fines que se persiguen y las condiciones de estabulación existentes. Si el objetivo es obtener Acs para trabajos de investigación, que por lo general se realizan en instalaciones apropiadas, sólo para animales de laboratorio pequeños, el conejo es el más usado (Tijseen, 1985).

Con relación al inmunógeno, es importante identificar su naturaleza. Si es una proteína, esta precisa cooperación de los linfocitos T y B y con más de una inyección el organismo produce respuesta inmune secundaria, durante la cual se realizan las extracciones de sangre para aprovechar el pico máximo de respuesta de Acs. Si por el contrario, el inmunógeno es un hapteno o una molécula de unidades repetitivas, como los polisacáridos, éste no es capaz de estimular la cooperación T-B y sólo se produce respuesta primaria, la cual es de pobre concentración de Acs y corta en el tiempo, además produce Acs de baja afinidad. En esos casos, se recomienda conjugar covalentemente este tipo de Ag a una proteína que le sirva de portador para transformarlo en un Ag T – dependiente y obtener respuesta inmune de tipo secundario (Margini, 1989; Tijssen, 1985). Para incrementar la antigenicidad se recomienda el uso de un adyuvante, como el gel de hidróxido de aluminio, muy usado en vacunas para la aplicación en humanos o el adyuvante oleoso de Freund, restringido a animales por sus reacciones adversas. Su función es reforzar la respuesta inmune humoral de sustancias pobremente antigénicas, pues alteran el estado de solubilidad del Ag mediante la formación de depósitos y hacen más lenta su velocidad de eliminación. Por lo tanto, hay mayor persistencia en el tejido y una estimulación continua del sistema inmune, que equivale a realizar inyecciones diarias de pequeñas dosis (Abbas y col. 2000).

1.3 Sueros hiperinmunes. Aplicación.

Los sueros hiperinmunes son sueros sanguíneos de donantes, que como resultado de inyecciones masivas y repetidas de un antígeno, exhiben títulos de anticuerpos, por lo regular, muchas veces superiores a las del suero de convalecientes.

Experimentos realizados en el año 1890 por dos ayudantes de Roberto Koch, Permitieron consolidar el conocimiento relacionado con la existencia de anticuerpos neutralizantes en el suero sanguíneo de un organismo inmune. Dichos anticuerpos eran capaces de neutralizar el agente microbiano que le dio origen. Estos hallazgos estimularon la utilización de dicho suero para combatir las enfermedades infecciosas con el antisuero correspondiente específico, creando de este modo la Inmunidad Pasiva.

Los colaboradores de Koch, comprobaron que en el suero sanguíneo de curieles inmunizados contra la difteria, habían sustancias que protegían a otros curieles de los efectos letales de la toxina. Pruebas análogas las realizaron a la vez en conejos con la toxina tetánica. Al año siguiente, en la clínica de Berlín, era tratada con éxito en una niña enferma de difteria, utilizando suero antidiftérico de origen ovino.

En el año 1894, Roux y Martín, fueron los primeros en inmunizar caballos. Por su parte, Ehrlich (1987) logra la estandarización de la toxina y da la antitoxina. En 1890, simultáneamente a los trabajos anteriormente relatados, se inició la seroterapia homóloga con sueros procedentes de convalecientes de distintas enfermedades infecciosas como: sarampión, escarlatina, pneumonía, entre otras (Hernández, 1987).

Revisión Bibliográfica

Los sueros hiperinmunes para su utilización masiva en la práctica, se obtienen generalmente a partir de caballo, bovinos, ovinos y cerdos. Cuando se destinan al diagnóstico, que solo necesita una escasa cantidad, se hiperinmunizan pequeños animales de laboratorio, de acuerdo con la aptitud y el objetivo perseguido.

La producción de sueros hiperinmunes con fines profilácticos y terapéuticos con ayuda de pequeños animales de laboratorio no resulta rentable, salvo excepciones.

A partir de estos hechos, se incrementó la obtención de diverso “sueros protectores y curativos”. Esto constituyó la base de intensas investigaciones médicas en humanos y en la veterinaria.

El suero hiperinmune, el suero inmune o gamma globulina, lo han descrito algunos científicos en la comunidad médica como “el producto milagroso”. Su potencial real deberá ser reevaluado y considerado. Debe entenderse que para que sea efectiva la gamma globulina, esta deberá presentar niveles elevados de anticuerpos al organismo específico.

En este sentido, especialistas del Grupo Empresarial LABIOFAM, obtuvieron un inmunosuero de origen equino contra la enfermedad causada por Parvovirus canino.(Paneque y col.1996).

En caso de parvovirus se puede emplear la gamma hiperinmune a partir de las 6 semanas (42 días) con intervalos de 10 días hasta los 3 meses, vacunando a esta edad, que es cuando el sistema inmunológico esta completamente apto para responder ante los antígenos de la vacuna con buenos resultados. También previo a la realización de operaciones quirúrgicas estéticas deberá ser empleada para evitar que el estrés provocado por la misma pueda causar una depresión inmunológica (Mann y col. 1996).

1.4 Estrategias de prevención y control de las enfermedades virales caninas.

A pesar de la multitud de los medicamentos ensayados en el tratamiento de Moquillo no se han encontrado en la actualidad medicamentos eficaces contra el virus que lo produce. Se utilizan en el tratamiento los antibióticos y dentro de ellas las sulfas obteniendo buenos resultados con relación a los trastornos que produce el virus. Específicamente, el tratamiento con suero homólogo contra el Moquillo en grandes dosis y un extracto de penicilina al comienzo de la enfermedad ofrece mejores resultados. La administración del suero por vía endovenosa a dosis de 2 mL para los perros pequeños y 40 a 50 mL para los de talla grande, sulfamidas por vía oral a dosis de 1 a 1.5 g diarios, penicilina en emulsión oleosa a razón de 100 000 UI inyectable durante 3 a 4 días, obteniéndose una progresiva recuperación. (Harrison y col,1998).

Revisión Bibliográfica

El Virus del Moquillo Canino produce inmunidad para toda la vida a los animales afectados por la enfermedad. La inmunización artificial se practica ampliamente existiendo una gran variedad de productos y métodos (Marcaney y col. 1998).

Existe alguna evidencia experimental de que la inyección intravenosa de la vacuna del virus modificado, administrada dentro de los cuatro primeros días de iniciada la enfermedad, puede conferir protección por la inducción de interferón y anticuerpos neutralizantes. La administración después de este período, cuando los signos característicos han aparecido, no ejerce influencia en el curso de la enfermedad y puede ser de hecho nociva (Harrison y col. 1998; Rikula y col. 2000).

La primera vacuna contra el moquillo fue elaborada en 1928 por Laidlaw y Dunkin, quienes inmunizaron perros con virus inactivados procedentes de animales enfermos. Estos perros fueron luego utilizados para producir suero hiperinmune, que se combinó con el virus virulento para producir el método simultáneo de vacunación. Este método consiste en la aplicación de suero y de vacuna al mismo tiempo o con algunos días de diferencia (Zamora, 1992).

La inmunización por vacunación controlada es la única forma efectiva de profilaxis para VMC actualmente. La inmunización activa con vacunas a Virus Vivo Modificado (VVM) induce una inmunidad duradera y es la que ha permitido tener al moquillo canino bajo control en los últimos 35 años (Cooper y Chappius, 1995; Jarpil y col. 1996).

Vacunas a virus vivo modificado: La mayoría de las vacunas disponibles actualmente son las producidas por adaptación del virus a células aviares o cultivos celulares caninos. En este sentido, el Grupo Empresarial LABIOFAM, tiene establecida la elaboración de una vacuna bivalente contra el moquillo y la hepatitis canina a partir de una cepa viral aviarizada del Moquillo, multiplicada en cultivos de células de embrión de pollo SPF y una cepa viral de hepatitis adaptada en cultivo de células renales de cerdo.

Este tipo de vacunas es muy efectivo, ya que producen una inmunidad no menor a un año hasta varios años en la mayoría de los perros. Existen pequeñas desventajas en cada vacuna: las cepas virales adaptadas a células caninas inmunizan al 100% de los perros susceptibles pero esporádicamente pueden producir encefalitis posvacunal. Por el contrario, las cepas virales adaptadas a células aviares son más seguras para caninos, aunque la respuesta inmune aparece 2 ó 3 días después que la producida por vacunas adaptadas a células caninas. Además, posee la desventaja de que no todos los perros susceptibles son protegidos.

También se pueden emplear las vacunas virus heterotípicos (sarampión) y las vacunas recombinantes. Aún y cuando la protección se puede asegurar con estos productos, es difícil igualar la eficiencia y la duración de la inmunidad de las vacunas con virus_vivo modificado utilizada actualmente (Chalmers y Baxendale, 1996).

Revisión Bibliográfica

Cuando se diagnostica una infección por el virus de la hepatitis canina, inmediatamente se debe aislar el animal enfermo para evitar que contagie a otros animales. Asimismo se debe mantener a los animales recién adquiridos en cuarentena, antes de introducirlos en el colectivo canino. La mejor manera de proteger al perro es mediante la vacunación. Generalmente se suele vacunar junto con la vacuna del moquillo y de leptospirosis.

Se puede aplicar un suero polivalente que previene a corto plazo y no interfiere con los anticuerpos maternos. Este suero esta recomendado en caso de que el perro vaya a asistir a exposiciones y no haya dado tiempo a empezar la vacunación o a que se inmunice (Appel, 1999).

El tratamiento será sintomático, siendo al igual que todas las enfermedades víricas (rehidratación, vitaminas, protectores hepáticos, antibióticos de amplio espectro y inmunoestimulantes. De máxima importancia, resultan una temprana vacunación y revacunaciones anuales.

También se recomienda la administración de Legalon (Silimarina) por vía oral, a razón de 35 mg / animal cada 12 horas, después de las comidas. Este fármaco aumenta la capacidad de síntesis proteica, estabiliza las membranas del hepatocito y lo protege de diversos agentes tóxicos

La profilaxis de esta enfermedad se logra con la vacunación de los animales de todas las edades, la vacuna contra hepatitis infecciosa canina viene combinada con la vacuna contra el moquillo (Cooper, 1995; Olson,1996).

Existen vacunas con el virus inactivado que para que pueden proteger al animal, se necesita aplicar dos dosis y la protección que confieren es de 6 a 9 meses.

En contraste, las vacunas vivas atenuadas tienen la ventaja que con una sola dosis protegen de forma eficaz y duradera (Smith, 1995).

Se emplean varios tipos de vacunas (activadas o inactivadas) para lograr la inmunización de los cachorros a temprana edad. Ambos serotipos pueden ser utilizados para la confección de las mismas. El serotipo 1 crea una inmunidad de 3 a 5 años y produce un mayor número de anticuerpos, incluso cuando es utilizado en vacunas inactivadas; pero en los últimos años ha sido desechado debido a que éste provoca reacciones secundarias, como uveitis que termina con una opacidad de la córnea y nefritis leves. El serotipo 2 produce una inmunidad menor de 1 a 2 años y genera menores títulos de anticuerpos. A pesar de ser usado en vacunas vivas, es el mas usado debido a que produce menor cantidad de reacciones adversas y además inmuniza para ambos serotipos (Olson, 1996; Schultz, 2001).

Revisión Bibliográfica

Se pueden utilizar vacunas polivalentes. Las células infectadas con este adenovirus no producen interferón por lo que no hay interferencia entre los virus en la vacunación viva atenuada y se pueden replicar satisfactoriamente (Cooper, 1995).

Algunas de las vacunas más utilizadas son:

- Moquillo, hepatitis, leptospira
- Parinfluenza canina, *Bordetella bronchiseptica*, hepatitis.
- Parvovirus, hepatitis, leptospira, moquillo, influenza.

Dada la alta mortalidad de animales afectados con Parvovirus canino, y la existencia de razas especialmente susceptibles a padecer esta enfermedad de forma muy grave, su prevención es la clave para el control de la misma. Para ello, se precisa de una buena pauta de vacunación junto con un control ambiental y la eliminación de cualquier tipo de factor inmunosupresor (Moraillón, 1996).

No existe una terapia que elimine el virus, así que todo deberá ser enfocado al tratamiento de los síntomas, es decir los vómitos con antieméticos, la diarrea con los antidiarreicos inyectables, y la deshidratación con la terapia de fluidos endovenosa correspondiente. Si no hay vómitos, la deshidratación se puede tratar con soluciones electrolíticas orales, las infecciones bacterianas secundarias se pueden tratar con sulfas, y en casos graves con antibióticos de amplio espectro. Las hemorragias también se pueden disminuir, mediante la aplicación de drogas coagulantes (Schultz, 2001).

Existe una serie de vacunas comerciales que producen excelentes resultados en perros seronegativos. Se ha demostrado que los perros inoculados con vacunas muertas quedan protegidos, sin embargo, pueden infectarse subclínicamente y ser una fuente de difusión viral (Coyne, 2000; Phillips, 1998).

El problema se plantea en relación al momento más adecuado de vacunación. Al respecto, los anticuerpos calostrales protegen al cachorro por un período de 10 a 15 semanas y por lo tanto, no es factible la utilización de vacunas en el período de altos títulos de anticuerpos.

Desafortunadamente, la cantidad de anticuerpos requeridos para prevenir la infección es tardía, debido a la interferencia con los anticuerpos maternos. Lo anterior resulta en un período de varios días a varias semanas en que el cachorro es susceptible a la infección, pero no es inmunizable (Schultz, 1998, Schultz, 1999).

La endotoxemia bacteriana sería un factor trascendental en desencadenar shock en perros con gastroenteritis hemorrágica. En la actualidad existe en el mercado nacional un antisuero (de origen equino) polivalente anti endotoxina LPS (SEPTI-serum®).

Revisión Bibliográfica

A pesar de que su uso aún es controversial, un estudio norteamericano obtuvo una baja considerable en la mortalidad de cachorros infectados con Parvovirus que recibieron el tratamiento con este producto en comparación con aquellos que no lo recibieron (17% contra 48% de mortalidad, respectivamente) (Mansfield y Phillips, 1996)

La terapia con sueros antiendotoxinas sería más efectiva si se administra antes de la terapia antibiótica, debido a que la circulación de endotoxinas LPS plasmáticas pueden incrementarse en forma dramática cuando los antibióticos destruyen bacterias gram negativas.

El presente trabajo se inserta dentro de las tendencias actuales en el campo de la prevención y control de las enfermedades virales caninas, en las que adicionalmente a la vacunación la obtención de sueros hiperinmunes polivalentes ocupan una importancia inicial en el diseño de estrategias adecuadas para el manejo de estas enfermedades infecciosas, fundamentalmente moquillo, hepatitis y parvovirus por ser las de mayor circulación en nuestro país y no disponerse de biopreparados eficaces en el mercado nacional. Con el desarrollo de una nueva metodología económicamente viable, se da continuidad a las experiencias del Grupo Empresarial LABIOFAM en esta dirección trabajo.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Equipamiento básico

- Centrifuga refrigerada, temperatura -10°C . SCR 20 BB. Himac. Hitachi. Japón.
 - Filtro de superficie plana de 142 o 293 mm o de mayor capacidad (cartuchos). Sartorius. Alemania.
 - Incubadora con temperatura 37°C . LP-103. Hungría
 - Congelador de -20°C . QUICKFREZ. Canadá.
 - Bomba de vacío.
 - Balanza técnica. ZPT. Polonia.
 - Baño María. NBE. Alemania.
 - Horno. H-01 RETOMED. Cuba.
 - Autoclave vertical. GP 360. Rusia.
 - Refrigerador doméstico. INPUT. Cuba.
 - Microscopio óptico de lente invertido. ZEISS. Alemania.
 - Espectrofotómetro. Pharmacia-LKB- Ultrospec III. Suiza.
 - PHmetro PHM 210. Standard pHmeter. Meterlab. Alemania.
- Accesorios (tanques colector y mangueras atóxicas)
 - Membranas filtrantes de nitrocelulosa de diferentes porosidades (1.2; 0.8; 0.45; 0.22; 0.1 μm), para filtro de superficie plana 142 mm (Sartorius).
 - Pipetas Eppendorf
 - Tubos serológicos 12 x 75 mm.

2.1.2 Medios nutritivos, productos biológicos y sistemas biológicos

Medios nutritivos: Medio Esencial Mínimo (MEM). SIGMA. EUA.
Caldo Triptona Soya. BIOCEN. Cuba.
Tioglicolato. BIOCEN. Cuba.

Productos biológicos:

- **Cepa vacunal:** Moquillo canino. Phylaxia. Hungría. CLABIOFAM 0049
- **Cepa vacunal:** Hepatitis canina. Phylaxia. Hungría. CLABIOFAM 0050
- **Cepa atenuada** (autóctona): Parvovirus canino. CLABIOFAM 0061

Las tres cepas virales están depositadas en el departamento de Cepas y Semillas, de la Empresa LAPROVIR No. 7, del Grupo Empresarial LABIOFAM.

Sistemas biológicos:

- Línea celular CRFK (de riñón de felino). ATCC.
- Línea celular MDCK (de riñón de canino). ATCC.
- Embriones de pollos SPF. REZENDE. Brasil.

2.2 Métodos.

2.2.1 Obtención del suero polivalente hiperinmune contra las principales enfermedades virales en perros (Moquillo, Hepatitis y Parvovirus canina).

2.2.1.1 Inmunógenos

Se realizó la preparación del inóculo mezclando a partes iguales las tres cepas virales: Moquillo canino, Hepatitis canina y Parvovirus canino.

2.2.1.2 Animal donante.

Se utilizó un bovino macho de 6 a 12 meses de edad, clínicamente sano, de la raza Suiza Pardo procedente de la Empresa Pecuaria “Del Valle” (Matanzas), libre de enfermedades infecto-contagiosas, según certificado del Instituto de Medicina Veterinaria.

2.2.1.3 Esquema de inmunización.

La hiperinmunización se realizó mediante un esquema de tres inmunizaciones, con intervalos de 14 días; administrando 30 mL del inmunógeno por vía subcutánea (SC). Se empleó siempre la misma mezcla guardada en congelación.

Transcurridos 30 días a la 3^{ra} administración, se realizó una 4^{ta} inoculación con la misma dosis. La extracción de sangre se realizó 14 días después.

2.2.1.4 Sangrados parciales, obtención y filtración del suero polivalente hiperinmune.

La sangría parcial siempre se realizó en horas tempranas de la mañana. Al animal donante no se le suministró alimento 12 horas con anterioridad a esta operación. Después de cada extracción se le administró dextrosa (la mitad del volumen de extracción) y dextrana con hierro.

Materiales y Métodos

La extracción se realizó por punción de la forma más aséptica posible, utilizando el equipamiento adecuado para realizar esta operación (agujas californias, venoclicin). Se colocó el animal en un cepo, de esta forma el animal queda completamente inmóvil, evitando que la aguja se salga o se hemolice la sangre. Se depiló con la tijera la zona de la yugular externa y se desinfectó con alcohol al 70 %.

La sangre obtenida se depositó en recipientes apropiados (probetas estériles). Se separó el coágulo de la pared con una varilla de cristal o de acero inoxidable, colocando una masa de acero inoxidable encima del coágulo. Se colocó en la incubadora a 37 ° C durante 2 a 4 horas y después se refrigeró a una temperatura de 2 a 8 ° C hasta el día siguiente para lograr la máxima retracción del coágulo.

Luego se decantó en vasos de centrifuga estériles, centrifugándose a 1500 rpm durante 30-45 min a 4 ° C. Finalizada la centrifugación se realizó el proceso de la inactivación térmica en un baño María a 56 ° C durante 30 min.

Después de la inactivación, el suero fue clarificado y filtrado, utilizando para ello membranas de nitrocelulosa. A continuación se dispensó en frascos de 2 L con un volumen de 1.500 mL con su correspondiente rótulo (No. de lote y fecha). Se tomaron muestras para las pruebas microbiológicas (acápites 2.2.3) y la realización de los controles físico- químicos (acápites 2.2.5 y 2.2.6) y bioquímicos (acápites 2.2.4). Finalmente se le adicionó mertiolato a razón de 1 parte en 10,000 como preservativo.

2.2.2 Titulación de anticuerpos (Ac) por la Técnica de Seroneutralización.

El principio de la técnica de neutralización plantea que cuando un antisuero específico se añade al virus correspondiente, el virus pierde su capacidad infecciosa, resultando neutralizado. Para la demostración de la reacción es necesario la utilización de un sistema biológico indicador.

Se utilizó la técnica β para la seroneutralización, en la que se realizan diluciones ascendentes del suero con una dilución constante del virus. El título se expresa como la mayor dilución que neutraliza el virus en el 50 % de los tubos infectados.

Enfermedad de Carré (Moquillo canino)

Seroneutralización en embriones de pollo SPF

A una serie de diluciones del inmunosuero se añade igual volumen de virus diluido conteniendo de 100 Dosis Infecciva media (DI_{50}).

Materiales y Métodos

Esta mezcla virus-diluciones del suero se incuba durante 2 horas a 4⁰ C. Se inoculan 0.2 ml en la Membrana Corioalantoidea (MCA) de embriones de pollo de 7 días y estos se incuban a 37⁰ C durante 7 días, al cabo de los cuales se observan las membranas para examinar las lesiones. Esta prueba se valora por la dilución más alta del inmunosuero que impide las lesiones focales inducidas por el virus.

Interpretación:

El título se determina por el método Reed y Muench (1938) y se expresa por la dilución más alta del suero capaz de neutralizar de 100 DI₅₀ del virus.

Enfermedad de Rubarth (Hepatitis canina).

Seroneutralización en la Línea celular MDCK

Procedimiento:

- Preparar diluciones dobles del suero hiperinmune.
- Realizar diluciones del virus hasta 100 dosis infectivas media (DI₅₀).
- Añadir a 1 mL del suero hiperinmune diluido; 1 mL de virus conteniendo 100 DI₅₀. Incubar la mezcla a 37⁰ C durante 1 hora.
- Decantar los tubos de cultivo celulares que serán inoculados con la mezcla virus – suero y los controles de virus, menos los tubos controles del medio de cultivo celular.
- Inocular 0.2 mL (mezcla suero- virus) a cada tubo de cultivo (5 tubos por dilución) e incubar durante 30 min. a 37⁰ C para permitir la adsorción del virus a los receptores celulares. Luego añadir 1 mL de MEM e incubar a 37⁰ C.
- La lectura se realiza a partir del 3^{er} día hasta el 7^{mo} día.

Interpretación:

El título se determina por el método Reed y Muench (1938) y se expresa por la dilución más alta del suero capaz de neutralizar el 50% de los tubos infectados.

Confección y anotación en el protocolo: Se anota en el modelo con cruces:

(+) Efecto citopático en el 100 % de la monocapa.

(-) No efecto citopático.

3. Gastroenteritis hemorrágica (Parvovirus canina)

Seroneutralización en la Línea celular CRFK

Procedimiento:

- Preparar diluciones dobles del suero hiperinmune.
- Realizar diluciones del virus hasta 100 dosis infectivas media (DI_{50}).
- Añadir a 1 mL del suero hiperinmune diluido, 1 mL de virus conteniendo 100 DI_{50} , esta mezcla se incuba a $37^{\circ}C$ durante 1 hora.
- Decantar los tubos de cultivo celulares que serán inoculados con la mezcla virus – suero y los controles de virus, menos los tubos controles del medio de cultivo celular.
- Inocular 0.2 mL (mezcla suero- virus) a cada tubo de cultivo (5 tubos por dilución) e incubar durante 30 min. a $37^{\circ}C$ para permitir la adsorción del virus a los receptores celulares. Luego añadir 1 mL de MEM e incubar a $37^{\circ}C$.
- La lectura se realiza a partir del 3^{er} hasta el 7^{mo} día.

Interpretación:

El cálculo del título se determina por el método Reed y Muench (1938) y se expresa por la dilución más alta del suero capaz de neutralizar el 50 % de los tubos infectados.

Confección y anotación en el protocolo: Se anota en el modelo con cruces:

(+) Efecto citopático en el 100 % de la monocapa.

(-) No efecto citopático.

2.2.3. Determinación de esterilidad.

Se siembra en tioglicolato fluido y caldo triptona soya. Según PNO:8-03-003 “ Ensayo de esterilidad por el método directo”, del departamento de Control Interno Grupo Empresarial LABIOFAM. Como criterio de esterilidad se asume la no presencia de crecimiento microbiano, reflejado en ausencia de turbidez, o formación de películas.

2.2.4 Determinación de proteínas en el suero hiperinmune.

Método de Biuret

Este método se basa en la reacción de un reactivo de cobre alcalino con los enlaces peptídicos de las proteínas, produciendo un complejo de color púrpura. Se realizó según PNO “Determinación de proteínas totales. Método Biuret” Cod. 804022 del Departamento Bioquímico de Control de la Calidad. LABIOFAM.

Materiales y Métodos

La absorbancia de las soluciones fue leída en un espectrofotómetro a 555 nm y la concentración de proteínas en la muestra se calculó como sigue:

$$A_m \times COT \times Dil = g/L$$

Donde:

A m: Absorbancia de la muestra.

COT: Cotangente de la curva de calibración.

Dil: Dilución de la muestra.

Para la realización de esta curva de calibración se empleó una solución patrón de albúmina al 0.25 % de concentración, corregida en función de su absorbancia a 280 nm.

2.2.5 Determinación de mertiolato (timerosal) residual.

Este método permite valorar la presencia de timerosal usado como preservativo en el producto. Se determinó según PNO: “Determinación de timerosal”. Cod. 804013 del Departamento Bioquímico de Control de la Calidad. LABIOFAM.

Interpretación: Es satisfactorio el producto si la concentración final es de 0.1 mg / mL

2.2.6 Determinación de pH en el suero hiperinmune.

Se utilizaron 5 mL de suero hiperinmune para determinar el pH según la Norma cubana NC: 90-13-80 de aseguramiento metrológicos. Indicadores de pH. Reglas generales para efectuarlas.

Interpretación: Es satisfactorio si el valor está en el intervalo de 7-8.

2.2.7 Determinación de la inocuidad específica.

Prueba de seguridad en perros:

Se aplicó 1 mL/kg de peso corporal por vía intramuscular (IM), en 2 cachorros de 3 a 6 meses de la raza Beagles procedentes del CENPALAB. Se observaron los cachorros durante 21 días.

Interpretación.

De ocurrir algunas reacciones anormales, atribuible al producto a cualquiera de los 2 cachorros, el lote es declarado no satisfactorio.

2.2.8 Determinación de la inocuidad inespecífica (toxicidad)

Procedimiento:

- Inocular a 2 cobayos procedentes del CENPALAB de la raza Macabello de 250 a 300 g de peso por vía intraperitoneal (IP), con no menos de 2 mL de la muestra.
- Inocular 5 ratones Balb/c procedentes del CENPALAB, de 17 a 22 g de peso por vía subcutánea (SC), con 0.5 mL de la muestra.

Observar los animales durante 7 días.

Interpretación: La prueba se considera satisfactoria si no se observa reacción local o general significativa.

2.2.9. Determinación de la eficacia del inmunosuero en perros enfermos con parvovirus canina.

La determinación de la eficacia del suero hiperinmune se realizó bajo condiciones controladas en el Vivario “La Granjita”, del Laboratorio de Control Interno del Grupo Empresarial LABIOFAM.

Se utilizaron 18 perros, de la raza Beagles de 2 meses de edad, clínicamente sanos, con su correspondiente certificado de calidad del CENPALAB. Con estos animales se formaron dos grupos:

El grupo I (control): 8 ejemplares sólo recibieron el tratamiento convencional (paliativo).

El grupo II: 10 ejemplares recibieron el tratamiento paliativo + inmunosuero polivalente.

Grupos	Tratamiento paliativo	Tratamiento con el inmunosuero
I (n=8)	Solución fisiológica Dextrosa al 5% Atropina Vitaminas Antibióticos	-
II (n=10)	Solución fisiológica Dextrosa al 5% Atropina Vitaminas Antibióticos.	1 mL/ kg peso vivo (PV) cada 48 horas 1 ^{ra} dosis por vía endovenosa 2 ^{da} y 3 ^{ra} dosis por vía subcutánea

Materiales y Métodos

Antes de iniciar la investigación ninguno de los animales evaluados presentó título de anticuerpos neutralizantes anti parvovirus canino. La determinación serológica se realizó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI).

A cada uno de los animales se les administró 1 mL de una suspensión viral de parvovirus canino por vía intramuscular, con un título de 10^6 U / mL.

El diagnóstico confirmativo se realizó mediante la técnica de hemaglutinación (HA) a partir de muestras de heces fecales de los animales enfermos. Este diagnóstico se efectuó en el Centro Nacional de Epizootiología y Diagnóstico Investigativo (CENEDI).

Se determinó el porcentaje de eficacia de cada tratamiento en función del número de animales recuperados con relación al número de enfermos.

2.2.10 Consideraciones estadísticas.

Fueron obtenidos tres lotes del suero hiperinmune polivalente. Los resultados relacionados con la actividad biológica (títulos de anticuerpos) y la evaluación de la calidad bioquímica y físico-química se presentan en función de las medias y las correspondientes desviaciones estándar ($\bar{x} \pm D.E$), con los coeficientes de variación asociados.

CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Esquema de inmunización

En el gráfico 1 se muestra la dinámica de anticuerpos anti-moquillo canino durante el esquema de inmunización empleado en nuestros experimentos. A partir del día 28 después de la segunda reestimulación, comienzan a incrementarse los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-moquillo desde 1:64 hasta alcanzar niveles superiores a 1:256 a los 72 días.

Comentario [UP-71]: nzan

Un comportamiento similar se observa en el gráfico 2, donde los niveles de anticuerpos neutralizantes anti-hepatitis, se incrementan a partir del día 28 hasta alcanzar un nivel máximo de 128 U/mL a los 58 días.

Por su parte, como se aprecia en el gráfico 3, fueron alcanzados niveles superiores de anticuerpos anti-parvovirus, con un valor de 512 U/mL después de la 4^{ta} estimulación.

Abbas y col. (2000), refieren que el aumento de anticuerpos en las reestimulaciones (respuestas secundarias), son el resultado de la “memoria inmunológica” En este caso, los linfocitos que se forman por estimulación primaria, son los responsables de esa memoria, y al ser estimulados por el antígeno específico activan los mecanismos que llevan a la rápida proliferación de células formadoras de anticuerpos.

En este sentido, Meyer (2001), señala que a nivel humoral se produce la respuesta primaria, por estimulación de linfocitos Th2 (h cooperadores), que a su vez activan y diferencian a los linfocitos B. Ante una exposición posterior al mismo antígeno se produce una respuesta secundaria caracterizada por una velocidad de aparición más rápida, predominio de la IgG frente a la IgM, títulos más altos y anticuerpos con más afinidad por el antígeno.

Según Coyne (2000), a nivel celular cuando los linfocitos CD₄ (cooperadores) y CD₈ (citolíticos) reconocen a un antígeno atraviesan por tres fases: activación y expansión clonal, muerte de las células activadas (apoptosis) y formación de las células T de la memoria. La mayoría de las células T activadas, una vez que cumplen su función, son destruidas ya que, debido a las potentes linfocinas que secretan, podrían representar un peligro para el organismo. Solo sobrevive una pequeña cantidad de ellas que ante una reexposición al agente viral producen una respuesta acelerada y sufren gran expansión clonal, muy superior a la del primer contacto, convirtiéndose rápidamente en células efectoras muy eficaces (neutralización, fagocitosis, reacciones citotóxicas o apoptosis celular).

También debe señalarse que las inyecciones repetidas de antígeno no llevan, indefinidamente, a respuestas inmunitarias cada vez mayores. La cifra total de anticuerpos en el suero está muy regulada, y tiende a estabilizarse en una cifra constante, aún después de muchas dosis de antígeno, o de la exposición a muchos antígenos diferentes (Duval y Giger, 1996).

Resultados y Discusión

En nuestros experimentos, si se hubiesen tomado muestras de sangre a intervalos de tiempo más cortos después de cada reestimulación, se habría observado una pequeña inflexión como consecuencia del descenso de los anticuerpos circulantes al reaccionar con una dosis de antígeno inoculado. Es necesario destacar que en la respuesta secundaria desempeña un papel importante el tiempo transcurrido entre el primer y segundo estímulo. Se demuestra en los gráficos que los títulos de anticuerpos producidos en una y otra respuesta difieren totalmente, siendo aproximadamente 8 veces superior la cantidad de anticuerpos circulantes que se consiguen en la cuarta inoculación con relación a la primera. En nuestras condiciones de experimentación logramos títulos más elevados después de la cuarta inmunización, aunque vale resaltar que con tres dosis se alcanzaron niveles superiores a 1:100.

Goret y col.(1963), inmunizaron un bovino con el virus del moquillo canino con la finalidad de obtener un suero hiperinmune. El esquema comprendió una primera inoculación y reestipulaciones a los 17, 31 y 47 días con la extracción del suero 12 días después. Los títulos de anticuerpos obtenidos fueron 1:100. En nuestras condiciones de experimentación, los resultados en cuanto al esquema de inmunización y niveles de anticuerpos son muy similares al protocolo desarrollado por estos autores. Igualmente fueron alcanzados niveles de anticuerpos mayores de 1:100 en parvovirus y hepatitis (gráficos 2 y 3). Estos resultados fueron posibles al establecer un balance adecuado en la concentración de los antígenos mezclados. De no proceder así pueden no aparecer anticuerpos para alguno de los antígenos inyectados, lo que esto se corrobora con lo afirmado por Margni (1989).

Por otra parte, Herber (1979) refiere que el esquema de inmunización no tiene regla general, casi todos los que se aplican con éxito han surgido del empirismo, con posterior perfeccionamiento. La vía de inoculación también es importante. Los Ags solubles se deben adsorber al adyuvante y ser aplicados por vía intramuscular. Los Ags particulados se pueden administrar sin adyuvante y las vías para lograr mejor respuesta son la endovenosa y la intraperitoneal. En nuestro estudio fue empleada la vía subcutánea y como ha sido planteado se obtuvieron títulos de anticuerpos $\geq 1:100$, resultados que consideramos satisfactorios.

Horsch y col.(1984) refieren que los sueros hiperinmunes con fines profilácticos y terapéuticos, generalmente se obtienen a partir de caballos, bovinos, ovinos y cerdos. El principal donante de suero tradicionalmente ha sido el caballo, a causa de su buena capacidad de reacción a un gran número de antígenos, su considerable volumen de sangre, además de su fácil docilidad y manejo. En cambio, los bovinos, ovinos y cerdos presentan menor capacidad de reacción antígenica, aunque su aprovechamiento como animales donantes de sueros hiperinmunes es notorio debido a la sensibilidad específica que poseen para determinados antígenos.

Resultados y Discusión

Estos autores también expresan que en bovinos el volumen de sangre obtenido en cada extracción es de aproximadamente de 2 L / 100 kg peso vivo. Esto está determinado por el estado general del animal productor de suero y de la estabilidad de sus sistemas hematopoyético e inmunitario. El plazo de aprovechamiento o explotación del animal donante puede prolongarse a discreción en correspondencia con su estado de salud.

Coincidimos con lo planteado por estos autores con relación al aprovechamiento de la capacidad volumétrica, ya que al bovino utilizado como donante se le extrajo en cada sangría parcial el volumen referido anteriormente y fue capaz de responder ante las sucesivas reestimulaciones antigénicas corroborándose su sensibilidad ante los antígenos inoculados.

3.1.1 Titulación de anticuerpos mediante la técnica de Seroneutralización (SN)

Los resultados del título de anticuerpos obtenidos, por SN fueron mayores para el parvovirus canino, mostrando títulos el moquillo y la hepatitis canina más bajos (Tabla 1). Sin embargo, los títulos logrados son capaces de influir positivamente en la protección de los animales, cumpliéndose con el requisito de la dosis protectora media ($2DP_{50}$). Es decir, los sueros hiperinmunes deben poseer títulos mayores de 1:100, para impedir la invasión de 100 Dosis Letal media (DL_{50}) del virus específico; según lo establecido por Duriez (1985) en el Doseer Técnico de la producción de un inmunosuero polivalente homólogo de los Laboratorios Rhone Merieux.

APHIS (2004), refieren que la seroneutralización es la técnica estándar y oficial para la titulación de anticuerpos frente al virus del moquillo, hepatitis canina y parvovirus, considerando también que para este último puede desarrollarse el ensayo de Inhibición de la hemaglutinación (IH).

3.1.1.1 Títulación de moquillo canino por SN

Con las observaciones realizadas con el ovoscopio durante el desarrollo del ensayo, valoramos la dilución más alta del inmunosuero que neutraliza al virus, no evidenciándose edemas ni pequeñas lesiones puntiformes rodeadas de un halo claro en la membrana corioalantoidea de los embriones de pollo. La observación de estas lesiones es típica en embriones infectados con el virus.

La interpretación de estos resultados se realizó por el método estadístico Reed y Muench (1938), lográndose títulos entre $10^{2.54}$ y $10^{2.63} DI_{50}$.

Resultados y Discusión

Goret y col. (1963) obtuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes contra el moquillo canino entre $10^{2.86}$ y $10^{3.7}$ DI_{50} en bovinos hiperinmunizados, empleando la técnica de SN y la interpretación por el método de Reed y Muench. También produjeron un suero hiperinmune de origen equino con títulos de $10^{2.62}$ DI_{50} .

3.1.1.2 Títulación de hepatitis y parvovirus canino por SN

Durante las lecturas del ensayo al observarse la monocapa celular con el microscopio óptico de lente invertido no se observaron cambios morfológicos, es decir no apareció el efecto citopático (ECP) típico de los virus de la hepatitis y parvovirus canina, en aquellas diluciones donde los anticuerpos neutralizaron el efecto viral.

El ECP observado en la línea celular MDCK producto a la infección por el virus de la hepatitis canina conlleva al redondeamiento celular y la aparición de células refringentes.

En el caso de la parvovirus el ECP observado en la línea celular RFCK producto a la infección por el virus consiste en el redondeamiento celular y la formación de sincitios.

La interpretación de estos resultados se realizó por el método estadístico Reed y Muench (1938), con títulos entre $10^{2.40}$ y $10^{2.45}$ DI_{50} para la hepatitis canina y títulos entre $10^{2.64}$ y $10^{2.75}$ DI_{50} para la parvovirus canina.

Contreras y col.(2002), elaboraron un suero polivalente hiperinmune de origen canino (homólogo) y otro de carneros (heterólogo), contra moquillo, hepatitis y parvovirus canina. El título de anticuerpos neutralizantes fue determinado por SN, obteniendo los siguientes resultados:

Inmunosuero	Título de anticuerpos neutralizantes		
	Moquillo	Hepatitis	Parvovirus
Perros	$10^{2.61} = 407$ U/mL	$10^{2.00} = 100$ U/mL	$10^{2.83} = 676$ U/mL
Carneros	$10^{2.90} = 794$ U/mL	$10^{2.26} = 180$ U/mL	$10^{2.86} = 725$ U/mL

Nuestros resultados desde el punto de vista cuantitativo difieren en el título de anticuerpos anti moquillo canino obtenido por estos autores en carneros, siendo aproximadamente 200 U/mL menores. El título de anticuerpos anti parvovirus canina obtenido en nuestros experimentos también resultó menor. En cambio, los títulos de anticuerpos anti hepatitis canina, alcanzaron niveles superiores de 265 U/mL.

3.2 Evaluación de los indicadores de calidad del inmunosuero.

3.2.1 Determinación de esterilidad

Las pruebas de esterilidad realizadas al suero hiperinmune resultaron satisfactorias. No hubo crecimiento de microorganismos viables: bacterias, hongos y levaduras. Nuestro producto cumple así con las especificaciones de calidad de los productos biológicos e inyectables, según lo establecido por la Farmacopea Británica del 2000.

3.2.2 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Biuret

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos en la concentración de proteínas mediante el método de Biuret a los tres lotes del suero hiperinmune.

Se alcanzaron resultados similares en los tres lotes experimentales, demostrando la reproducibilidad del experimento, con un coeficiente de variación de 1.4%.

Según lo referido por May y Leone (1963), la concentración de proteínas en el suero normal de bovinos está entre 61.6-82.2 g/ L. Al obtener valores superiores a estos, se corrobora que el animal donante está hiperinmunizado. Ello confirma los resultados obtenidos en la determinación de la potencia del inmunosuero por la técnica de seroneutralización.

3.2.3. Determinación de mertiolato

Los resultados obtenidos de la concentración final de mertiolato estuvieron dentro del límite permisible para productos biológicos e inyectables, según lo establecido por la Farmacopea Británica del 2000, que establece que la concentración permisible debe ser menor o igual a 0.1 mg/mL (Tabla 4).

Los autores refieren que para las sustancias conservadoras, en lo referente a su contenido se fijan valores límites, cuya cifra inferior debe asegurar la acción inhibitoria de los gérmenes, mientras que la superior conduce a la presencia de secuelas perjudiciales que ponen en duda la inocuidad del producto (Horsch y col, 1984).

3.2.4. Determinación del pH

Los resultados obtenidos en la evaluación del pH a los tres lotes del inmunosuero polivalente, fueron interpretados como satisfactorios, al encontrarse entre los intervalos 7.2 y 7.5. Esto se corresponde con las especificaciones en la Farmacopea Británica (2000), que refiere que para el suero crudo (suero no purificado) los valores deben de estar entre 7 y 8. (Tabla 3).

3.3. Resultados de las pruebas de inocuidad.

3.3.1. Determinación de inocuidad específica.

Los lotes experimentales resultaron seguros, pues al realizar la prueba de inocuidad en perros no ocurrieron reacciones locales anormales, específicamente en el punto de inoculación del suero y por otra parte, no aparecieron reacciones generales.

En el empleo de sueros hiperinmunes hay que señalar que para los receptores puede tratarse tanto de sueros homólogos como heterólogos. Mientras que la acción causal de los anticuerpos es independiente de la especie, requiere particular atención la tolerancia de proteínas séricas heterólogas por parte del receptor. Especialmente en el caso de aplicaciones repetidas de sueros hiperinmunes heterólogos hay que tener cuidado a causa de la posible presentación de la enfermedad del suero o shock anafiláctico. En el intervienen inicialmente mediadores como la histamina y la heparina, manteniéndose luego con la bradiquinina. Son característicos el edema, intensa hiperemia a nivel portal, hemorragias y la supresión de la coagulación sanguínea. Los animales enfermos sufren vómitos, diarreas hemorrágicas y con frecuencia colapso mortal. Algunas reacciones de hipersensibilidad pueden estar asociadas al uso de productos químicos (preservos).

Por otra parte, en la comprobación de la inocuidad es indispensable limitarse al animal adecuado, es decir, en la especie animal en que se ha de utilizar el inmunosuero en la práctica. En general puede afirmarse que la comprobación puede llevarse a efecto en los animales más sensibles. La verificación en los animales específicos no puede dejarse de realizar (Fenner y col, 1993).

Sin embargo, en nuestra prueba no observamos reacciones de hipersensibilidad, ni anafilaxia, por lo que los anticuerpos séricos heterólogos fueron asimilados por el receptor y el preservos no ocasionó daños perceptibles, comprobándose que el procedimiento establecido fue el adecuado, al dirigirse a la especie diana.

3.3.2. Determinación de inocuidad inespecífica (toxicidad)

La prueba de toxicidad realizada a los tres lotes experimentales, no evidenció reacciones locales, ni sistémicas significativas en los biomodelos experimentales (cobayos y ratones).

Esta prueba se correlaciona con el ensayo de inocuidad específica en cuanto a la posible aparición de efectos adversos que pudieran ocurrir al inocular el suero hiperinmune, coincidiendo con lo establecido con la Farmacopea Británica del 2000.

3.4. Evaluación de la eficacia del suero hiperinmune en perros enfermos con parvovirus.

Horsch y col. (1984) refieren que mediante investigaciones serológicas con pruebas suficientemente representativas se pudo determinar el estado inmunitario. Es necesario considerar la frecuencia y magnitud de las pruebas, así como la exactitud de los métodos y las particularidades de la enfermedad que se investiga. En los estudios serológicos deben determinarse cuantitativamente la aparición o no de anticuerpos, lo que indicará la presencia del agente etiológico o la susceptibilidad del animal que se investiga. Coincidiendo con este autor aplicamos investigaciones serológicas para la determinación de la susceptibilidad en el grupo experimental utilizado.

Los resultados obtenidos mediante la técnica serológica de inhibición de la hemaglutinación, demostraron la ausencia de anticuerpos neutralizantes contra la parvovirus canina. Los animales inoculados con la suspensión viral de parvovirus mostraron al tercer día síntomas clínicos típicos de la enfermedad como: anorexia, diarrea sanguinolenta y vómitos.

En el diagnóstico confirmativo se observó en los animales muestreados unidades hemoaglutinantes del virus (1:32), conjuntamente con la anamnesis demostró la entidad nosológica (parvovirus canino).

Un gran número de investigaciones han afirmado que muchas infecciones víricas pueden combatirse administrando sueros profilácticos o terapéuticos muy activos, que crean una concentración de anticuerpos suficientemente elevada en los tejidos sensibles a los virus. Los sueros específicos aplicados precozmente actúan contra la incipiente difusión del virus en el organismo. Además, en la inmunización pasiva tras la aplicación de inmunoglobulinas humorales comienza la protección de los animales de forma inmediata, la cual dura como máximo 2-3 semanas (Fainboin, 1995).

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento con el inmunosuero (terapia específica), fue el más adecuado, obteniéndose un 80 % de eficacia en comparación con los resultados del tratamiento paliativo, donde se obtuvo un 37.5% de eficacia (Tabla 5). La dosis empleada, realizando tres tratamientos con una frecuencia de 48 horas, logró la recuperación de la mayoría de los animales enfermos.

Por otra parte, en cuanto al volumen de suero a emplear Goret y col.(1963), obtuvieron mejores resultados en el tratamiento de perros enfermos cuando suministraron 9 mL de suero de origen canino y 7mL de suero de origen bovino. Sin embargo, Duriez (1985) ha recomendado el empleo de 2 mL/kg de peso.

En este sentido, Horsch y col. (1984) refieren que en sueros hiperinmunes homólogos y por lo general bivalente (moquillo y hepatitis canina), el aumento, la magnitud del título y duración del nivel eficaz de anticuerpos se halla en relación directa con la cantidad aplicada de suero por kg de peso. El máximo título de anticuerpos se alcanza transcurrido tres días y descende con rapidez. Con dosis medias la protección dura unos 10 días y si las dosis son altas (4 mL / kg de peso), unas semanas.

Contradictoriamente a lo planteado por estos autores, nosotros utilizamos un volumen de 1mL/kg de peso promoviéndose la respuesta inmunológica para prevenir el desarrollo del cuadro clínico.

Resultados similares han sido obtenidos por Infante y col. (1996), al usar Ig antimeningocócica hiperinmune contra varias cepas de *Neisseria meningitidis*, demostrando el alto poder protector de este medio terapéutico.

El Homoserum, procedente de los Laboratorios Rhone Merieux de Francia, ampliamente usado en la década de los 80 con una dosis de 5 – 10 mL/ kg, por vía subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV) en casos de urgencias. Por esta última vía se ganan 48 horas con respecto a la vía subcutánea pero se debe tener cuidado de no sobrecargar el sistema circulatorio al suministrar muchos fluidos, recomendando 5 mL en animales pequeños. Este producto se indica para el tratamiento y prevención de moquillo canino, hepatitis canina, parainfluenza y *Bordetella bronchiseptica*.

La seroprevención se destina a perros sanos no vacunados, que pueden estar sometidos a contagios y cuyo estado fisiológico contraindica la vacunación.

Por otra parte, Horsch y col (1984) recomendaron el suero bivalente moquillo-hepatitis canina, por vía subcutánea e intramuscular, cuando hay peligro de contagio o está la enfermedad en fase de incubación vírica.

Resultados y Discusión

Coincidimos con la vía utilizada por estos autores, pues tras la inoculación de nuestro preparado inmunizante se obtuvieron respuestas adecuadas, inclusive combinando dos vías de inoculación en la terapia de los casos graves (1^{ra} inoculación IV, 2^{da} y 3^{ra} SC).

Durante la década de los 80, muchos veterinarios utilizaron con resultados positivos la inmunización pasiva para la prevención y terapia de enfermedades tanto de origen bacteriano como de origen viral, entre las que podemos citar la fiebre aftosa (picornavirus) en bovinos (Hernández, 1987).

También en el mal rojo del cerdo, causado por *Erysipelothrix insidiosa*, se usó ampliamente la inmunización pasiva mediante la administración de suero hiperinmune de cerdo y de caballo. Los sueros contenían 100 UI / mL. El suero se utilizó con fines profilácticos por vía SC en dosis de 0.1 mL/kg de peso vivo. En brotes de mal rojo se utilizó con fines profilácticos en animales todavía sin enfermar y sin mostrar fiebre, en dosis de 0.2 mL/ kg de peso vivo, con un máximo de 20 mL. Como tratamiento terapéutico se empleó en dosis de 0.5 mL/kg de peso vivo por vía IV o también 0.7 mL/kg de peso vivo por vía intraperitoneal en combinación con antibióticos.

En la infección con el Picornavirus de la parainfluenza -3 de los bovinos, se empleó con éxito el suero de convalescentes, los sueros hiperinmunes y las gamma globulinas.

En terneros infectados por Adenovirus, la aplicación por vía intratraqueal de sueros hiperinmunes permitió disminuir las manifestaciones clínicas y las bajas.

En la pasterelosis secundaria de los bovinos ocasionada por *Pasteurella multocida*, *P. haemolytica* o por contagio con ambos gérmenes, se administró a títulos terapéuticos sueros hiperinmunes polivalentes y gamma globulina por vía intramuscular o intravenosa. La dosis no fue inferior a 50 mL, siendo por lo común de 100 a 150 mL.

En la salmonelosis en los bovinos, causada por *Salmonella dublín*, para reforzar las medidas quimioterapéuticas en los animales enfermos y para la profilaxis, se aplicó suero hiperinmune intravenoso e intramuscular en dosis de 50-100mL.

También en la infección con *Escherichia coli* en los bovinos, se empleó la inmunización pasiva con sueros hiperinmunes y gamma globulinas, administrando 20-50 mL de suero hiperinmune por vía intravenosa.

El uso de suero antitetánico ha sido ampliamente usado en la protección pasiva cuando existe peligro de infección. Con fines preventivos si los caballos no sufren heridas, recibirán 7.500 UI por vía subcutánea, pero en caso contrario se aplicará 15.500 UI (Horsch y col, 1984).

Resultados y Discusión

Estas experiencias, nos permiten corroborar nuestros resultados, ya que en todos los casos se obtuvieron hallazgos positivos en el tratamiento de enfermedades infecto contagiosas tanto de origen viral como bacteriano. Algunos estudios coinciden con la vía de inoculación empleada por nosotros, no así con la dosis administrada, dado a que en muchos casos se administraron volúmenes mayores a los nuestros. Sin embargo, con dosis menores obtuvimos resultados halagüeños.

Recientemente, Hoskins (2003), refiere que el tratamiento para la infección por herpesvirus en caninos, en general es muy poco útil, dada su progresión rápida y fatal. La mortalidad de los cachorros se puede reducir con inyecciones intraperitoneales de 1 a 2 mL de sueros hiperinmunes obtenidos de perras recién infectadas. Otra posibilidad es inyectar una vez por día, por vía subcutánea, en días seguidos, 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.2 mL y terminar con la aplicación de 0.1 mL del mismo suero.

Por otra parte, en la Facultad de Medicina Veterinaria de Auburn, Alabama, se ha desarrollado una nueva terapia que permite una disminución considerable de los costos y el tiempo requerido para tratar a perros que muestran signos de infección por parvovirus. Todos los costos (medicación, tiempo de hospitalización) se redujeron a la mitad, y la mortalidad disminuyó de un 16 a un 10% (<http://Farmacocinética Faboterápicos>).

Este nuevo tratamiento incluye la inyección de inmunoglobulina G (IgG) canina liofilizada extraída del suero de animales recuperados de la infección por parvovirus. En ensayos clínicos, los pacientes tratados con esta IgG, además del tratamiento tradicional, se recuperaron más rápidamente que los perros que no recibieron IgG. Además, ninguno de los pacientes tratados con IgG necesitaron nutrición intravenosa. A pesar de que el único tratamiento es el paliativo, este no es tan largo cuando se utiliza a la vez IgG. Cuando la enfermedad está en curso, la recuperación usualmente es completa, y los perros desarrollan inmunidad de por vida contra la reinfección.

En este sentido, el laboratorio Bio Vet, de Venezuela ha introducido en el mercado unos nuevos productos que consisten en una solución de inmunoglobulinas purificadas y concentradas. Una de ellas es el CINO-GLOBULIN contra el Moquillo, la Hepatitis infecciosa canina y la Leptospirosis provocada por *L. canícula* e *L. icterohaemorrhagiae*, teniendo todavía como auxiliar anticuerpos contra los agentes secundarios *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus sp* y *Salmonella thyphimurium*. El producto cuando es inyectado confiere a los perros inmunidad pasiva inmediata, pasando a neutralizar los agentes etiológicos de estas enfermedades y los agentes secundarios. El otro suero es el Entero-globulín, contra la Coronavirosis y parvovirosis caninas. La actuación fundamental de este suero consiste en casos donde hay riesgo de infección momentánea. La potencia del producto es verificada a través de las pruebas de seroneutralización, frente a los respectivos virus (<http://Biovet-UCO>).

Estos sueros son indicados como medida profiláctica en los perros sensibles cuando exista un alto riesgo de contagio de algunas de estas enfermedades o en el tratamiento curativo cuando ya se ha diagnosticado la infección.

Resultados y Discusión

Ambos sueros son administrados por vía subcutánea. Como medida profiláctica, la dosis indicada del suero es de 0.5 a 1 mL / kg de peso corporal, permaneciendo en el organismo en niveles satisfactorios de 6-7 días, recomendando ser aplicada cada 5 a 6 días. Como tratamiento curativo, se recomienda usar 1 a 2 mL y repetir la dosis dentro de 24 a 48 horas o según criterio médico.

Los resultados del presente trabajo coinciden con los obtenidos por estos autores, independientemente de que ellos emplearon una IgG purificada y en nuestro caso administramos un suero hiperinmune donde van contenidos niveles protectores de gamma globulinas. Con relación a la dosis terapéutica y la frecuencia del tratamiento, utilizamos un esquema similar al referido por estos investigadores 1 mL/kg de peso cada 48 horas y obtuvimos un 80 % de recuperación, resultado que consideramos satisfactorio.

3.5 Valoración económica.

En cuanto a los datos económicos, cabe señalar que la producción de este inmunosuero podría establecerse con ventaja económica para la Empresa. En primer término, porque no existe en el mercado nacional un producto que se emplee como terapéutico en estas enfermedades y desde el punto de vista social, reviste gran importancia, debido a su alta demanda del mismo por la población, asociado al incremento y afectividad de la masa canina en la actualidad.

Con vista a suplir esta demanda se establecerá la estandarización del suero para determinar con exactitud el rendimiento del volumen de sangre obtenido.

A continuación, se reflejan las utilidades económicas que podrían obtenerse con la producción industrial de este inmunosuero polivalente estandarizado. Producción y control de 1 litro de suero.

- Gastos necesarios \$ 456.75 MN
- Utilidades. Valor de venta de 1ml de suero \$ 2,5 MN
- 1 litro \$ 2 500 MN
- \$ 3 570 -\$ 456.75 gastos = \$ 3293.25 de utilidades.

Por otra parte, podemos decir que el animal donante puede someterse a varias sangrías por un intervalo de 2 meses, aportando un volumen de 2 L de sangre que equivale aproximadamente a 1 L de suero, siempre y cuando los títulos de anticuerpos sean mayores o iguales a 10^2 DP₅₀.

CONCLUSIONES

- Se logró producir un suero hiperinmune polivalente específico, contra moquillo, hepatitis y parvovirus principales enfermedades virales caninas de circulación en nuestro país.
- La especie animal seleccionada y el esquema de inmunización desarrollado con cuatro inoculaciones subcutáneas de la mezcla viral, resultaron apropiados para la obtención de volúmenes de suero de 1L con títulos elevados de anticuerpos contra los tres virus inoculados, particularmente contra el parvovirus canino con valores de 504 U/mL.
- La evaluación de los indicadores de calidad microbiológica, físico-química y bioquímica en el suero hiperinmune arrojó evidencias satisfactorias, cumpliendo los lotes obtenidos con las especificaciones establecidas para este tipo de producto.
- Los ensayos de inocuidad específica e inespecífica resultaron satisfactorios según los parámetros establecidos para un producto inyectable, al no observarse en los animales reacciones adversas de carácter local o sistémicas.
- La administración del inmunosuero a perros Beagles enfermos con la parvovirus como parte del tratamiento conllevó a una recuperación del 80%, resultando su eficacia superior a la del tratamiento paliativo convencional que posibilitó una recuperación sólo del 37.5%.

RECOMENDACIONES

- Realizar las pruebas de eficacia, en animales enfermos con moquillo y hepatitis canina.
- Evaluar el efecto del inmunosuero polivalente en la protección de animales susceptibles.
- Someter el inmunosuero a las pruebas clínicas de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K. Lichtman, A. H.; Pober, J.S.2000. Inmunología Celular y Molecular. 3^{ra} Edición. Ed. Mc Graw-Hill. International.

Adelus-Neveu, F. ; Saint-Gerard A. ; Fayet G..1998. La maladie de Carré.Leslecons d'une épidémiologie. Prat. Med. et. Chirur. An Compagnie. pp : 455-461.

Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Parvovirus.2004.

Appel, M.J. 1996. Dog Lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. Journal of Vet Diagnostig Invest. 4(3):258-263.

Appel, M.J. 1999. Forty years of canine vaccination. Adv Vet Med ;41:309-24.

Bell, S.C.; Carter, S.D.; Bennett, D. 1995. Canine distemper viral antigens and antibodies in dogs with rheumatoid arthritis. Research in Vet Sci. 50(1):64-681.

Birchard, S.J . Sharding, G. R. 1997. Saunders manual of small animal practice.

Blixenkrone, M.; Svansson, V. 1998. Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. Vet Microbiol.Oct. :37 (1-2): 163-73.

Castellano, C. 1996. Vacunación en los caninos. Consideraciones acerca de un acto médico". Universidad Nacional de La Plata. Revista de medicina veterinaria, Vol 74 N° 2.

Chalmers, W.S.; Baxendale, W. 1996. A comparison of canine distemper vaccine and measles vaccine for the prevention of canine distemper in young puppies. Vet Rec.Oct 8; 135(15):349-53.

Contreras, D.; Menéndez, D.; Paneque, M. 2002. Obtención de un inmunosuero en carneros y perros contra enfermedades virales en caninos. FORUM XIV de la Empresa cubana de Productos Veterinarios..

Cooper, P. E. ; Chappuis, G.1995. Comparación de la eficacia de diferentes vacunas caninas usadas en forma monovalente o asociada. Me.Vet. Vol12 n5 22-26.

Coyne, M. J. 2000. Seroconversion of puppies to canine parvovirus and canine distemper virus: a comparison of two combination vaccines. J Am Anim Hosp Assoc. Mar-Apr; 36 (2):137-42.

Day M.J. 1999. Possible immunodeficiency in related Rottweiler dogs. J Small Anim Pract. Dec;40 (12): 561-8.

Duriez, M. 1985. Dossier Immunoserum polyvalent homologue contre les principales affections virales et bactériennes du chien Rhone Merieux.

Referencias Bibliográficas

- Duval, D.; Giger, U. 1996. Vaccine associated immune mediated hemolytic anemia in the dog. J Vet Intern Med. Sep;-Oct; 10 (5):290-5.
- Edsall, S. 1998. Viral enteritis in Greyhound puppies. A case report. Companion Animal Practice-Medicine. 19(2): 16-21.
- Ettinger, S.J., Fieldman, E.C. 1997. Tratado de medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Ed. Interamérica. Buenos Aires. Argentina. Vol. 1. p 490-494.
- Fainboin, L. Satz, L.M.1995. Introducción a la inmunología Humana. Talleres Gráfica Patricia SRL. 3^{ra} Edición. Argentina.
- Farmacopea Británica 2000. Ensayos de identidad.
- Fenner, F.J; Gibas, E.P.J; Murphy, F.A.;Rott, R.; White, D.O. 1993. Veterinary Virology, Second Edition. Academic. Press, Inc. EUA: 3-87,120 - 61.
- Goodman and Parslow. 1994. Immunoglobulin proteins. En: Stities DP. Terr Al, Parslow (eds). Basic and Clinical Immunology. 8th edition. Norwalk, Appleton and Lange, pp:66-79.
- Goret, P. ; Pilet, Ch. ; Et Fontaine, J. 1963. Préparation chez le Bovin et titrage d' un sérum contre la maladie de Carré. Bul. Acad. Vet. Janvier.
- Harrison, L.R.; Styer, E.L.; Pursell, A.R.; Carmichael, L.E.; Nietfeld, J.C.1998. Fatal disease in nursing puppies associated with minute virus of canines. J Vet Diagn Invest , 4:19-22.
- Harrus S, Waner T. 2002. Development of hypertrophic osteodystrophy and antibody response in a litter of vaccinated Weimaraner puppies. J Small Anim Pract ,Jan;43(1):27-31.
- Herber, W.J. 1979. Mineral oil adjuvants and the immunization of laboratory animals. En: Weir DM ed. Handbook of experimental immunology. Application of immunology methods. Vol. 3, 3^{ra} edition Oxford, Blackwell scientific Publications; pp A₃-1-A₃.15.
- Hernández, PU.M. 1987. Manual Teórico de Virología. ISCAH. ENPES:1-350.
- Horsch, F.; Buchwalder, R.; Hoffman, F.; Horst, B.K.; Funchs, W.; Heider, G.; Heiper, T.H and Meinsinger, H. 1984. Inmunoprofilaxis de los animales domésticos. Editorial Acribia. S.A. España. ND.
- Hoskins, J.D. 2003. Canine Viral Enteritis. In: Greene CE, ed. Infectious diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: WB Saunders Co, 45. - Saunders - Available from amazon.com.

Referencias Bibliográficas

Hoskins, J.D. Abood, S.; Dunn, T.; Polly, D.; Willard, M. 1996. Clinical managment of canine parvovirus. *Canine Practice*. 21 (1):20-22.

Infante, B. J. F. y col. 1996. *Neisseria meningitidis*. Resultdos experimentales sobre biomodelos de ratón y rata. Ediciones Finlay. C. Habana..

Iwanaka, M.; Orita, S.I.; Mokuno, Y. 1996. Tyzzer's disease complicated with distemper in a puppy. *Jour of Vet Med. Sci.*55(2):337-339.

Jarplid, B.; Johansson, H., Carmichael, L.E. 1996 A fatal case of pup infection with minute virus of canines (MVC). *J Vet Diag Invest*; 8:484-487.

Larraga, V.; Fresno M.; Enjuanes L. 1987. Nuevas tendencias inmunologicas. Editorial Trillas.

Kobayashi, Y., Ochia, K., Itakura, C. 1996. Dual infection with canine distemper virus and infectious canine hepatitis virus (canine adenovirus type 1) in a dog. *Jour of Vet Sci*. 55(4):649-701.

Larson, L.J.; Wynn, S.; Schultze, R.D. 1996. A canine parvovirus nosode study. *Proc. Ann. Midwest Holostic Vet Conf.*, 2:98-99.

Machida, N.; Kiryu, K. 1998. Pathology and epidemiology of canine distemper in raccon dogs. (*Nyctereutes procyonoides*). *Jour of Comparative Pathology*. 108(4):383-392.

Mann, M.; Peter. C. and Max, J.G. 1996. Canine parvovirus infection in South American canids. *JAUMA*. Vol 177(9),pp779-783.

Mansfield, E.; Philip D. 1996. Vaccinations of Dogs and Cats in Veterinary Teaching Hospitals in North America. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 28 (N8), 1245-1246.

Marcaney, L.; Panish, C.; Ben, C. 1998. Characterization of minute virus canine and its pathogenicity for pups. *Cornell Veterinarian* 78(2): 131-145.

Margni, R. A. 1989. Preparación de sueros inmunes y purificación de anticuerpos. En: Margni ed. *Fundamentos. Inmunología e Inmunoquímica*, 4^{ta} edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, pp: 670-677.

May, D. & leone, C. 1963. Serological shelf life of serum proteins under various conditions of storage. *Trans. Kans. Acad. Sci*. 66, 771-777.

Referencias Bibliográficas

- Mc. Ewan, A.D., Fisher, E.W. and Selman, I.E. 1995. Observations on the Immuno Globulin Levels of Neonatal Calves and their relationship to Disease. J. Com. Path. 80:259-265.
- Méndez,B.V.; Willys, C.T. 1997. Primer Coloquio de Medicina Veterinaria en Animales Afectivos.
- Merck, S.; Limited, D. 2000. Manual Merck de Veterinaria. 5^{ta} Edición Océano. Grupo Editorial. Barcelona. España.
- Meyer, E. K. 2001.Vaccine associated adverse events. Vet Cli North Am Small Anim Pract. May; 31 (3):493-514.
- Miyamoto, T; Taura, Y. 1995. "Immunological responses after vaccination, Pre and post surgery in dogs". Journal of Veterinary Medical Science. 57: 1, 29-32.
- Moraillón, A. 1996. La PVC. Anne Moraillón. Rec Med. Vol 58(9-11),pp687-705.
- Moraillón, A. 1998.Virus del Moquillo canino. Infecciones secundarias. Rev. Med. Vet. 179 : 653- 662.
- Neu, S.M., Dubey, J.P. 1995. Pulmonary coccidiosis in a dog. Joour of Vet Diag Investig 4(4):490-492.
- Olson, P. 1996. Canine parvovirus infection, canine distemper and infection canine hepatitis: inclination to vaccinate and antibody response in the Swedish dog population. Acta veterinary scandinavica.
- Paneque, M.; Contreras, D.; Menéndez, D. 1996. Obtención de u suero hiperinmnune de origen equino contra parvovirosis canina. Forum. de LABIOFAM.
- Peter, C. 1997. Gastroenteritis canina asociado con un agente parecido a la PVC. The canadian veterinary journal. Vol 19 #12. p346.
- Phillips, T. R.; Jensen J. L. 1998. Effects of vaccines on the canine immune system. Can J Vet Res. Apr; 53(2):154-60.
- PNO " Ensayo de esterilidad por el método directo" Código 803003. del Departamento de Control Interno. LABIOFAM.
- PNO "Determinación de proteínas totales. Método Biuret" Código. 804022 del Departamento Bioquímico de Control de la Calidad. LABIOFAM.
- PNO: "Determinación de timerosal". Código. 804013 del Departamento Bioquímico de Control de la Calidad. LABIOFAM.

Referencias Bibliográficas

- Pratelli, A. ; Buonavoglia, D. 1999. Tempesta M, et al. Fatal canine parvovirus type-1 infection in pups from Italy. J Vet Diagn Invest; 11:365-367.
- Ramirez, R.I. 1998. Diagnóstico de Maquillo Canino por inmunofluorescencia directa en perros diagnosticados clínicamente como rabiosos. Vet Mexico. 20(2):161-167.
- Raw, M.E.; Pearson, G.R.; Brown, P.J. 1995. Canine distemper infection associated with acute nervous signs in dogs. Vet Record. 130(14):291-293.
- Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:439-497.
- Rikula U, Nuotio L, Sihvonen L. 2000. Canine distemper virus neutralising antibodies in vaccinated dogs. Vet Rec, Nov 18;147(21):598-603.
- Schoning, P.; Layton, C.E. 1996. Canine Distemper with Spinal cord lesions. Jour of Vet Med. 39(8):571-574.
- Schultz, R. D. 1998. Current & Future Canine & Feline Vaccination Programs. Vet Med 3: No. 3, 233-254.
- Schultz, R.D. 1999. Duration of Immunity to Canine Vaccines: What We Know and What We Don't Know, International Veterinary Information Service.
- Schultz, R.D. 2000. Duration of immunity to Canine Vaccines. WhatWe Know and Don not Know.
- Schultz, R.D. 2001. El sistema inmunológico y las vacunas.Desafíos para el siglo XXI.
- Scott, J.C.; Azcona-Olivera J, Glickman, N.W. 2002. Evaluation of antithyroglobulin antibodies after routine vaccination in pet and research dogs. J Am Vet Med Assoc. Aug 15;221(4):515-21.
- Sharp, N.J.H; Davis, B.J. 1999. "Hydranencephaly and cerebellar hypoplasia in two kittens attributed to intrauterine parvovirus infection". Journal of Comparative Pathology. 121: 1, 39-53.
- Smith, Cairn. 1995. *Are we vaccinating too much?* Journal of the American Veterinary Medical Association. 207(4).
- Thulen, J.D.; Grandstron, D.E. 1998. Concurrent protozoal encephalitis and canine distemper virus infection in a raccoon. Vet Record. 130(8):162-164.
- Tijseen, P. 1985. Practice and Theory of enzyme immunoassays. Production of antibodies. En: Burdon R. H., van Knippenderg PH eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Vol.15. Amsterdam, Elsevi Scienzie Publishers BV; pp 43-78.

Referencias Bibliográficas

Tipold, A.; Vardevelde, M.; Jaggy, A. 1997. Neurological manifestations of canine distemper virus infections. Jour of Small Anim. Practice. 33(10):446-470.

Truyen, U.; Wolf, G. ; Carmichael, L.E. 1996. Das 'andere' parvovirus: Erstbeschreibung des minute virus of canines (canines parvovirus Typ 1) in Deutschland. Tierarztl Prax; 24:511-513.

[URL:http://Biovet-UCO](http://Biovet-UCO). Consultada 10-01-05. 2:25 PM

[URL:http://Farmacocinética](http://Farmacocinética) Faboterápicos. Revisada 21-01-05. 3:15 PM

Zamora, P. 1992. Manual de farmacología Veterinaria. Tomo I y II. La Habana. ISCAH.

Zimmer, J. F. 1997. Gastric and Intestinal disorders of young Dogs and Cats. James F.Zimmer; Roy V.H.Pollock. Veterinary clinics of North American: Small animal practice. Vol: 17(3):pp641-654.

Zupanci Z. 1998. Some biophysical properties of an infectious canine hepatitis virus (CAV 1).Yugoslavia.Veterinariski Archiv.1990.

Anexos

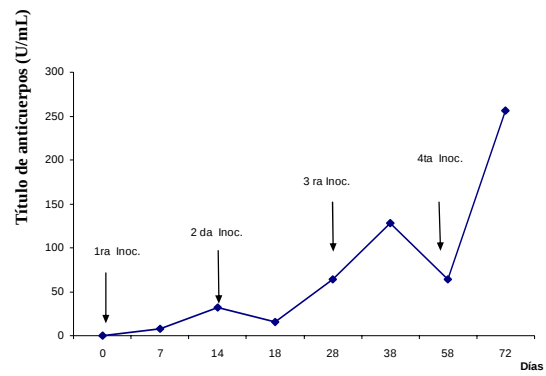


Gráfico 1. Dinámica de producción de anticuerpos anti Moquillo canino.

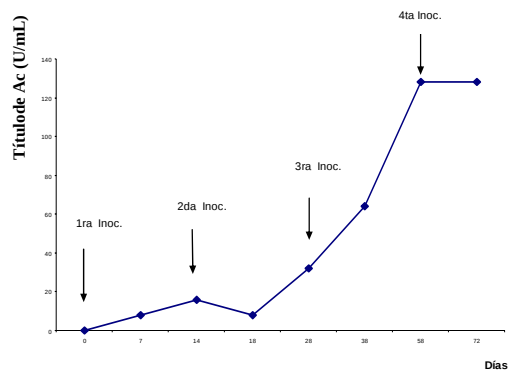


Gráfico 2. Dinámica de producción de anticuerpos anti Hepatitis canina

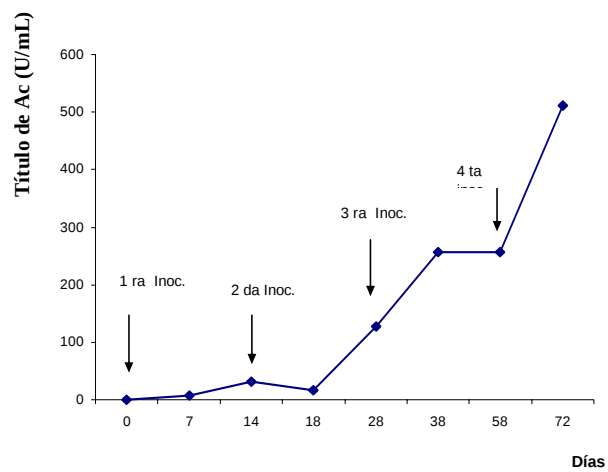


Gráfico 3. Dinámica de producción de anticuerpos anti Parvovirus canino.

Tabla 1. Títulos de anticuerpos neutralizantes mediante la técnica de seroneutralización en los lotes de suero hiperinmune.

Lotes	Título de anticuerpos (DP ₅₀ , U/mL)		
	Moquillo	Hepatitis	Parvovirus
I	10 ^{2.54} , 347	10 ^{2.42} , 265	10 ^{2.71} , 513
II	10 ^{2.56} , 396	10 ^{2.45} , 282	10 ^{2.64} , 437
III	10 ^{2.63} , 427	10 ^{2.40} , 252	10 ^{2.75} , 563
$\bar{x} \pm D.E$	10 ^{2.58} , 390 $\pm$ 40	10 ^{2.42} , 266 $\pm$ 15	10 ^{2.70} , 504 $\pm$ 63
C.V	10.2%	5.6%	12.5%

Tabla 2. Concentración de proteínas totales determinadas por el método de Biuret, en los lotes de suero hiperinmune.

Lotes	Conc. ₁ (g/L)	Conc. ₂ (g/L)	Conc. ₃ (g/L)	Conc. Promedio en cada lote (g/L)
I	111.7	111.6	111.7	111.7
II	109.5	109.5	109.4	109.5
III	112.6	112.6	112.7	112.6

$$\bar{x} \pm D.E. = 111.3 \pm 1.6$$

$$C.V = 1.4 \%$$

Tabla 3. Valores de pH en el los lotes el suero hiperinmune.

Suero hiperinmune	Valor de pH
Lote I	7.3
Lote II	7.2
Lote III	7.4
$\bar{x} \pm D.E$	7.4
C.V	1.4 %

Tabla 4. Concentración de mertiolato residual en los lotes de suero hiperinmune

Suero hiperinmune	Concentración de mertiolato (mg/mL)
Lote I	0.077
Lote II	0.075
Lote III	0.08
$\bar{x} \pm D.E.$	0.077 ± 0.003
C.V	3.9 %

Tabla 5. Eficacia del tratamiento con el inmunosuero en animales enfermos con parvovirus canina.

Grupos	Total de animales	No de enfermos	No de recuperados	% de eficacia
I (Control)	8	8	3	37.5%
II (Inmunosuero)	10	10	8	80%