

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍAS BIOLÓGICAS Y  
QUÍMICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA



**“ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA  
HEMAGLUTINACIÓN APLICADA AL DIAGNÓSTICO DE  
PARVOVIRUS CANINO (CPV), AREQUIPA - 2015”**

**“STANDARDIZATION OF HAEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST  
APPLIED TO DIAGNOSIS OF CANINE PARVOVIRUS (CPV),  
AREQUIPA - 2015”**

Tesis Presentada por el Bachiller:

**JULIO CÉSAR QUISPE MACHACA**

Para optar el Título Profesional de:

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA.**

**Arequipa – Perú**

**2015**



*"No importa cuánto sabes, sino las ganas que tienes por seguir aprendiendo"*

*- Anónimo -*



*DEDICATORIA*

*A mis queridos padres María y Julio, por todo el amor, paciencia y confianza que siempre me han brindado.*

*A mis hermanos Luz, Víctor y María Eugenia, por todo el amor, comprensión y apoyo que siempre me brindan para poder seguir adelante.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesor el Dr. Fernando Fernández Fernández, por su paciente y valioso asesoramiento, por su orientación y asistencia que me permitieron la culminación de este trabajo.

A mis jurados, el Dr. Ovidio Velasco Velásquez, la Dra. Verónica Valdez Núñez y el Dr. Jorge Zegarra.

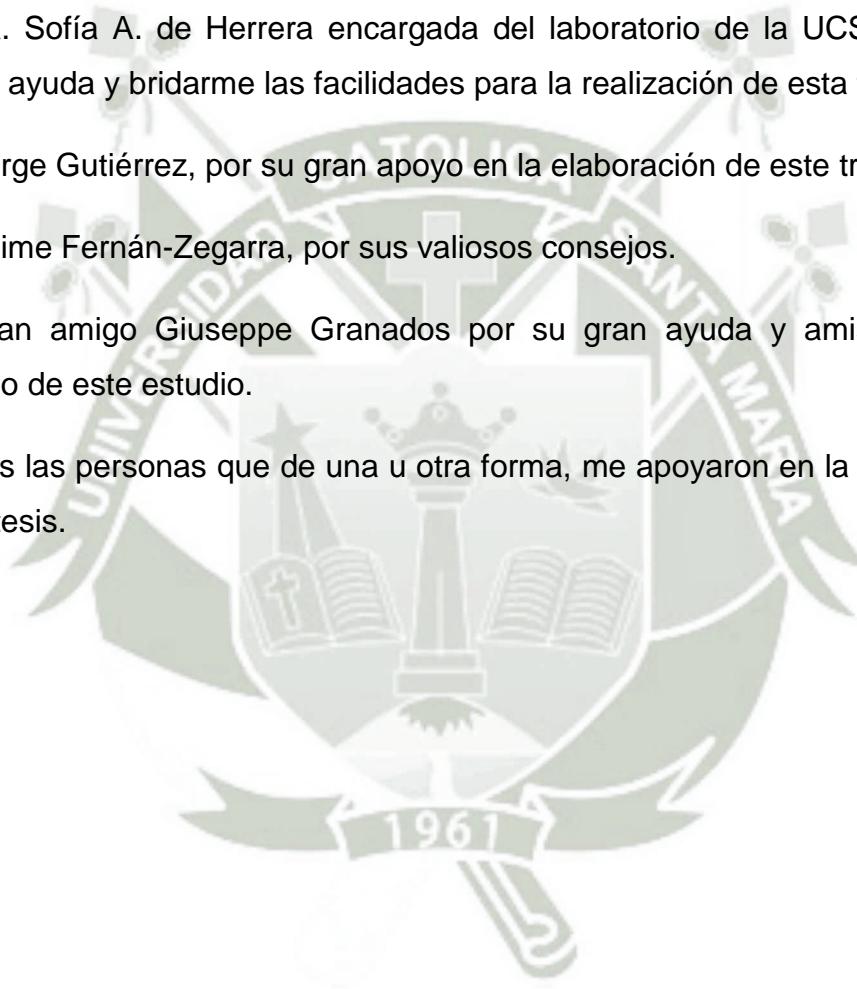
A la Sra. Sofía A. de Herrera encargada del laboratorio de la UCSM, por su paciente ayuda y brindarme las facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge Gutiérrez, por su gran apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Jaime Fernán-Zegarra, por sus valiosos consejos.

A mi gran amigo Giuseppe Granados por su gran ayuda y amistad en el desarrollo de este estudio.

Y a todas las personas que de una u otra forma, me apoyaron en la realización de esta tesis.



## ABREVIATURAS

	INGLES	ESPAÑOL
ANOVA	-	Análisis de varianza
CID	-	Coagulación intravascular diseminada
CPV	Canine Parvovirus	Parvovirus canino
DA <sub>50</sub>	-	Dosis aglutinante media
DNA	Deoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
EDR	-	Enzima destructora de receptores
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Ácido Etildiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.
FPLV	Feline Panleukopenia Virus	Virus de la panleucopenia felina o parvovirus felino
GI	-	Gastrointestinal
HA	Hemagglutination	Hemaglutinación
HI	Hemagglutination Inhibition	Inhibición de la hemaglutinación
IC	Immunochromatography	Inmunocromatografía
IgM	-	Inmunoglobulina M
ME	-	Microscopía electrónica
MEV	Mink enteritis virus	Virus de la enteritis del visón
NANA	N-acetylneuraminic acid	Ácido N-Acetilneuramínico
PBS	Phosphate Buffered Saline	Buffer fosfato salino o tampón fosfato salino.
PCR	Polymerase Chain Reaction	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	-	Revoluciones por minuto
SA	Sialic Acid	Ácido siálico
SN	-	Seroneutralización
UH	-	Unidades hemaglutinantes
UAP	-	Unidad aglutinante porcentual
UIP	-	Unidad inhibitoria porcentual
UV	-	Ultravioleta
TCID <sub>50</sub>	Tissue Culture Infections Dose	Dosis Infectante Media en Cultivo de Tejidos
VI	Virus Isolation	Aislamiento viral

## ÍNDICE DE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	Enunciado del problema.....	1
1.2.	Descripción del problema.....	1
1.3.	Justificación del trabajo .....	2
1.3.1.	Aspecto general.....	2
1.3.2.	Aspecto tecnológico .....	2
1.3.3.	Aspecto social.....	2
1.3.4.	Aspecto económico.....	3
1.3.5.	Importancia del trabajo .....	3
1.4.	Objetivos .....	4
1.4.1.	Objetivo general.....	4
1.4.2.	Objetivos específicos.....	4
1.5.	Planteamiento de la hipótesis.....	4
II.	MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL.....	6
2.1.	Análisis bibliográfico.....	6
2.1.1.	EL PERRO.....	6
2.1.2.	PARVOVIROSIS CANINA .....	7
2.1.3.	LA SANGRE .....	12
2.1.4.	HEMAGLUTINACIÓN.....	14
2.1.5.	INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.....	15
2.2.	Antecedentes de investigación.....	17
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1.	Materiales .....	24
3.1.1.	Localización del trabajo .....	24
a.	Localización espacial .....	24
b.	Localización temporal .....	24
3.1.2.	Material biológico.....	24
3.1.3.	Materiales de laboratorio.....	24
3.1.4.	Materiales de campo.....	26
3.1.5.	Equipos y maquinaria .....	26
3.1.6.	Otros materiales.....	27
3.2.	Métodos .....	27
3.2.1.	Muestreo .....	27

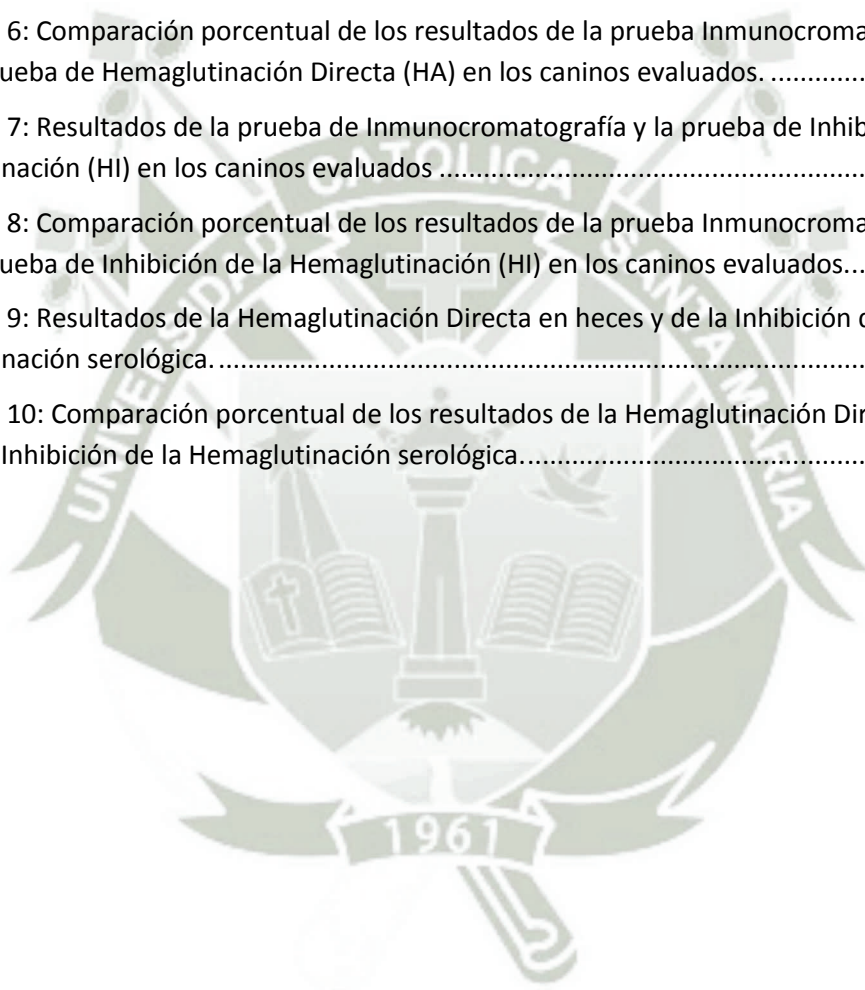
a. Universo .....	27
b. Tamaño de la muestra .....	27
c. Procedimiento de muestreo .....	27
3.2.2. Formación de unidades experimentales .....	27
3.2.3. Métodos de evaluación:.....	28
a. Metodología de la experimentación.....	28
b. Ajustes metodológicos .....	34
c. Recopilación de la información .....	35
3.2.4. Variables de respuesta .....	35
a. Variables independientes .....	35
b. Variables dependientes .....	35
3.2.5. Evaluación estadística .....	36
a. Diseño experimental .....	36
▪ Unidades experimentales.....	36
▪ Diseño de tratamientos.....	36
▪ Distribución de tratamientos .....	36
b. Análisis estadísticos .....	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
V. CONCLUSIONES .....	58
VI. RECOMENDACIONES.....	59
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	60
VIII. ANEXOS .....	69

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1: Medianas de los títulos obtenidos en la prueba de HA.....	42
Cuadro N° 2: Títulos Hemaglutinantes promedio de los eritrocitos caninos, según su concentración.....	44
Cuadro N° 3: Títulos hemaglutinantes promedio de los eritrocitos porcinos, según su concentración.....	45
Cuadro N° 4: Títulos hemaglutinantes promedio de los eritrocitos aviáres, según su concentración.....	46
Cuadro N° 5: Resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.....	48
Cuadro N° 6: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados .....	49
Cuadro N° 7: Resultados de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados .....	51
Cuadro N° 8: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.....	52
Cuadro N° 9: Resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y de la Inhibición de la Hemaglutinación serológica .....	54
Cuadro N° 10: Comparación porcentual de los resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.....	55

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Comparación de las medianas de títulos obtenidos en la prueba de Hemaglutinación, según la especie animal .....	42
Gráfico N° 2: Curva DA <sub>50</sub> para los eritrocitos caninos .....	44
Gráfico N° 3: Curva DA <sub>50</sub> para los eritrocitos porcinos.....	45
Gráfico N° 4: Curva DA <sub>50</sub> para los eritrocitos aviaries .....	46
Gráfico N° 5: Resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.....	48
Gráfico N° 6: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados. ....	49
Gráfico N° 7: Resultados de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados .....	51
Gráfico N° 8: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.....	52
Gráfico N° 9: Resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y de la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.....	54
Gráfico N° 10: Comparación porcentual de los resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.....	55



## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Mapa o croquis de ubicación .....	69
ANEXO N° 2: Reactivos para Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación.....	70
ANEXO N° 3: Preparación de Buffer y Soluciones para Hemaglutinación .....	71
ANEXO N° 4: Tablas de resultados .....	73
ANEXO N° 5: Pruebas estadísticas.....	76
ANEXO N° 6: Fotografías .....	83
ANEXO N° 7: Anotaciones .....	97



## RESUMEN

La parvovirus canina es una de las enfermedades más mortales y comunes dentro de la clínica veterinaria de nuestro medio, por lo cual el diagnóstico de laboratorio debe constituir un arma fundamental en su control y erradicación. De otro lado, la propiedad para aglutinar eritrocitos es una característica estructural y fisiológica del parvovirus, que permite evidenciarlo, identificarlo y cuantificarlo mediante ensayos sencillos. Por esta razón el objetivo principal del presente trabajo fue estandarizar la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación para su uso en el diagnóstico clínico de la parvovirus canina. El estudio se llevó a cabo entre los meses de abril a septiembre del 2015, en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María. A partir de muestras de sangre de 12 caninos, 12 porcinos y 12 aves, en solución de Alsever; mediante centrifugación y lavados sucesivos, se obtuvieron eritrocitos purificados de cada especie animal; haciendo uso de estos eritrocitos a diferentes concentraciones, se evaluó su efecto sobre la reacción de hemaglutinación. Determinándose que los eritrocitos porcinos a una concentración de 1.2% producían los mejores títulos hemaglutinantes (mediana de 0.78 UAP), seguidos de los eritrocitos caninos al 0,5% (mediana de 50 UAP) y en último lugar los eritrocitos aviares debido a su nula actividad (100 UAP). Una vez determinados los parámetros ideales para la hemaglutinación (especie animal donante de eritrocitos y concentración de eritrocitos), se procedió a determinar la eficiencia de la Hemaglutinación directa (HA) y de la Inhibición de la hemaglutinación (HI); para ello se extrajeron muestras de suero sanguíneo y suspensiones fecales (mediante hisopado anal y suspensión del hisopo en 2 ml de buffer fosfato salino) de 10 caninos sanos y de 10 caninos enfermos a los cuales antes se les realizó una prueba inmunocromatográfica (IC), para confirmar su positividad a parvovirus canino. Las muestras de heces fueron evaluadas mediante la prueba de hemaglutinación directa y las muestras de suero sanguíneo mediante la prueba de Inhibición de la hemaglutinación. Los resultados obtenidos muestran una eficiencia del 80% para la prueba HA, y una eficiencia del 100% para la prueba HI, todo ello en función a la prueba de referencia la IC, lo cual demuestra que la técnica de HI puede ser utilizada como una prueba diagnóstica de rutina, siendo igual de válida que la IC.

**Palabras Clave:** Parvovirus canino, Eritrocitos, Prueba de Hemaglutinación, Prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación, Inmunocromatografía.

## SUMMARY

The canine parvovirus is one of the most mortal diseases and common in the veterinary clinic of our environment, that's why the laboratory diagnostic must be a fundamental weapon in its control and eradication. On the other hand, the property to agglutinate erythrocytes is a structural and physiologic characteristic of parvovirus that allows to reveal, identify and to quantify it through simple trials. For this reason the main objective of the present elaboration was to standardize the inhibition test of the Hemagglutination for its use on the clinical diagnostic of the canine parvovirus. The study was made between April and September of 2015, in the "Católica de Santa María" university laboratories. From blood samples of 12 canines, 12 swines y 12 fowls, in Alsever solution; by centrifugation y successive washes, purified erythrocytes were obtained from each animal species; making use of these erythrocytes in different concentrations, the effect on the reaction of hemagglutination was evaluated. It was determined that the swine erythrocytes in a 1.2% concentration produced the best hemagglutinating titles (median 0.78 UAP), followed by the canine erythrocytes in a 0.5% (median 50 UAP) and in the last place the avian erythrocytes because of his not activity (100 UAP). Once the ideal parameters were determined for the hemagglutination (donor animal species of erythrocytes and erythrocytes concentration), the efficiency of the direct hemagglutination (HA) and the hemagglutination inhibition (HI) were determined; in order to do this blood serum samples and fecal suspensions were extracted (through anal swab and hyssop suspension in 2 ml of saline phosphate buffer) of 10 healthy canines and 10 sick canines, to which an immunochromatographic test (IC) was realized before, in order to confirm its positivity to canine parvovirus. The fecal samples were evaluated through the direct hemagglutination and the blood serum through the hemagglutination inhibition test. The obtained results show and 80% efficiency for the HA test, and a 100% efficiency for the HI test, all of this based in the reference test to IC, which shows that the HI technique can be used as a diagnostic test of routine, being as valid as the IC.

**Key Words:** Canine Parvovirus (CPV), Erythrocytes (RBC), Haemagglutination Assay (HA), Haemagglutination Inhibition Assay (HI), Immunochromatography (IC).



# CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Enunciado del problema

“Estandarización de la técnica de inhibición de la hemaglutinación aplicada al diagnóstico de parvovirus canino (CPV), Arequipa - 2015”

### 1.2. Descripción del problema

Al mantener un perro en el hogar, este se convierte en un miembro más de la familia, en una mascota que necesita cuidados afectivos y médicos. (Hurtado, 2012).

Los caninos son susceptibles a múltiples agentes que afectan su estado de salud, para esto es necesario tener en cuenta las enfermedades más comunes en el medio, como los son las enfermedades gastrointestinales causados por agentes bacterianos, virales y parasitarios. (Sosa, 2009).

El parvovirus canino es una de las causas más importantes de mortalidad en cachorros. (Ruiz *et al* 2007). Es altamente contagiosa. Tiene dos presentaciones: la forma gastrointestinal que es la más común y la cardíaca en cachorros menores de 4 semanas que es menos frecuente. Los signos clínicos más sobresalientes son: Anorexia, depresión, disnea, seguidos de vómito y diarrea con frecuencia sanguinolenta, fiebre y leucopenia. (Juárez, 2011).

Actualmente, el diagnóstico de la parvovirus canina en nuestra ciudad, se basa solo en la anamnesis, la exploración clínica y la hematología, las cuales brindan solo aproximaciones o diagnósticos tardíos de la enfermedad. En algunas clínicas, se hace uso de las técnicas inmunocromatográficas, las cuales brindan un diagnóstico rápido y definitivo, sin embargo, debido al elevado costo de dichas pruebas, son muy poco utilizadas.

### 1.3. Justificación del trabajo

#### 1.3.1. Aspecto general

El desarrollo del presente trabajo de investigación permitirá a los médicos veterinarios de práctica en pequeños animales, contar con una prueba económica, de fácil realización y rápida interpretación que pueda ser utilizada como una herramienta de apoyo al diagnóstico en casos de sospecha de infección por parvovirus canino. La prueba de inhibición de la hemaglutinación puede ser implementada en cualquier laboratorio con un mínimo de requerimientos y sin la necesidad de equipos complejos y costosos.

#### 1.3.2. Aspecto tecnológico

La técnica de inhibición de la hemaglutinación es utilizada para el diagnóstico de varias enfermedades en animales, sin embargo en caninos su uso es muy limitado. Con el presente estudio se pretende estandarizar el método para su uso en el diagnóstico de parvovirus canino.

Además de tener mayor especificidad y sensibilidad que los métodos inmunocromatográficos utilizados actualmente, la validación de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación podría ayudar a los médicos veterinarios, al uso de nuevas técnicas de diagnóstico en nuestra localidad.

#### 1.3.3. Aspecto social

Las enfermedades virales en caninos como en otros animales son de pronóstico dudoso o reservado siendo su tratamiento solo de soporte y paliativo. Considerando que la parvovirus canina es una enfermedad relevante en nuestro medio, y que su diagnóstico muchas veces lleva a la recomendación de la eutanasia del animal es necesario que el diagnóstico sea lo más certero posible.

La aplicación de la Inhibición de la Hemaglutinación puede brindar diagnósticos tempranos, y permitir que el propietario tenga conciencia sobre el pronóstico de

la enfermedad de su mascota, así como prever las complicaciones de la misma, mejorando la calidad de vida del animal.

#### 1.3.4. Aspecto económico

El uso y manejo de la Inhibición de la Hemaglutinación significara una reducción directa en el costo del diagnóstico y terapéutica de los animales. Además esta técnica puede constituir un factor importante para los centros de atención veterinaria de pequeños animales y para los laboratorios veterinarios en general, ya que generaría otro servicio más representando un ingreso adicional.

#### 1.3.5. Importancia del trabajo

En la práctica médica diaria de las diversas clínicas veterinarias locales, la parvovirus canina constituye una de las enfermedades infecciosas más frecuentes y letales de los perros. El diagnóstico correcto, resulta esencial en la resolución de la enfermedad ya que este permite el establecimiento temprano de la terapéutica adecuada, aumentando enormemente las posibilidades de supervivencia del animal. Por lo cual la presente investigación busca contribuir con sus resultados a la estandarización de un método de diagnóstico confiable, económico y seguro. Que podría permitir el tratamiento oportuno y la recuperación de muchos animales. Además de reducir los costos en el diagnóstico y terapéutica del animal enfermo.

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

- Estandarizar la prueba de inhibición de la hemoaglutinación para el diagnóstico de parvovirus canina.

### 1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la especie animal cuyos eritrocitos, sean los más eficientes para la realización de la prueba de hemaglutinación.
- Determinar el adecuado porcentaje de eritrocitos para la prueba de hemaglutinación.
- Determinar nivel de eficiencia de la Hemoaglutinación Directa mediante la comparación con la prueba de Inmuncromatografía.
- Determinar nivel de eficiencia de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación mediante la comparación con la prueba de Inmuncromatografía.
- Correlacionar la eficiencia de la prueba de inhibición de la hemaglutinación serológica frente a la prueba de hemaglutinación con muestra de suspensión fecal.

## 1.5. Planteamiento de la hipótesis

Dado que el virus de la parvovirus canina posee hemaglutininas en su estructura, las cuales según las investigaciones biológicas, tienen un efecto aglutinante sobre los glóbulos rojos, ES PROBABLE que la prueba de inhibición de la hemaglutinación pueda ser utilizada para demostrar la presencia de este virus en animales infectados con esta enfermedad.



## **CAPITULO II**

# **MARCO TEÓRICO**

## II. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

### 2.1. Análisis bibliográfico

#### GENERALIDADES

##### 2.1.1. EL PERRO

El perro es el animal de compañía más antiguo del ser humano. Ninguna otra criatura vive tan cercana a nosotros ni se ha adaptado de una forma tan óptima a nuestras propias circunstancias vitales. (Schöning, 2008).

##### a. Origen del perro.

El perro doméstico procede muy probablemente del lobo (*Canis lupus*). Esta hipótesis está basada en estudios sobre la morfología, el comportamiento y la genética de ambas especies. De hecho, el parecido entre el perro y el lobo es tan marcado que en 1993 se propuso que el perro debería considerarse una subespecie del lobo y, por lo tanto, su nombre científico debería ser *Canis lupus familiaris*. A pesar de ello, lo cierto es que la mayoría de autores siguen usando el nombre científico original, es decir, *Canis familiaris*. (Manteca, 2002).

Es difícil establecer con precisión la antigüedad del perro. Por un lado, los restos de perro más antiguos encontrados hasta el momento datan de unos 14.000 años atrás. Estos restos - concretamente una mandíbula - fueron encontrados en una tumba paleolítica en Oberkassel, Alemania. Por otra parte, algunos autores sugieren un origen mucho más antiguo y opinan que el perro se separó del lobo en términos evolutivos hace unos 135.000 años aproximadamente. Esta hipótesis está basada en los resultados que se han obtenido a partir de estudios sobre la genética molecular de los cánidos. Es importante tener en cuenta, no obstante, que no todos los científicos aceptan esta hipótesis y algunos afirman que se trata de una interpretación un tanto aventurada. (Manteca, 2002).

### b. Descripción del perro.

El perro está incluido en el Orden Carnívora. Sus dentaduras están constituidas por dientes, incisivos, caninos y molares utilizados para cortar, arrancar y triturar. Sus patas delanteras están provistas de cinco dedos, las posteriores de cuatro, y cada uno de los dedos provistos de uñas sólidas pero cortantes, bien diferenciadas de las uñas retráctiles de los felinos. El tiempo de gestación es de aproximadamente 62 días. Y los cachorros al nacer son dependientes de su madre, ya que poseen los ojos y oídos cerrados y son incapaces de caminar. (Taragano de Azar, 2000).

### c. Clasificación Taxonómica.

Haciendo uso de la sistemática presentada por López (2010), se puede clasificar al perro domestico de la siguiente manera:

**Clase: Mammalia**

Subclase: Theria

Infraclase: Eutheria

Orden: Carnivora

Suborden: Fissipedia

Familia: Canidae

Género: *Canis*

Especie: *Canis familiaris* Linneaus, 1758

#### 2.1.2. PARVOVIROSIS CANINA

La Parvovirus Canina, es una enfermedad causada por un virus, que afecta principalmente el sistema digestivo de los caninos, provocando diarrea sanguinolenta, vómitos y deshidratación, en ocasiones con resultados fatales. Se conoce también como diarrea hemorrágica canina, gastroenteritis viral hemorrágica, diarrea con sangre canina y virus diminuto de los caninos. (Hurtado, 2012).

### a. Agente etiológico

Los parvovirus carecen de envoltura, tienen simetría icosaédrica y son de pequeño tamaño (del latín *parvus*, pequeño), con un diámetro que oscila entre 18 a 26 nm. Además poseen un genoma de DNA lineal de hebra sencilla y requieren células en división rápida para replicarse. (Biberstein y Zee, 1994; Greene, 2000; Quinn *et al*, 2005).

Existen dos tipos de parvovirus que afectan a los perros. El parvovirus canino tipo 1 (CPV-1) un virus relativamente apatógeno; y el parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) responsable de la enteritis por parvovirus clásica. (Nelson y Couto, 2010). De este último, se reconocen dos variantes patógenas, los tipos 2a y 2b, siendo la variante 2b la cepa que más a menudo infecta a los perros. En gatos del sudoeste asiático se ha observado recientemente una tercera variante, el tipo 2c. (Ettinger y Feldman, 2007).

Los parvovirus son extremadamente resistentes y se sabe que persisten en objetos inanimados, como ropa, vasijas para alimento y pisos de jaulas, durante cinco meses o más. Los desinfectantes más comunes no inactivan el CPV. Pero una excepción notable es el hipoclorito de sodio, sin embargo, la exposición debe ser prolongada. (Greene, 2000).

### b. Epidemiología

La infección por parvovirus canino apareció a finales de los años 70 como una enfermedad mundial de los perros con una elevada morbilidad y mortalidad (Quinn *et al*, 2005). Todos los miembros de la familia Canidae (coyotes, perros, zorros, chacales y lobos) son susceptibles al CPV. El período de incubación varía entre 3 y 8 días; pero los tipos actuales 2a y 2b tienen periodos más cortos de entre 3 a 5 días. (Gómez y Guida, 2010). Es posible observar enteritis aguda por CPV-2 en perros de cualquier raza, edad o sexo. No obstante, al parecer tienen mayor riesgo los cachorros entre seis semanas y seis meses de edad y de las razas rottweiler, doberman pinscher, cobrador, labrador, terrier Staffordshire americano, pastor alemán y tirador de Alaska. (Greene, 2000).

### c. Patogenia

Tras la exposición, el CPV se replica en las células linfoides de la orofaringe, ganglios linfáticos mesentéricos y timo; a continuación, al cabo de 3 a 5 días se disemina por vía hematógena a las células de las criptas del intestino delgado y las células epiteliales de la cavidad oral, lengua y esófago. Los órganos linfoides, pulmones, hígado, riñones, medula ósea y, en animales muy jóvenes, las células del miocardio también llegan a infectarse. La excreción del virus comienza al poco de la infección de las células epiteliales intestinales y habitualmente dura de 1 a 2 semanas. En el intestino, la necrosis de las células de la cripta infectada lleva al colapso de las vellosidades y a la pérdida de la integridad del epitelio intestinal. La diarrea hemorrágica, que es característica de la enfermedad clínica, se debe a una combinación del aumento de la permeabilidad intestinal y a una menor asimilación por alteración de la función de la mucosa. La degradación de la barrera epitelial intestinal predispone a la translocación de las bacterias intestinales y a la absorción de endotoxinas bacterianas a la circulación sistémica. La translocación de bacterias y endotoxinas puede producir bacteriemia sistémica y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, coagulación intravascular diseminada (CID) y muerte. (Ettinger y Feldman, 2007).

Además la deshidratación a consecuencia de las alteraciones causadas por el parvovirus, ocasiona un desbalance electrolítico, el cual repercute en la relación de los iones de sodio y potasio causando un shock cardiovascular en el animal. (Juárez, 2011).

### d. Signos Clínicos

La infección por CPV-2 se ha relacionado con dos tejidos principales: Tubo gastrointestinal (GI) y miocardio. (Greene, 2000). En la enteritis parvoviral, los signos pueden variar, pero por lo común, se presenta un inicio agudo con anorexia, depresión, fiebre, vómitos y diarrea mucosa o sanguinolenta. La hematoquecia es variable, pero se manifiesta en más del 50% de los casos. La fiebre es común y puede superar los 41°C en los cachorros. (Gómez y Guida, 2010).

El CPV causa destrucción de las células madres mieloides y eritroides, pero esto tiene poco efecto por la larga vida de los eritrocitos; sin embargo, puede ocurrir anemia como resultado de la profusa pérdida de sangre del intestino. Una leucopenia variable, con linfopenia relativamente marcada, es común a los 4-6 días post-infección, pero es transitoria. (Gómez y Guida, 2010). Las consecuencias hematológicas menos constantes de la enteritis parvoviral incluyen trombocitopenia e hipoproteinemia. (Bonagura, 2001).

Alternativamente, en cachorros menores de 8 semanas de edad puede aparecer una miocarditis (aunque hoy en día, los casos son muy raros). Los perros afectados aparecen muertos o mueren después de un breve episodio de incomodidad o disnea. (Schaer, 2006).

#### **e. Lesiones**

Las lesiones macroscópicas de la infección por parvovirus canino generalmente se encuentran en el yeyuno y en el íleon. Existe engrosamiento de la pared intestinal junto con congestión y hemorragia subserosa. Es corriente el aumento de tamaño y el edema de los ganglios linfáticos mesentéricos. En la miocarditis por parvovirus, la principal lesión se encuentra en el miocardio, el cual presenta estrías pálidas. Con frecuencia existe edema pulmonar acompañado de edema perivascular. (Biberstein y Zee, 1994).

Las lesiones microscópicas en el intestino delgado, consisten en necrosis del epitelio de las criptas y atrofia de las vellosidades del epitelio. Es posible observar cuerpos de inclusión viral intranucleares en estas células epiteliales y en la totalidad de los epitelios escamosos del tubo GI superior. Es corriente la lisis de los linfocitos en la corteza del timo y en los centros germinales de los ganglios linfáticos que origina el agotamiento de estas células. En la forma que cursa con miocarditis, el miocardio correspondiente a los ventrículos presenta destrucción de miofibrillas, necrosis focal de las mismas e infiltración de células mononucleares. (Biberstein y Zee, 1994; Greene, 2000).

## f. Diagnóstico

El diagnóstico primario de la enfermedad lo realiza el veterinario mediante la observación de los signos clínicos que el animal presenta. Debido a que los síntomas de la parvovirus también pueden ser producidos por otros patógenos, se requiere de exámenes de laboratorio para su diagnóstico específico. (Sosa, 2009).

Dentro de los exámenes de laboratorio utilizados para el diagnóstico de parvovirus canino se encuentra la microscopía electrónica (ME) directa a partir de muestras fecales. En general, se trata de una técnica costosa y que requiere equipamientos y manejo especiales. (Sosa, 2009).

La inmunocromatografía (IC) es otro método de diagnóstico utilizado por su simple y rápido procedimiento. Esta técnica puede ser realizada tanto por veterinarios como por propietarios de animales. Sin embargo, se requiere grandes cantidades de antígeno viral para que se produzca una señal claramente visible por lo que los resultados pueden ser afectados por la subjetividad del operador (Sosa, 2009).

La prueba de ELISA también es un método rápido y eficaz de diagnóstico, y puede realizarse de manera ágil y relativamente económica por personal veterinario. Esta metodología permite además detectar anticuerpos IgM específicos para CPV-2, los cuales aparecen en las etapas tempranas de la infección y desaparecen entre las dos y tres semanas después de la misma (Sosa, 2009).

Debido a que los parvovirus presentan la propiedad de unión a ácido siálico (SA), la prueba de hemaglutinación (HA) e inhibición de la hemaglutinación (HI) se puede utilizar como método de diagnóstico. Éste es un método simple y rápido para detectar el virus en materia fecal y en muestras de tejidos. (Sosa, 2009).

Por otro lado, también puede realizarse aislamiento viral (VI) utilizando varias líneas celulares de origen felino y canino. Esta metodología es más sensible que las técnicas de ELISA, IC o HA-HI, aunque es poco utilizada como técnica de diagnóstico ya que se requiere como mínimo una semana para obtenerse el resultado y sólo puede realizarse en laboratorios especializados. (Sosa, 2009).

En la actualidad, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las metodologías más utilizadas como diagnóstico molecular, permitiendo la rápida generación *in vitro* de millones de copias idénticas de la secuencia de DNA blanco. Se trata de una técnica altamente sensible ya que requiere unas pocas moléculas del DNA de interés para comenzar con la amplificación. Asimismo, presenta una gran especificidad. (Sosa, 2009).

#### **g. Tratamiento y prevención**

No existe tratamiento específico para el parvovirus canino, se realiza en base a los signos clínicos, basado primeramente en contrarrestar la deshidratación, el desequilibrio electrolítico, la invasión bacteriana, el vómito y la diarrea intensa. La clave es prevenir el choque hipovolémico, endotóxico y neurogénico (Juárez, 2011).

Para prevenir las infecciones por parvovirus es esencial la inmunización rutinaria. Deben iniciarse las vacunaciones a las seis a ocho semanas de edad con refuerzos cada tres o cuatro semanas hasta que el animal llegue a las 16 semanas de edad cuando menos. (Bonagura, 2001).

#### **2.1.3. LA SANGRE**

La sangre es un tejido conjuntivo líquido que circula a través del aparato cardiovascular, está compuesta por células y sus derivados y un líquido con proteínas abundantes llamado plasma. (Ross y Pawlina, 2008). El corazón bombea la sangre a través de los vasos del sistema circulatorio para distribuir nutrientes, moléculas de señalización, electrolitos, y oxígeno a las células del

organismo, así como retirar de estas sustancias de desecho y dióxido de carbono que serán eliminados por diversos órganos. (Gartner y Hiatt, 2011).

#### **a. El plasma y suero sanguíneo**

La composición del plasma sanguíneo es compleja en extremo y refleja muchas funciones de la sangre. Las proteínas plasmáticas son los constituyentes sólidos más abundantes (albumina, fibrinógeno y globulinas). (Ruckebusch *et al* 1994; Reece, 2004). Además el contenido proteico del plasma de las aves, es más bien menor que el de los mamíferos. (Fernán-Zegarra, 2010).

Si la sangre se extrae del cuerpo y se deja coagular se convierte en una masa gelatinosa. Tras producirse la coagulación, el coágulo se retrae expulsando un líquido claro y acuoso denominado suero. El suero es similar al plasma en todo excepto en que no contiene fibrinógeno ni otros factores de coagulación. (Reece, 2004).

#### **b. Células sanguíneas**

Las células sanguíneas y sus derivados incluyen: eritrocitos, también conocidos como hematíes o glóbulos rojos; leucocitos, también llamados glóbulos blancos; y trombocitos, también conocidos como plaquetas. (Ross y Pawlina, 2008).

#### **c. Características de los eritrocitos animales**

En los mamíferos los eritrocitos tienen forma de disco bicóncavo, con una zona central pálida. A excepción de los camélidos y ciervos, que presentan forma elíptica. Por el contrario, los glóbulos rojos de las aves y de los animales de sangre fría (peces, anfibios y reptiles) son elípticos, tienen núcleo y son biconvexos. (Perez, 2002; Reece, 2004; Fernán-Zegarra, 2010).

El diámetro de los eritrocitos varía en función de la especie y estado nutricional. Siendo 7  $\mu$  para el perro; 5,7  $\mu$  para el cerdo; y 11,2  $\mu$  en la gallina. La duración de la vida de los eritrocitos en el perro oscila de 110 a 122 días, 67 días en promedio en el cerdo y 20 días en el pollo. (García *et al* 1996; Reece, 2004.).

#### 2.1.4. HEMAGLUTINACIÓN

Algunos virus poseen proteínas en sus superficies capaces de aglutinar a eritrocitos de ciertas especies. (Balmaseda *et al*, 2002). Este fenómeno, conocido como “Hemaglutinación” (HA), fue descrito por primera vez por Hirst en 1941, quien lo analizó en el virus de la influenza. (Fenner *et al*, 1992).

Los virus de varias familias, como la Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Adenoviridae, Parvoviridae y Togaviridae, pueden producir la hemaglutinación. Esta propiedad se debe a que las glucoproteínas víricas (hemaglutininas) se unen a los receptores situados sobre los eritrocitos que contienen ácido neuramínico (también llamado NANA o ácido siálico). Debido a que los eritrocitos cuentan con muchas glucoproteínas de membrana con este ácido, un exceso de partículas virales cubre las células y hace que se agreguen. (Quinn *et al*, 2005; Nelson y Cox, 2006; Ryan *et al*, 2011).

Además del fenómeno de hemaglutinación, las hemaglutininas son responsables de la fijación del virus a las células, paso esencial para su penetración y replicación. (Pumarola *et al*, 1999).

La hemaglutinación por el virus influenza y los paramixovirus se complica, debido a que los viriones presentan una enzima, la neuraminidasa que destruye los receptores glicoproteicos de la superficie de los eritrocitos (por eliminación del ácido neuramínico terminal) permitiendo la elución (disociación) de los virus, a menos que la prueba se efectuó a temperatura ambiente o a una temperatura inferior. (Fenner *et al*, 1992).

La hemaglutinación se puede utilizar para estimar el volumen de partículas virales en una muestra que contiene virus. Se mezclan muestras de diluciones seriadas de la preparación del virus con una cantidad constante de eritrocitos y se permite que la muestra se asiente en un tubo de ensayo. Los glóbulos rojos se precipitan al fondo y forman una capa delgada y dispersa. Si hay una cantidad insuficiente del virus para aglutinar los eritrocitos, se asientan al fondo del tubo y forman un botón comprimido. La diferencia se evalúa con facilidad a

simple vista y el punto final de la aglutinación se utiliza como medida relativa de la concentración de virus dentro de la muestra. (Ryan *et al*, 2011).

### 2.1.5. INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

La Inhibición de la hemaglutinación (HI) es una prueba que se fundamenta en el bloqueo de las proteínas virales hemaglutinantes por anticuerpos específicos. Cuando se enfrenta un virus conocido a un suero problema, los anticuerpos se unen impidiendo la hemaglutinación viral provocando la HI. (Berois *et al*, 2011).

Esta técnica es utilizada para tipificar (identificar) virus con capacidad hemaglutinante presentes en una muestra dada. Para realizarla es necesario e imprescindible haber realizado previamente la titulación del virus mediante la técnica de hemaglutinación. (Berois *et al*, 2011).

El suero puede contener inhibidores no específicos de la hemaglutinación (mucoproteínas), los cuales deben ser removidos por tratamiento de los sueros con la enzima destructora de receptores (EDR), peryodato de potasio, caolín o por inactivación a 56°C durante 30 minutos antes de realizar la técnica. Si estos inhibidores inespecíficos no son removidos se obtendrán resultados falsos positivos. (Cuello y Rosado, 2014).

Además el suero también puede contener aglutininas no específicas (substancias que imitan la actividad del virus, interfiriendo con la prueba). Estas hemaglutininas pueden ser removidas por adsorción de los sueros con los eritrocitos que serán usados en la prueba. La no eliminación o no tratamiento de sueros con los eritrocitos nos podría producir resultados falsos negativos. (Cuello y Rosado, 2014).

Para valorar anticuerpos mediante la prueba de HI se necesita un determinado tipo de eritrocitos, una cantidad de virus conocida (generalmente 4 unidades hemaglutinantes), un suero que se sabe que es positivo y otro que se sabe que es negativo, y una serie de diluciones dobles del suero problema. (Biberstein y Zee, 1994).

Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación son sensibles y específicas, además de sencillas, baratas y rápidas. Por lo cual han sido históricamente las técnicas de elección para la identificación de virus hemaglutinantes (Fenner *et al*, 1992; Cuello y Rosado, 2014).



## 2.2. Antecedentes de investigación

**Mogollón G. 1981. “Parvovirus canina en Colombia: aislamiento y serología”.**

Con el propósito de demostrar la presencia parvovirus como la entidad patológica causante de un brote presentado en Colombia; se estudiaron 50 caninos de la Sabana de Bogotá sospechosos de padecer la enfermedad, mediante varias pruebas de laboratorio. Se confirmó la enfermedad en un 88% de ellos. Se utilizaron pruebas de hemaglutinación con heces-inhibición específica, inhibición de la hemaglutinación sérica, inmunofluorescencia directa, microscopía electrónica y cultivos celulares, las cuales permitieron comprobar la presencia de la enfermedad. 25 animales aparentemente sanos utilizados como testigos no presentaron positividad alguna a ninguna de las pruebas. Suero de personas expuestas al virus no mostraron presencia de anticuerpos específicos. La forma miocárdica del parvovirus canino no fue demostrada en el estudio.

**Carman, P. S. 1984. “The Seroprevalence of Canine Parvovirus-2 in a Selected Sample of the Canine Population in Ontario”.**

Evaluó la prevalencia de parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en los perros que se presentaron en la clínica de la facultad de veterinaria de Ontario, Canadá, entre 1970 y 1980, mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Encontrando que durante el periodo entre 1976 y 1977, no se detectaron anticuerpos en los sueros de los caninos. Fue a finales de 1978 que los anticuerpos se generalizaron en la población de canes y en 1980 se llegó a un 31,2% de prevalencia. Evaluando los registros clínicos se sugirió que la mayoría de las infecciones habían sido subclínicas.

**Senda, M. 1988. “Canine Parvovirus: Strain Difference in Haemagglutination Activity and Antigenicity”.**

En su estudio comparó la actividad hemaglutinante y antigénica del parvovirus canino (cepas: Cp49, 29-F, Sp-80 y Y-1), con el virus de la panleucopenia felina (cepas: TU1 y Obihiro) y el virus de la enteritis del visón (cepa: Abashiri). Además evaluó la actividad hemaglutinante de eritrocitos de ocho especies de

animales diferentes. Las cepas de parvovirus canino (CPV) fueron divididos en dos tipos por la actividad hemaglutinante. Las cepas Cp49 y 29-F, el virus de la panleucopenia felina (FPLV) y virus de la enteritis del visón (MEV) se mostraron dependientes de la temperatura, mientras que las cepas Sp-80 y Y-1 mostraron actividad hemaglutinante independiente de la temperatura. Los resultados de una prueba de inhibición cruzada hemaglutinante utilizando sueros de ratas inmunizadas sugirieron que los dos tipos de CPV dependientes de la temperatura fueron antigénicamente similares al FPLV y MEV mientras que los que muestran independiente de la temperatura, no lo fueron. Esta diferencia antigénica entre los dos tipos se confirmó por una prueba de inhibición de la hemaglutinación con anticuerpos monoclonales. El estudio cronológico reveló que el CPV aislado de años anteriores tenía actividad de hemaglutinante y antigenicidad similares a los de FPLV y MEV, mientras que los CPV corrientes aislados no lo poseían. Había algunos aislados excepcionales que tenían antigenicidad similar a FPLV y MEV pero diferente actividad hemaglutinante. Estos resultados sugieren que la hemaglutinina del CPV se ha alterado de una forma parecida a la de FPLV a una estructura algo diferente, durante el paso en perros en la naturaleza.

**Gorski, J. 1993. "Requirements for Haemagglutination Inhibition test for diagnosis of Parvovirus Infections of Carnivores."**

Evaluó 19 sueros colectados de perros mediante el test de inhibición de la hemaglutinación (HI) y el test de seroneutralización (SN) con parvovirus canino atenuado. Los resultados obtenidos fueron consistentes sólo para sueros inactivados a 56 °C durante 30 minutos y absorbidos con una suspensión de caolín al 25%. Los inhibidores no específicos de la hemaglutinación no se eliminaron por la inactivación por calor, la absorción con eritrocitos porcinos, ni mediante la adición a la muestra de suero de 20 µg de caolín *en sustancia*. Se analizó también un total de 255 muestras de sueros de zorro azul (*Alopex lagopus*) por HI con parvovirus canino y felino (CPV y FPLV). Los sueros se absorbieron bien con la suspensión de caolín al 25% o la inactivación por calor. El porcentaje de título positivo en las pruebas de sueros con CPV fue similar cuando se probó con FPLV, pero difería dependiendo del método de preparación de suero para la prueba. 95% de los resultados positivos se

observaron cuando se usaron sueros no absorbidos, mientras que 45% de resultados positivos se observaron cuando los sueros fueron absorbidos. Esta diferencia fue estadísticamente significativa.

**Ariza-Pinzon, S. 2003. “Correlation between ELISA and latex agglutination tests for diagnosis of canine parvovirus.”**

Evaluó 125 muestras de suero procedentes de perros con síntomas de gastroenteritis hemorrágica, que se presentaron en 4 clínicas veterinarias de la ciudad de Bogotá, Colombia, durante los meses de Octubre del 2001 a Febrero del 2002, mediante las técnicas de Hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, aglutinación en látex y ELISA. Determinando que los métodos diagnósticos más económicos, sensibles y específicos, frente a la prueba de referencia (ELISA) eran la hemaglutinación y la aglutinación en látex.

**Khan, M. 2006. “Isolation and Characterization of Canine Parvovirus”.**

Realizó un estudio para aislar y caracterizar el parvovirus canino. Utilizando 300 muestras fecales de perros con sospecha de parvovirus y raspaduras de tejido intestinal de los perros que murieron de esta enfermedad. La presencia del virus en las muestras se confirmó y se cuantificó utilizando la prueba de hemaglutinación (HA). Los casos se registraron y clasificaron en función de la edad, la raza, la temporada y el sexo. Más casos (47%) se observaron en el grupo de 0 a 2 meses de edad, el pastor alemán (de Alsacia) era la raza más propensa (84%), el número máximo de casos (61%) se registró en la temporada húmeda caliente durante los meses de julio a septiembre y los machos estaban en mayor riesgo (85%) que las hembras. La caracterización serológica del virus de campo se realizó mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) utilizando anticuerpos anti-CPV obtenidos en conejos. Por otra parte, se estudió también el efecto de diversos factores físico-químicos como el tiempo de almacenamiento (0, 15, 30 y 45 días) y temperaturas (25 °C, +4°C, -10°C y -196°C), pH (3-9) y productos químicos (antibióticos estreptomycin, penicilina, gentamicina y nistatina; azida de sodio y formaldehído) en el potencial de hemaglutinación del virus utilizando eritrocitos de varias especies de animales (pollo, conejo, perro, gato y mono). El estudio dilucidó que el título de virus en las heces después de la aparición de la

enfermedad podría ser útil en el pronóstico de la recuperación o la muerte del perro infectado. Y finalmente los eritrocitos de pollo demostraron ser una buena fuente de eritrocitos en las pruebas de HA y HI. Por otra parte, los eritrocitos de pollo mostraron aglutinación temprana (dentro de 25 min) mientras que los eritrocitos de los otros animales (conejo, mono, perro y gato) demoraron más tiempo (1h) para exhibir la aglutinación.

**Savić-Jevđenić, S. 2006.” Diagnostic Methods for Canine Parvovirus”.**

Estudio la eficacia de diferentes métodos de laboratorio para el diagnóstico de la infección por parvovirus en los perros. Después de haber inducido una infección experimental en 12 cachorros, procedió a la observación clínica diaria de los perros afectados, y la detección del virus se realizó mediante Inmunocromatografía y la prueba de hemaglutinación, además se aplicó la Inmunofluorescencia para la detección del virus en el epitelio intestinal. Todos los animales afectados murieron. Los síntomas observados en los perros afectados incluyeron apatía, pérdida de apetito, vómitos, deshidratación y profusa, diarrea hemorrágica. La Inmunocromatografía y Hemaglutinación confirmaron la presencia del virus en las heces un día después de la manifestación de los síntomas clínicos en 100% de los perros afectados. El día 2 se detectó el virus en 85% y 53% de los animales enfermos por los métodos de la Hemaglutinación y la Inmunocromatografía, respectivamente. Antes de la muerte, el virus fue detectado por hemaglutinación e Inmunocromatografía en el 61% y el 15% de los perros, respectivamente. Ensayo de Inmunofluorescencia reveló la presencia del virus en muestras de tejido de intestino delgado en todos los animales infectados.

**Strottmann, D. M. 2008. “Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil”.**

Utilizó, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el ensayo de hemaglutinación (HA) para detectar el parvovirus canino (CPV) en las heces de los perros con gastroenteritis. La inhibición de la hemaglutinación (HI) para determinar la prevalencia de anticuerpos anti-CPV en una población de perros no vacunados, y además un suero hiperinmune para investigar la variabilidad

fenotípica entre una cepa de vacuna y aislados de campo del CPV. Treinta muestras fecales obtenidas de perros con diarrea fueron sometidas a PCR y HA, y 185 muestras de suero fueron sometidas a HI para detectar anticuerpos anti-CPV. Teniendo en cuenta sólo las muestras con la actividad de HA a diluciones superiores a 1:64 como positivas, el CPV se detectó en 9 (30%) de las muestras fecales; 9 (30%) muestras de heces que tenían actividad HA en la dilución de 1:2 a 1:32 se consideraron negativos, y las muestras restantes (40%) fueron totalmente negativas. Todas las muestras con actividad HA en diluciones mayores de 1:64 fueron positivas por PCR, y de las 9 muestras con HA en diluciones de 1:2 y 1:32, 6 también fueron positivas por PCR. El análisis serológico de las muestras de suero canino mostró que 178 (96,2%) perros tuvieron contacto previo con el virus. El suero hiperinmune producido en cobayos contra la cepa de vacuna y dos aislamientos de campo indicó posibles diferencias fenotípicas entre aislamientos.

**Kumar, M. 2010. “Comparison of virus isolation and Haemagglutination Assay with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Canine Parvovirus”.**

Utilizó el método de PCR para detectar el DNA genómico de CPV en muestras de heces de casos clínicamente sospechosos de infección por CPV. Y luego comparo la eficacia del PCR como un método de diagnóstico, con el aislamiento viral (VI) y la hemaglutinación (HA). Determino que el ensayo de PCR, amplifica específicamente el gen VP1/VP2 del CPV-2, y que el PCR es más sensible que los otros métodos mencionados. Demostrando que el ensayo de PCR puede ser útil como un método de diagnóstico de rutina para la detección de CPV en muestras fecales.

**Juárez, F. 2011. “Cambios Hematológicos en perros positivos a Parvovirus Canino”.**

Realizó un estudio retrospectivo de los cambios hematológicos en casos de perros positivos a Parvovirus con la prueba de ELISA. Agrupo los análisis hematológicos en tablas de Excel, categorizándolos de acuerdo a línea roja, línea blanca y plaquetas. Obteniendo los siguientes resultados: Las hembras resultaron con un porcentaje mayor al de los machos, además de corroborar

que de los casos, la raza rottweiler resulto más afectada, así como a cachorros menores de 6 meses de edad; Presentando un 28.6% de casos con anemia y un 14.2% con policitemia; las plaquetas, con un 7.1% trombocitopenia; además una marcada leucopenia en el 92.9% de los pacientes y un 92.9% con neutropenia; los neutrofilos en banda presentaron un 14.3%; linfocitos con un 92.9% de linfopenia y monocitosis con 64.3%. Con todo esto se concluyó que; los cambios hematológicos se correlacionaron con lo que señalaba la literatura, remarcando la importancia de realizar el hemograma en estos pacientes.

**Parthiban, S. 2012. “HA-HI and PCR assays for detection of canine parvoviral enteritis”.**

Utilizaron los ensayos de HA-HI y PCR para la detección de enteritis por parvovirus canino. Un total de 128 muestras clínicas de heces colectadas con hisopos rectales procedentes de perros con signos de diarrea/enteritis, se aclararon, procesaron y sometieron a los ensayos de Hemaglutinación y Reacción en Cadena de la Polimerasa. De las 128 muestras, 47 muestras (36,71%) fueron positivas para infección por CPV mediante el ensayo HA confirmado por pruebas de inhibición de la hemaglutinación. Y además se encontraron 68 muestras positivas (53,12%) por el ensayo de PCR con cebadores CPV-2ab.



**CAPITULO III**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Localización del trabajo

###### a. Localización espacial

La presente investigación se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María y con la colaboración de diversas clínicas veterinarias de la ciudad de Arequipa.

Arequipa se encuentra ubicada en la parte sur occidental del Perú entre los 14°39' y 17°19' latitud sur y los 70°50' de longitud oeste, a una altura de 2329 m.s.n.m. (Moscoso, 2002).

###### b. Localización temporal

La experimentación y análisis de datos del presente trabajo se realizaron entre los meses de Abril a Septiembre del 2015.

##### 3.1.2. Material biológico

- Eritrocitos de Porcino, Canino y Ave.
- Muestras de sueros sanguíneos de caninos de ambos sexos y de diferentes edades que presentaban sintomatología de parvovirus canina.
- Muestras de heces de caninos de ambos sexos y de diferentes edades que presentaban sintomatología de parvovirus canina.

##### 3.1.3. Materiales de laboratorio

**Prueba de diagnóstico de parvovirus para confirmación de positividad:**

- Kit de inmunocromatografía para parvovirus.

**Prueba de hemaglutinación:**

- Antígeno de parvovirus canino (ver anexo 2)
- Solución Alserver (ver anexo 3).
- Buffer fosfato salino o PBS (ver anexo 3).

- Glóbulos rojos lavados y preparados al 0.5, 1 y 2 % (solución v/v).
- Placa de microtitulación de 96 pozas con fondo en U
- Micropipeta automática de 5 a 50  $\mu$ l
- Micropipeta automática de 100 a 1000  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas
- Cubetas de plástico
- Jeringas de 5 y 1 ml
- Tubos de micro-centrifugación.
- Tubos de ensayo

#### **Tratamiento de sueros con caolín**

- Solución de Caolín al 25% (ver anexo 3).
- Solución de eritrocitos porcinos al 30% (ver anexo 3).
- Frascos de vidrio.
- Ácido clorhídrico 5 N.
- Tubos de micro-centrifugación (Ependorf) de 1,5 ml.
- Bagueta.

#### **Prueba de inhibición de la hemaglutinación:**

- Antígeno de parvovirus canino preparado con 8 unidades hemaglutinantes (ver anexo 2)
- Suero control positivo (ver anexo 2)
- Suero control negativo (ver anexo 2)
- Buffer fosfato salino o PBS (ver anexo 3).
- Glóbulos rojos lavados.
- Placa de microtitulación de 96 pozas con fondo en U.
- Micropipeta automática de 5 a 50  $\mu$ l
- Micropipeta automática de 100 a 1000  $\mu$ l
- Puntas para micropipetas
- Cubetas.
- Jeringas de 1 y 5 ml
- Tubos de micro-centrifugación (Ependorf) de 1,5 ml.
- Tubos de ensayo

### Otros materiales del laboratorio

- Termómetro de -10 a 110 °C
- Mechero Bunsen
- Tubos de ensayo
- Jeringas de 1 y 5 ml
- Alcohol y algodón
- Vasos de precipitación
- Gradillas
- Papel aluminio
- Frascos de vidrio de 100 a 1000 ml
- Encendedor
- Pinzas
- Tijeras
- Marcador indeleble

#### 3.1.4. Materiales de campo

- Agujas hipodérmicas de 5 ml
- Algodón y alcohol.
- Ligadura para la hemostasia
- Guantes de látex
- Tubos vacutainer sin anticoagulante
- Solución de Alsever
- Cinta masking tape
- Cuaderno de registro.
- Etiquetas de identificación.
- Marcador indeleble

#### 3.1.5. Equipos y maquinaria

- Centrifugadora
- Refrigerador
- Balanza
- Cámara de luz UV
- Baño María

- Autoclave
- Homogenizador de placas

### 3.1.6. Otros materiales

- Material de redacción: Papel bond, lápices, lapiceros, calculadora, CDs.
- Cámara digital
- Computadora portátil
- Impresora

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Muestreo

#### a. Universo

El universo o población de esta investigación fueron los perros (*Canis familiaris*) que desarrollaron enfermedad digestiva y que fueron registrados como pacientes en las clínicas veterinarias visitadas, durante los meses de Abril a Septiembre del 2015.

#### b. Tamaño de la muestra

Se extrajo muestras de 10 perros clínicamente afectados con diagnóstico inmunocromatográfico positivo a parvovirus y 10 testigos. De los 20 animales incluidos en la investigación se colectaron muestras de suero sanguíneo y heces. Cada muestra se identificó y conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento.

#### c. Procedimiento de muestreo

Por el tipo de investigación, se utilizó el Muestreo por Conveniencia, usando a los animales que presentaron sintomatología clínica y cuyos dueños aprobaron realizar los estudios.

### 3.2.2. Formación de unidades experimentales

Cada muestra sanguínea de los animales evaluados, fue considerada como una unidad experimental o de observación.

### 3.2.3. Métodos de evaluación:

#### a. Metodología de la experimentación

#### TOMA DE MUESTRAS

##### Muestra: Eritrocitos

- Se extrajo sangre de canino, porcino y ave en forma estéril, mediante una jeringa conteniendo la solución de Alsever (1 parte de sangre y 4 de Alsever). El animal en experimentación fue clínicamente sano.
- Se filtró la sangre por gasa estéril.
- Se conservó la muestra de sangre en refrigeración a 4°C y está fue útil hasta por 2 semanas.

##### Muestra: Suero sanguíneo

- Recolección: la muestra de sangre se obtuvo de la vena cefálica, con la ayuda de un tubo Vacutainer sin EDTA.
- Posteriormente mediante centrifugación se separó el suero del sedimento sanguíneo, descartando este último.
- Las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento.

##### Muestra: Suspensión fecal

- Las muestras fecales se recogieron por hisopos rectales y se diluyeron en 2 ml de PBS (pH 6,4) luego mediante centrifugación se descartó el sedimento y se obtuvo la suspensión fecal que se utilizó en la prueba de hemaglutinación.

## PROCEDIMIENTO DE LABORATORIO:

### Preparación de glóbulos rojos lavados

- La muestra de sangre obtenida se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Luego se agregó igual volumen de Alsever al tubo conteniendo el paquete celular.
- Se repitió el proceso de lavado por cinco veces.
- Se lavó los eritrocitos con PBS a pH 7,2 una vez.
- Se preparó los glóbulos rojos en buffer PBS (pH 6,4) a los diferentes porcentajes requeridos; 0.5, 1 y 2 % (solución volumen/volumen).

### Hemaglutinación (H.A.)

Se utilizó procedimiento propuesto por Manrique y Bustinza (2014). Introduciendo algunas modificaciones, se procedió de la siguiente manera:

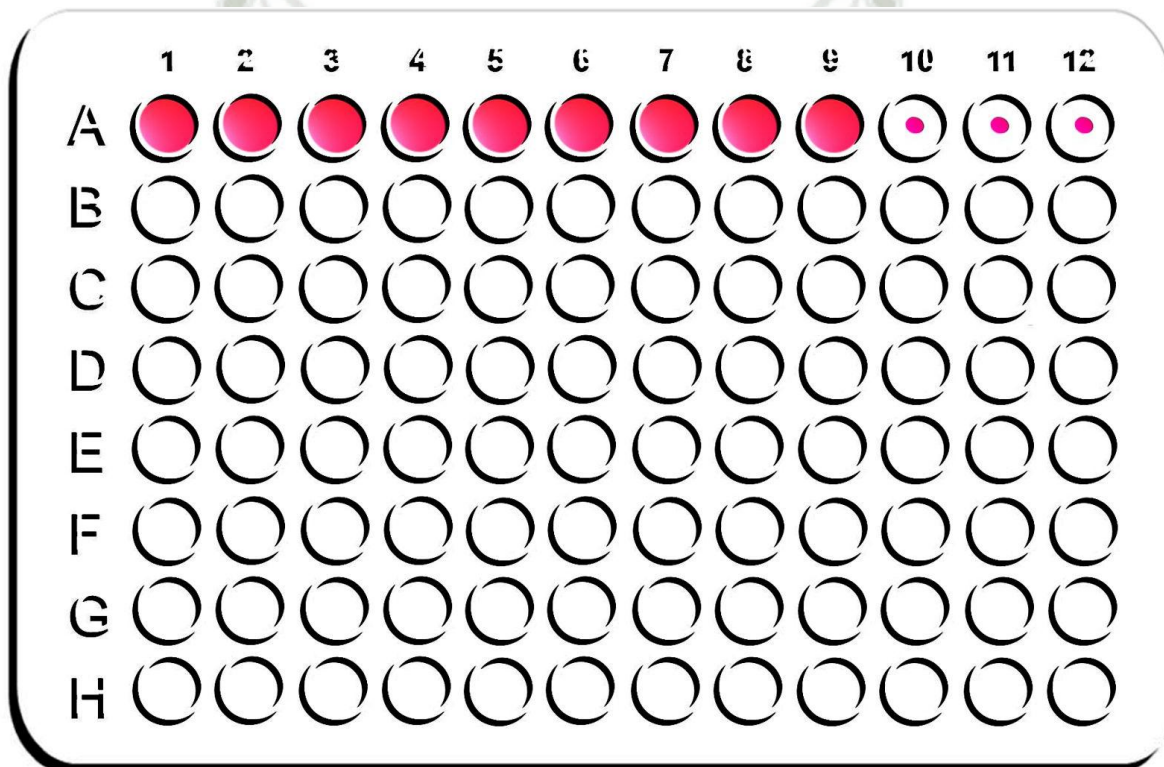
Técnica:

1. Usando una micropipeta automática se agregó 50  $\mu$ l del buffer fosfato salino (PBS) a pH 6,4 a todas las celdas de una fila completa en la placa de trabajo.
2. Usando una micropipeta automática se agregó 50  $\mu$ l del antígeno puro de parvovirus canino en la primera celda de la fila (celda A-1). Se mezcló 10 veces y luego se pasó 50  $\mu$ l a la celda de la segunda columna. Se realizó la misma operación hasta la celda 12 descartando 50  $\mu$ l de la última celda (celda A-12).
3. Se agregó 50  $\mu$ l de los glóbulos rojos lavados a todas y cada una de las celdas de la fila.
4. Se homogenizó e incubó la placa por 4 horas, a 4°C de temperatura.

Lectura:

El título del antígeno fue la última dilución donde se observó hemaglutinación. Para contar las unidades hemaglutinantes, se empezó de la última hemaglutinación hacia atrás (izquierda). En el caso del parvovirus se trabajó con 8 unidades hemaglutinantes (UH), utilizándose por lo general una dilución de 1:64.

					<b>8 UH</b>	<b>4 UH</b>	<b>2 UH</b>	<b>1 UH</b>				
					<b>1:8</b>	<b>1:4</b>	<b>1:2</b>	<b>1:1</b>				
<i>Dilución:</i>	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096



*Esquema de la prueba de hemaglutinación.*

Nota:

Para el análisis de las muestras clínicas mediante la hemaglutinación directa, se reemplazó el antígeno viral por la suspensión de heces, siguiendo el protocolo antes descrito.

### Tratamiento de los sueros con caolín

Se tomó como base el método propuesto por Burgess (1980):

- Se rotuló los tubos de microcentrifugación (Ependorf) y se colocó 50  $\mu$ l de suero problema.
- Se incubó el suero a 56°C por 30 minutos, para inactivar el sistema de complemento.
- Se agregó 150  $\mu$ l de solución de caolín al 25% en PBS a pH de 6,4 y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, con agitación ocasional. Posteriormente se centrifugó a 4000 rpm durante 20 min. Este procedimiento absorbe los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación.
- Sin remover el caolín depositado, se adicionó 50  $\mu$ l de una solución de eritrocitos porcinos preparados al 30% en PBS (pH 6,4) y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Luego se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. Este paso remueve las aglutininas no específicas presentes en el suero.
- El sobrenadante obtenido se considera como una dilución 1:4 de la muestra original.

## Inhibición de la Hemaglutinación (H.I.)

Se tomó como base el método propuesto por Burgess (1980):

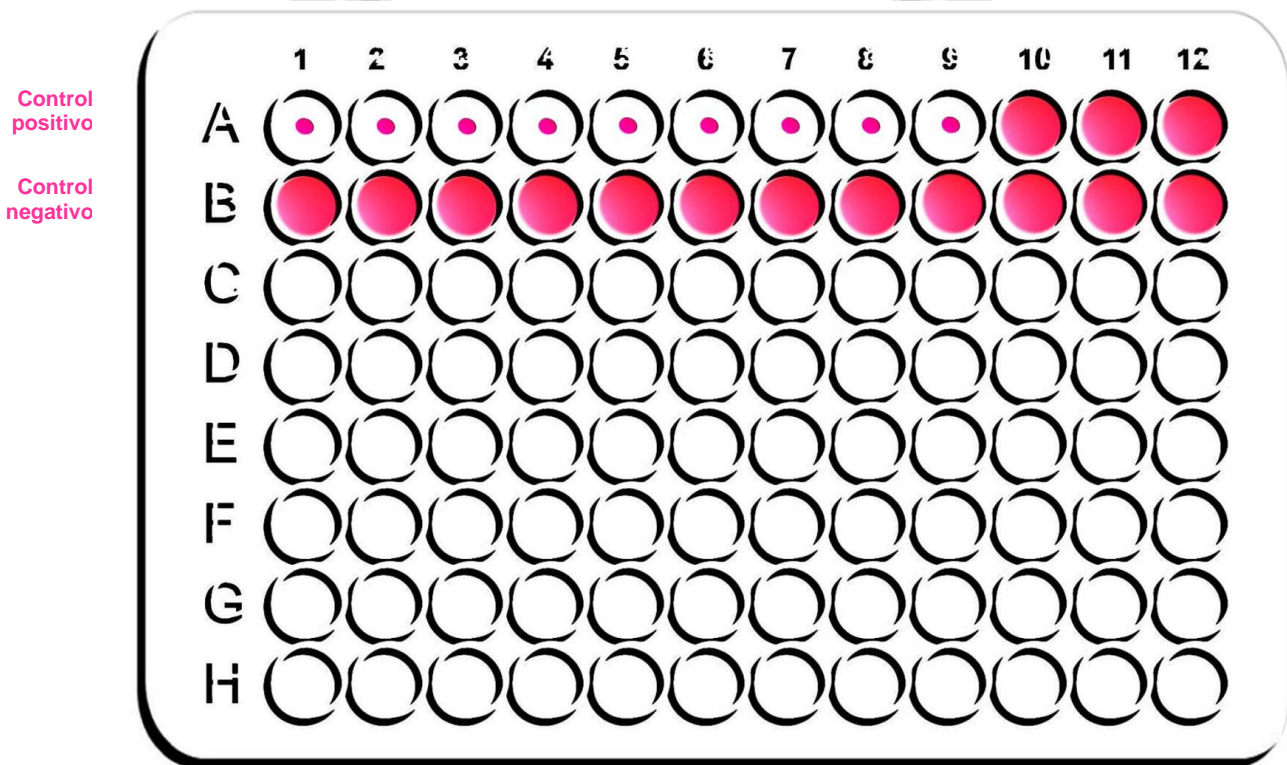
Técnica:

- Se agregó 25  $\mu$ l de buffer PBS (pH 6,4) a todas las celdas desde la segunda columna.
- Por cada grupo de muestras a evaluar se empleó un control negativo y uno positivo, dispuestos en la fila A y B respectivamente.
- En la primera celda de la fila A, se añadió 50  $\mu$ l del suero control positivo. Diluido (1:4)
- En la primera celda de la fila B, se añadió 50  $\mu$ l del suero control negativo tratado con caolín.
- En las primeras celdas de las siguientes filas, se colocó 50  $\mu$ l de los sueros problema tratados con caolín.
- Entonces, se transfirió 25  $\mu$ L de los sueros de las primeras celdas a las segundas celdas y se mezcló con el buffer. Se realizó la misma operación hasta la última celda descartando los últimos 25  $\mu$ l de las últimas celdas.
- Se añadió 25  $\mu$ l del antígeno preparado con 8 unidades hemaglutinantes, a todas las celdas de la microplaca.
- La placa fue llevada al homogenizador durante 10 segundos y luego incubada durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Cumplido el tiempo de incubación, se agregó 50  $\mu$ l de glóbulos rojos lavados y preparados al porcentaje adecuado, a todas las celdas de la microplaca, luego se homogenizó durante 10 segundos e incubó durante 4 horas a 4°C de temperatura.
- Hacer la lectura en una hoja de trabajo.

Lectura:

1. La reacción se consideró positiva (+) hasta la dilución donde hubo botón o la formación de un disco por menos el 50% del diámetro de la celda.
2. En la fila del suero control negativo (-), se observó hemaglutinación en todas las celdas.

	Negativo			Positivo bajo			Positivo moderado			Positivo alto		
Interpretación:	-	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Dilución:	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096	1:8192



*Esquema de la Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación.*

## b. Ajustes metodológicos

### ▪ **Especie animal donadora de glóbulos rojos:**

Se determinó comparando el título hemaglutinante obtenido entre los diferentes tipos de sangre utilizadas (porcino, canino y ave).

### ▪ **Porcentaje de eritrocitos:**

Haciendo uso de una proyección grafica donde se comparó los títulos hemaglutinantes frente al aumento de la concentración de eritrocitos (0.5; 1.0 y 2.0%), se determinó el  $DA_{50}$  que indica el mejor porcentaje de eritrocitos.

### ▪ **Eficiencia de la prueba de hemaglutinación directa:**

Se comparó los porcentajes de muestras positivas y negativas determinadas con esta prueba, con los porcentajes de muestras positivas y negativas determinadas mediante Inmunocromatografía.

### ▪ **Eficiencia de la prueba de inhibición de la hemaglutinación:**

Para la evaluación de la eficiencia de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, se compararon los porcentajes de muestras positivas y negativas determinadas con esta prueba, con los porcentajes de muestras positivas y negativas determinadas mediante Inmunocromatografía.

### ▪ **Correlación entre tipos muestras:**

Para la determinación de la eficiencia en base al tipo de muestra, se siguió el protocolo de la técnica de inhibición de la hemaglutinación para los sueros sanguíneos y el protocolo de hemaglutinación directa para las muestras de heces. Comparando entre los 2 resultados cual es el tipo de muestra

con mayor sensibilidad y especificidad por consiguiente mayor utilidad.

### c. Recopilación de la información

- En el campo
  - Entrevistas y encuestas a propietarios de caninos domésticos
  - Entrevistas a médicos veterinarios interesados en el tema
  - Observaciones anotadas
- En el laboratorio
  - Entrevistas a biólogos y laboratoristas.
  - Observaciones en el laboratorio.
- En la biblioteca
  - Libros de temas relacionados
  - Tesis como guía para redacción
  - Artículos veterinarios relacionados con el tema
- En otros ambientes generadores de la información científica
  - Artículos científicos especializados
  - Páginas web relacionadas al tema
  - Intercambio de información con profesionales de las diversas clínicas veterinarias

### 3.2.4. Variables de respuesta

#### a. Variables independientes

- Especie animal donadora de eritrocitos.
- El porcentaje de eritrocitos (0.5, 1 y 2 %).

#### b. Variables dependientes

- Reacción de hemaglutinación.
- Reacción de inhibición de la hemaglutinación.

### 3.2.5. Evaluación estadística

#### a. *Diseño experimental*

- **Unidades experimentales**

La muestra sanguínea de cada uno de los animales evaluados, fue considerada como una unidad experimental o de observación.

- **Diseño de tratamientos**

Para la prueba de hemaglutinación que determinó la eficiencia del tipo de sangre y la concentración eritrocitaria óptima, se utilizó un “Diseño en Bloques Completamente al Azar”. Divido en 3 tratamientos de acuerdo al tipo de sangre. Y 3 bloques de acuerdo a la concentración de eritrocitos, con 12 repeticiones para cada tratamiento.

- **Distribución de tratamientos**

#### Parte N° 1: Parámetros de la Hemaglutinación

Tabla N°1: Descripción de los tratamientos

TRATAMIENTOS	DESCRIPCIÓN	Número de repeticiones
Tratamiento I	Eritrocitos Canino	12
Tratamiento II	Eritrocitos Porcino	12
Tratamiento III	Eritrocitos Ave	12

Cuadro N°1: Distribución de tratamientos por bloques

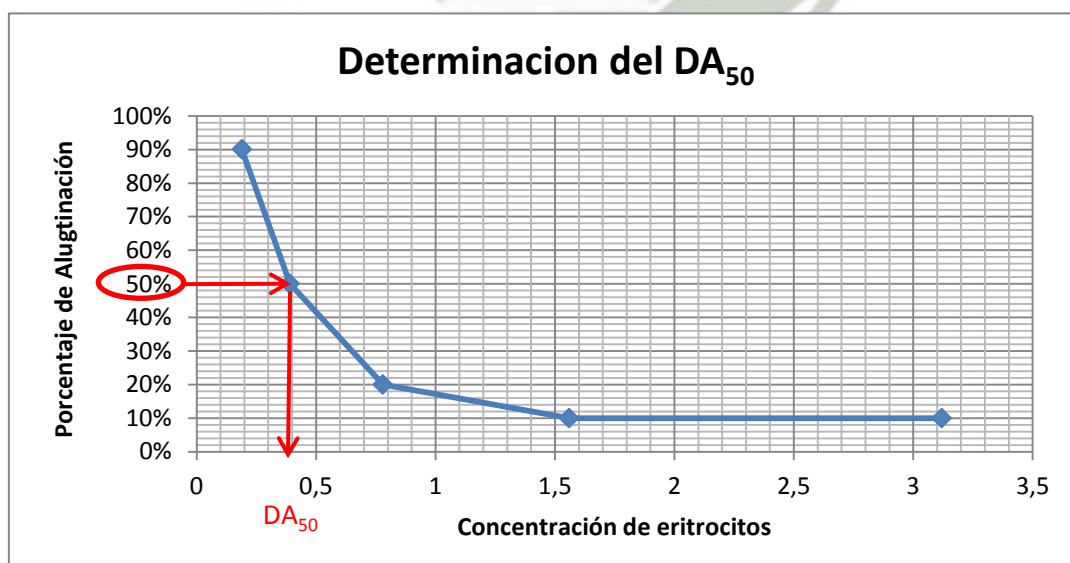
		T1	T2	T3
		C	P	A
<b>Bloque 1</b>	<b>Porcentaje de eritrocitos de 0.5 %</b>	12	12	12
<b>Bloque 2</b>	<b>Porcentaje de eritrocitos de 1 %</b>	12	12	12
<b>Bloque 3</b>	<b>Porcentaje de eritrocitos de 2 %</b>	12	12	12

(Se evaluó la sangre de 12 animales por tratamiento, realizando en total 36 repeticiones).

Debido a que los títulos hemaglutinantes se presenta como diluciones, no pueden ser promediados directamente, por lo cual, para su análisis estadístico se procedió a expresarlos en forma porcentual, llamándose “Unidades Aglutinantes Porcentuales o UAP”, y se denotaron de acuerdo a la siguiente tabla:

	Título Hemaglutinante	UAP
0	1:1	100
1	1:2	50
2	1:4	25
3	1:8	12.5
4	1:16	6.25
5	1:32	3.13
6	1:64	1.56
7	1:128	0.78
8	1:256	0.39
9	1:512	0.20
10	1:1024	0.10
11	1:2048	0.05
12	1:4096	0.02

Para determinar la concentración más eficiente de eritrocitos para realizar la prueba de hemaglutinación, se procedió a calcular la Dosis Aglutinante Media “DA<sub>50</sub>” esto se logró realizando una gráfica con los valores promedio de los títulos obtenidos y tomando el valor medio en proyección a la curva generada.



(Esquema de la gráfica DA<sub>50</sub>)

## Parte N° 2: Eficiencia de la Hemaglutinación Directa.

GRUPOS	DESCRIPCIÓN	Número de repeticiones
<b>Grupo 1</b>	Caninos sanos	10
<b>Grupo 2</b>	Caninos enfermos determinados con inmunocromatografía	10
<b>Total</b>		20

A las muestras de heces de los dos grupos de animales se les aplicó la prueba de hemaglutinación directa. Los títulos obtenidos se expresaron de forma cualitativa, como sano o enfermo, de acuerdo a lo propuesto por Parthiban *et al* (2012), según el siguiente cuadro:

Título $<1:32$ ( $> 3.13$ UAP) =	<b>SANO</b>
Título $\geq 1:32$ ( $\leq 3.13$ UAP) =	<b>ENFERMO</b>

En seguida los datos se evaluaron estadísticamente para determinar la coincidencia diagnóstica con la prueba inmunocromatográfica y por ende la eficiencia de la hemaglutinación directa.

## Parte N° 3: Eficiencia de la Inhibición de la hemaglutinación

GRUPOS	DESCRIPCIÓN	Número de repeticiones
<b>Grupo 1</b>	Caninos sanos	10
<b>Grupo 2</b>	Caninos enfermos determinados con inmunocromatografía	10
<b>Total</b>		20

A los dos grupos de animales se les aplicó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación serológica. Los títulos obtenidos, se expresaron en forma similar a los de la Hemaglutinación Directa, llamándoseles en este caso; “Unidades Inhibitorias Porcentuales o UIP”, y se denotaron de acuerdo a la siguiente tabla:

	Título de la I.H.	UIP
0	1:1	100
1	1:2	50
2	1:4	25
3	1:8	12.5
4	1:16	6.25
5	1:32	3.13
6	1:64	1.56
7	1:128	0.78
8	1:256	0.39
9	1:512	0.20
10	1:1024	0.10
11	1:2048	0.05
12	1:4096	0.02
13	1:8192	0.01

A continuación y de acuerdo a los estudios realizados por Carman y Povey (1984); los títulos obtenidos se expresaron en forma cualitativa como sano o enfermo, según la el siguiente cuadro:

Título $<1:8$ ( $>12.5$ UIP)	=	<b>SANO</b>
Título $\geq 1:8$ ( $\leq 12.5$ UIP)	=	<b>ENFERMO</b>

Finalmente los datos se evaluaron estadísticamente para determinar la coincidencia diagnóstica con las pruebas inmunocromatográficas y por ende la eficiencia de la Inhibición de la Hemaglutinación.

#### Parte N° 4: Coevaluación de la Hemaglutinación Directa y la Inhibición de la Hemaglutinación.

Los resultados de la una prueba de hemaglutinación directa haciendo uso de la muestra de heces se compararon con los resultados de la prueba de inhibición de la hemaglutinación serológica, determinando su nivel de eficiencia y su relación.

## *b. Análisis estadísticos*

### ▪ Pruebas no paramétricas

Los títulos hemaglutinantes obtenidos en la primera parte del estudio, se sometieron a la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnova determinando que estos no se adaptan a una distribución normal, por lo cual para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tipos de sangre utilizados, se procedió a someter los datos al análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, presentado por Daniels (2002). Luego de ello y para establecer el mejor tipo de sangre, se aplicó la prueba de especificidad de Dunn.

Debido a que los datos de la segunda parte del estudio (resultados de la hemaglutinación directa y de la inhibición de la hemaglutinación) se cuantifican de forma nominal, y derivan de una investigación donde se estudia la respuesta en un mismo individuo. Se utilizó la prueba de McNemar propuesta por Glantz (2005); Blair y Taylor (2008) para su análisis estadístico.

Finalmente se aplicó la prueba estadística de Chi cuadrado, presentada por Daniels (2002), para analizar la comparación entre las técnicas de Hemaglutinación Directa y la Inhibición de la Hemaglutinación.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

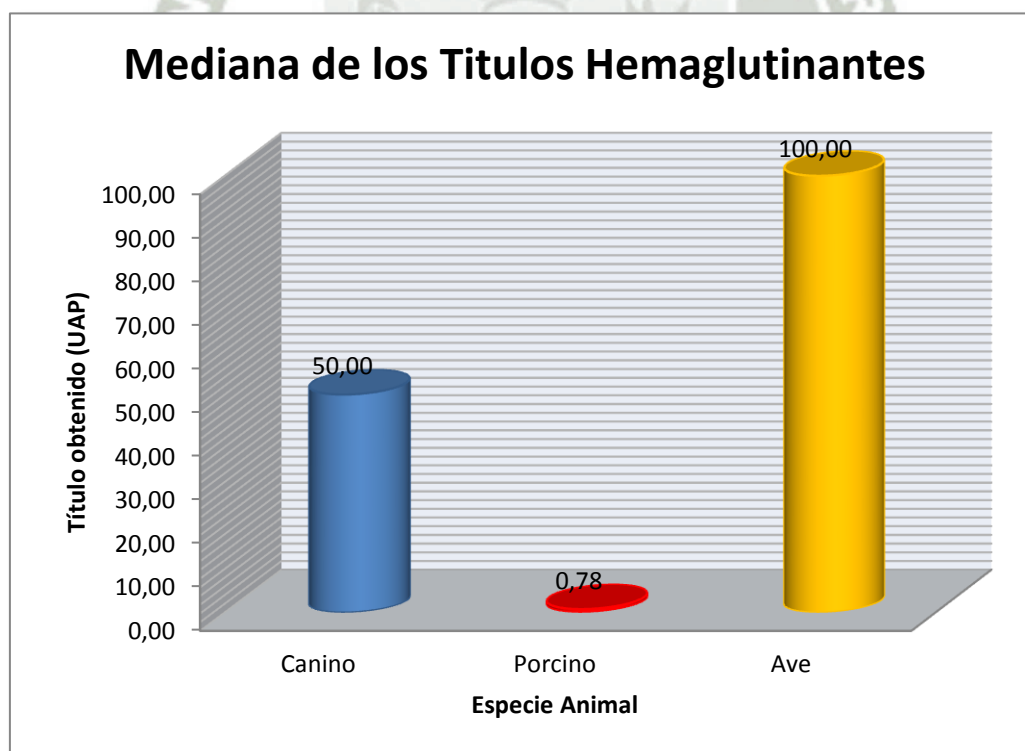
### 4.1. Determinación de la especie animal donante de eritrocitos para la prueba de hemaglutinación (HA).

Cuadro N° 1: Medianas de los títulos obtenidos en la prueba de HA

ANIMAL	Mediana	CONCENTRACIÓN DE ERITROCITOS		
		0.5%	1.0%	2.0%
Canino	50.00	50.00 <sup>b</sup>	50.00 <sup>b</sup>	100.00 <sup>b</sup>
Porcino	0.78	0.20 <sup>a</sup>	0.78 <sup>a</sup>	1.56 <sup>a</sup>
Ave	100.00	100.00 <sup>c</sup>	100.00 <sup>c</sup>	100.00 <sup>b</sup>
H (Kruskal-Wallis)		33.26	31.80	29.96
P		<0.01	<0.01	<0.01
Significancia		AS	AS	AS

<sup>abc</sup> DUNN (P<0.01)

Gráfico N° 1: Comparación de las medianas de títulos obtenidos en la prueba de Hemaglutinación, según la especie animal



En el cuadro y gráfico N° 1 se muestran las medianas de los títulos hemaglutinantes obtenidos, determinándose mediante una prueba estadística de Kruskal-Wallis una diferencia altamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre los eritrocitos de las especies animales utilizadas. Al aplicar la prueba de especificidad de Dunn se encontró que los eritrocitos porcinos son los de mayor eficiencia para la prueba de hemaglutinación con una mediana del título hemaglutinante de 0.78 UAP, seguidos de los eritrocitos caninos con una mediana del título de 50.00 UAP y en último lugar los eritrocitos de ave con una mediana de 100 UAP.

Según los estudios realizados por Flores (1987); Senda et al (1988); Nandi y Kumar (2010); el parvovirus canino posee una capacidad hemaglutinante interdependiente de la especie animal de los hematíes utilizados en la prueba, siendo la sangre de cerdo la que mayor eficiencia posee. La presente tesis corrobora estas afirmaciones demostrando la elevada capacidad para hemaglutinar glóbulos porcinos que tiene el parvovirus canino, característica muy útil que puede ser aprovechada para su diagnóstico clínico en nuestro medio.

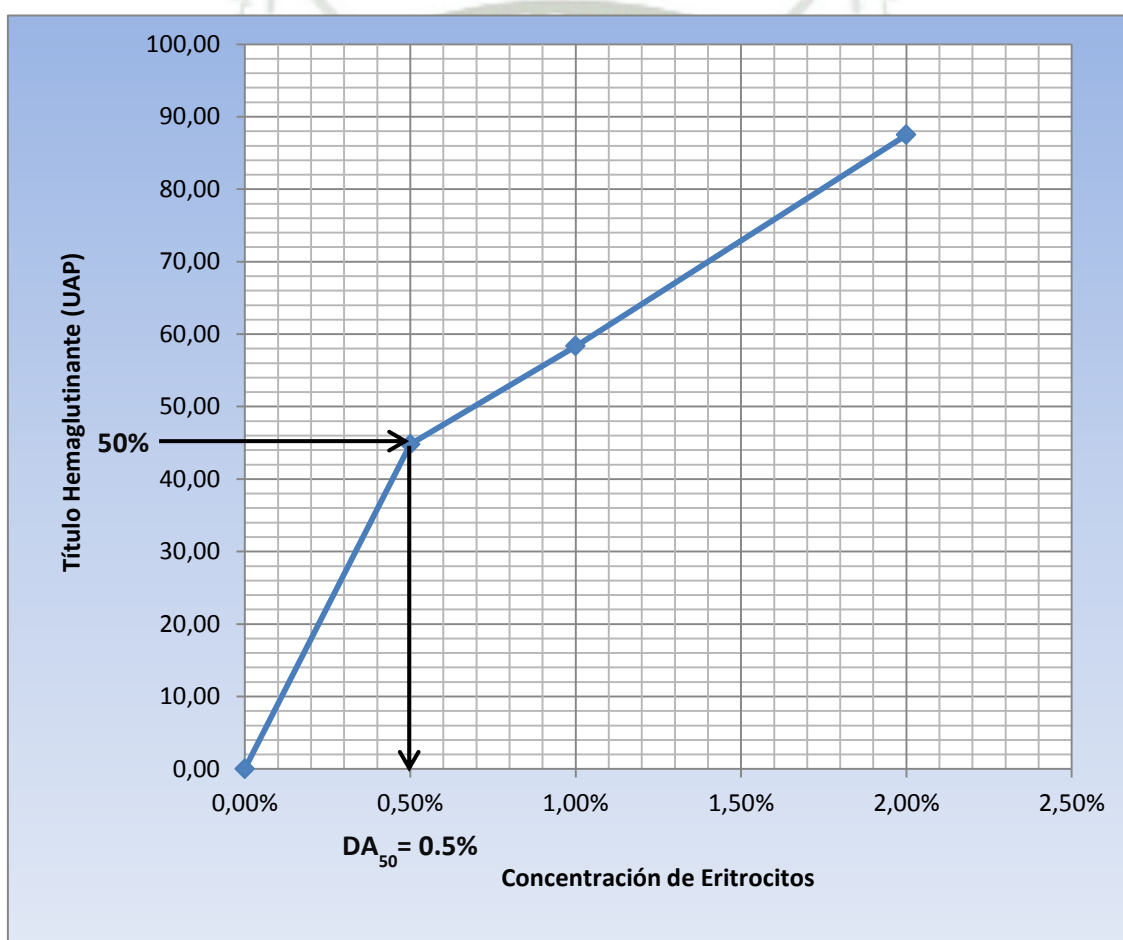
Según el trabajo realizado por Kham *et al* (2006), la sangre aviar debe producir títulos hemaglutinantes elevados al interactuar con el parvovirus canino. Sin embargo el presente estudio contradice estas afirmaciones, al encontrar una actividad hemaglutinante nula del parvovirus canino cuando se enfrentaba con los eritrocitos de ave. Este hecho puede ser explicado por lo expuesto en el estudio de Ramírez *et al* (1996); a medida que la temperatura de trabajo aumenta (25°C, 37°C) la hemaglutinación (usando eritrocitos de ave) es más corta debido al fenómeno de elución, además el tamaño de estos eritrocitos (mayor que el de mamíferos) favorecen la sedimentación. Por lo cual el mantenimiento de una baja temperatura, antes y durante el desarrollo de la hemaglutinación, sería imprescindible al momento de trabajar con sangre aviar.

#### 4.2. Determinación del porcentaje de eritrocitos para la prueba de hemaglutinación.

**Cuadro N° 2: Títulos Hemaglutinantes promedio de los eritrocitos caninos, según su concentración.**

Concentración de Eritrocitos Caninos	Título promedio (UAP)
0.5%	44.79
1.0%	58.33
2.0%	87.50

**Gráfico N° 2: Curva DA<sub>50</sub> para los eritrocitos caninos**

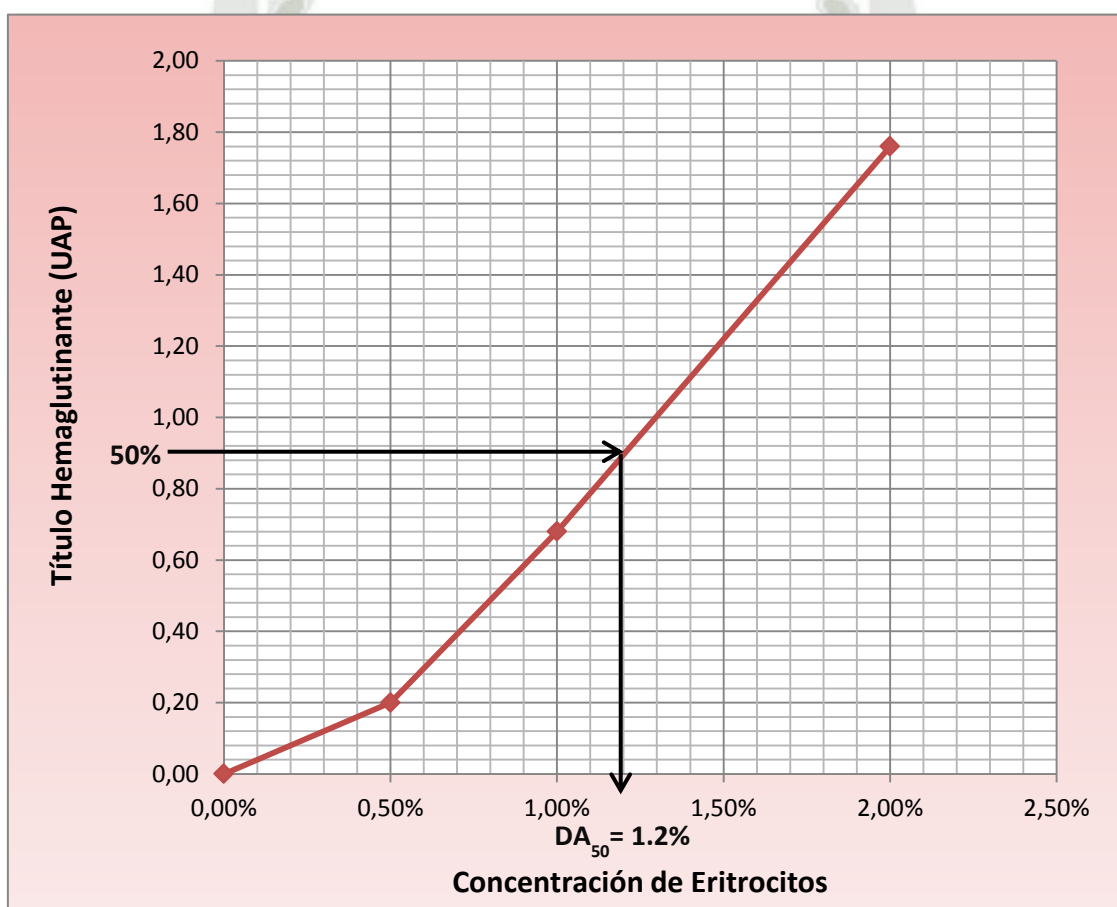


En el cuadro N° 2 se muestran los títulos promedio obtenidos por los eritrocitos caninos, según su concentración. En el gráfico N° 2 muestra la distribución de estos títulos para obtener el DA<sub>50</sub>, siendo 0.5% para este caso.

**Cuadro N° 3: Títulos hemaglutinantes promedio de los eritrocitos porcinos, según su concentración.**

Concentración de Eritrocitos Porcinos	Título promedio (UAP)
0.5%	0.20
1.0%	0.68
2.0%	1.76

**Gráfico N° 3: Curva DA<sub>50</sub> para los eritrocitos porcinos**

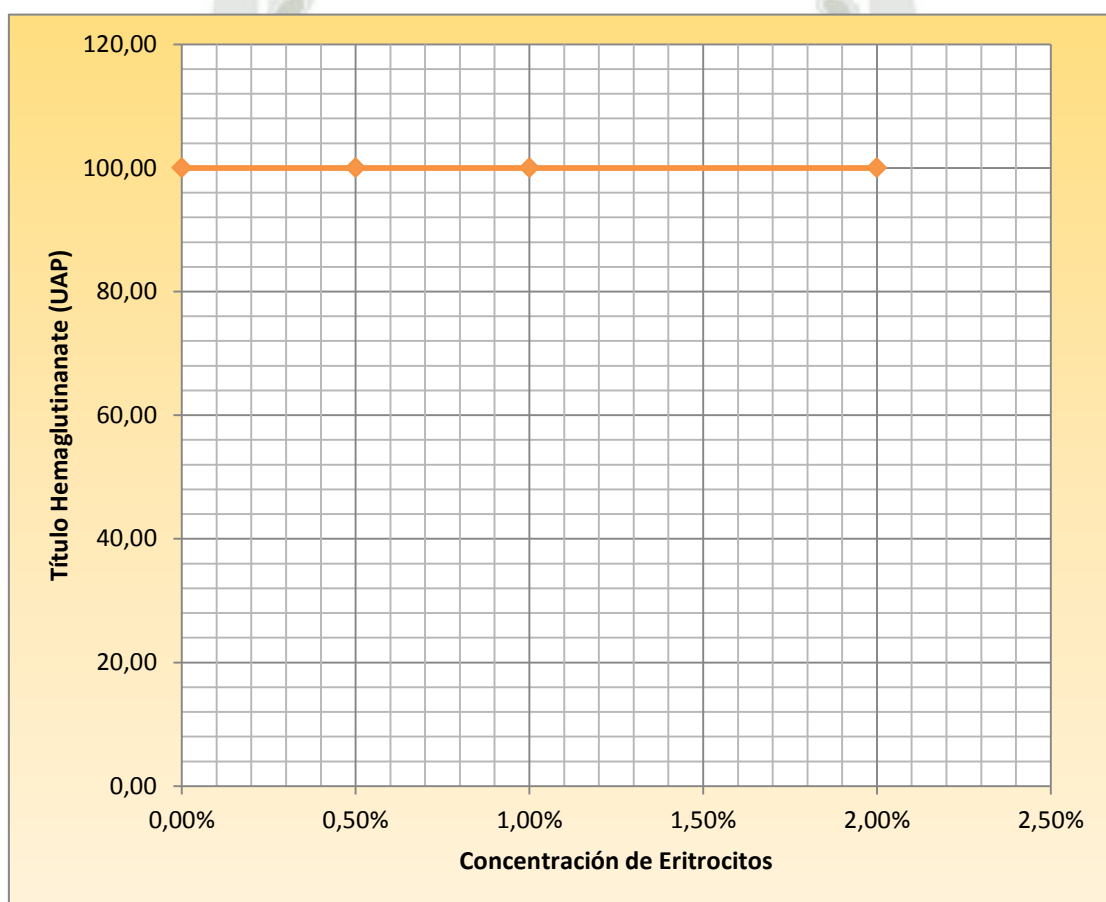


En el cuadro N°3 se muestran los títulos hemaglutinantes promedio obtenidos por los eritrocitos porcinos, según su concentración. En el gráfico N°3 se observa la distribución de los títulos hemaglutinantes para obtener el DA<sub>50</sub>, siendo en este caso 1.2% para los eritrocitos porcinos.

**Cuadro N° 4: Títulos hemaglutinantes promedio de los eritrocitos aviares, según su concentración.**

Concentración de Eritrocitos Aviares	Título promedio (UAP)
0.5%	100.00
1.0%	100.00
2.0%	100.00

**Gráfico N° 4: Curva DA<sub>50</sub> para los eritrocitos aviares**



En el cuadro N°4 se muestran los títulos hemaglutinantes promedio de los eritrocitos aviares, según su concentración. En el gráfico N°4 observamos la distribución de estos títulos para obtener el DA<sub>50</sub>, siendo en este caso nulo, debido a la ausencia de variación en los títulos.

En el caso de la sangre de porcino la concentración hallada (1.2%) es mayor a las concentraciones generalmente utilizadas por los diversos autores (0.5%, 0.8%, 1%), esto puede deberse a que a menor concentración el parvovirus provoca títulos más altos, y es más eficiente. Sin embargo, durante el desarrollo de este trabajo se observó que una concentración del 0.5% necesita un mayor tiempo de incubación (alrededor de 4 horas) y además en muchos casos se dificulta la lectura del título debido al poco contraste que genera esta concentración.

La sangre extraída de los diferentes porcinos donantes, fue preservada con la solución de Alsever y a una temperatura de 4 °C, mostrando una estabilidad variable. En el mejor de los casos, los hematíes se conservaron hasta 20 días luego de la colecta. Sin embargo la mayoría tenía un promedio de viabilidad de 10 días. Además a medida que los glóbulos rojos envejecían se producía un decaimiento de los títulos hemaglutinantes, reduciéndose una dilución cada 3 días aproximadamente.

Durante la realización de este estudio, se utilizó como antígeno parvoviral, la vacuna viva liofilizada de Biocan P que contiene la cepa *Parvovirus enteritidis canis* a concentración de  $10^5$  a  $10^6$  TCID<sub>50</sub>, la cual mantenida bajo refrigeración, mostro una alta estabilidad a lo largo del tiempo, manteniendo su capacidad hemaglutinante intacta hasta alrededor de 10 semanas luego de ser reconstituida. Tiempo luego del cual, se vio un decaimiento mínimo de su actividad. Estas observaciones corroboran con los hallazgos de Khan *et al* (2006) de que el virus puede permanecer activo durante 12 meses en almacenamiento a 4°C. Sin embargo, el crecimiento de bacterias psicrófilas a esta temperatura puede reducir la actividad de HA del virus, por cual la adición de agentes antimicrobianos (antibióticos, o azida de sodio) en la suspensión de virus durante el almacenamiento puede mejorar la calidad de conservación del virus.

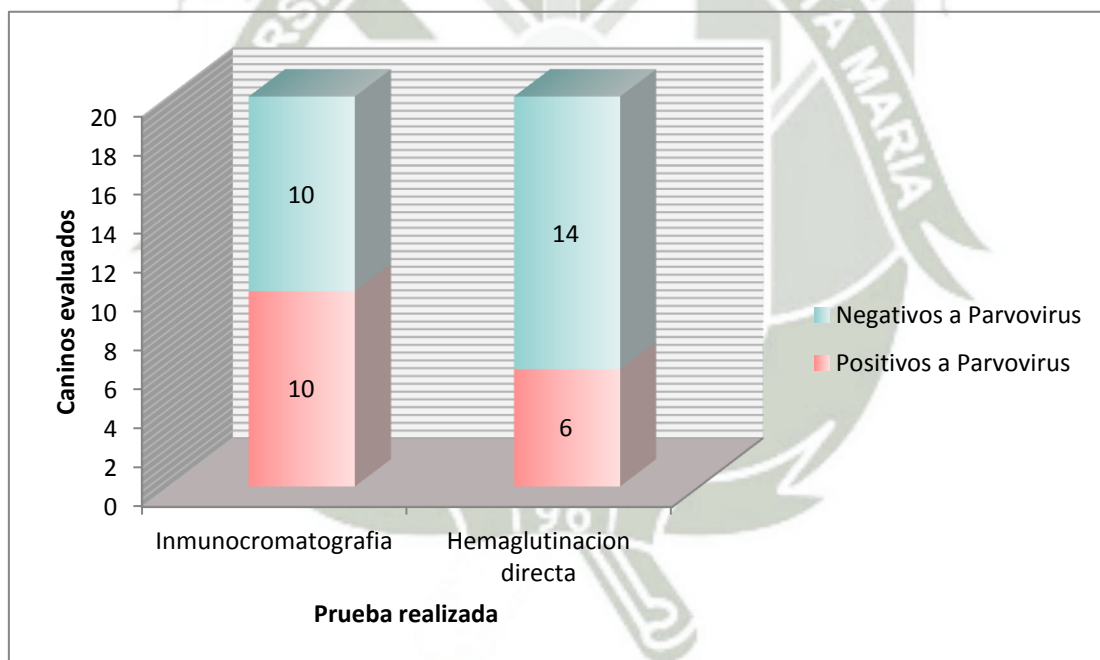
#### 4.3. Eficiencia de la prueba de Hemoaglutinación Directa (HA)

**Cuadro N° 5: Resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.**

DIAGNÓSTICO	Prueba Diagnostica			
	Inmunocromatografía		Hemaglutinación Directa	
	N°	%	N°	%
Positivos a Parvovirus	10	50	6	30
Negativos a Parvovirus	10	50	14	70
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Mc = 2.25;  $p > 0.05$ ; N.S. ( $\chi^2_{\alpha} = 3.84$ ;  $gl=1$ ;  $\alpha=0.05$ )

**Gráfico N° 5: Resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.**

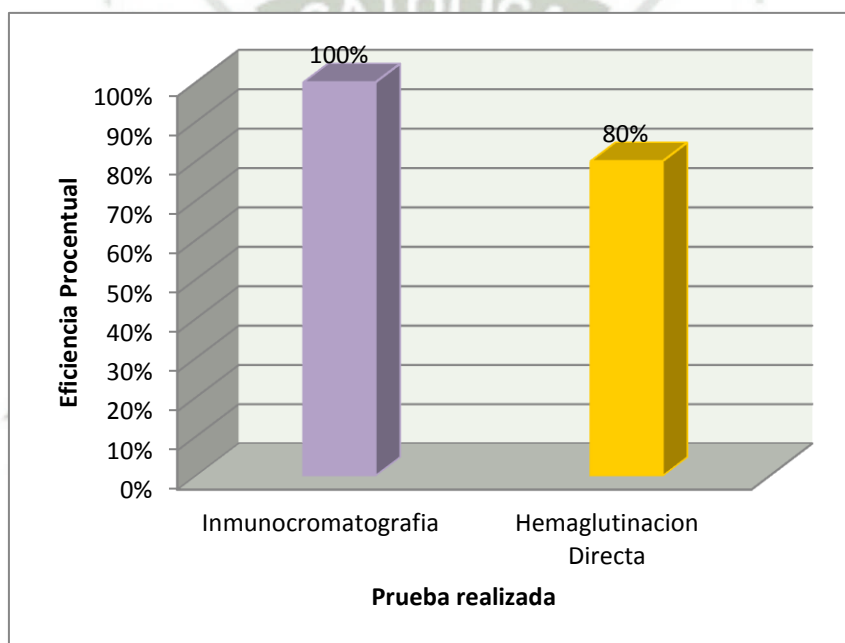


En el cuadro y gráfico N°5 se muestran los resultados de la prueba de Hemaglutinación frente a la prueba inmunocromatográfica en los caninos evaluados. Al aplicar la prueba de McNemar no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), lo cual indica similitud entre estos dos exámenes.

**Cuadro N° 6: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.**

Prueba Diagnóstica	Negativo	Positivo	Total	Eficiencia porcentual
Inmunocromatografía	10	10	20	100%
Hemaglutinación Directa	10	6	16	80%

**Gráfico N° 6: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Hemaglutinación Directa (HA) en los caninos evaluados.**



En el cuadro y gráfico N°6, se muestran los resultados de la prueba de Hemaglutinación frente a la prueba inmunocromatográfica en los caninos evaluados. Siendo comparados de manera porcentual, se determinó una eficiencia del 80% para la prueba de hemaglutinación directa en relación a la Inmunocromatografía.

Con exclusión del parvovirus canino, existen otros organismos enteropatógenos en las heces de los perros sanos, que pueden inducir la reacción de hemaglutinación (hemaglutininas inespecíficas), dando lugar a resultados falsos positivos (Mogollón *et al*, 1981; Savić-Jevđenić *et al*, 2006). Razón por la cual se consideran los títulos iguales o mayores a 1:32 ( $\leq 3.12$  UAP) como específicos para parvovirus canino (Parthiban *et al*, 2012). A pesar de lo mencionado, en el presente trabajo no se observó ninguna aglutinación en las muestras fecales procedentes de perros sanos.

De acuerdo con lo reportado por Ariza-Pinzon *et al* (2003), títulos hemaglutinantes fecales muy altos pueden ser atribuibles a la cepa CPV-2b. En este trabajo, sin embargo, no se estableció una relación entre la gravedad de la infección y el título de HA. Marulappa y Kapil (2008), resaltan la necesidad de evaluar y actualizar los métodos diagnósticos frente a la variantes actuales del parvovirus (CPV-2, CPV-2a, CPV-2b y CPV- 2c), debido a la rápida evolución de estas cepas.



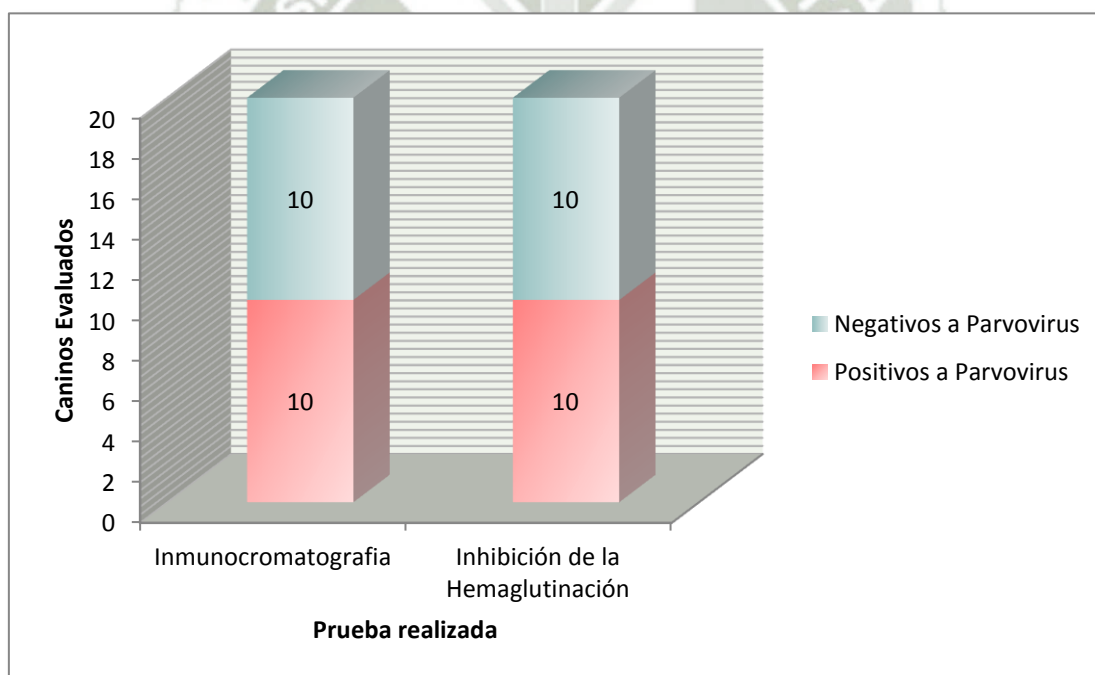
#### 4.4. Eficiencia de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación

**Cuadro N° 7: Resultados de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.**

DIAGNÓSTICO	Prueba Diagnóstica			
	Inmunocromatografía		Inhibición de la hemaglutinación	
	N°	%	N°	%
Positivos a Parvovirus	10	50	10	50
Negativos a Parvovirus	10	50	10	50
<b>TOTAL</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

Mc = 0.00;  $p > 0.05$ ; N.S. ( $\chi^2_{\alpha} = 3.84$ ;  $g| = 1$ ;  $\alpha = 0.05$ )

**Gráfico N° 7: Resultados de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados**

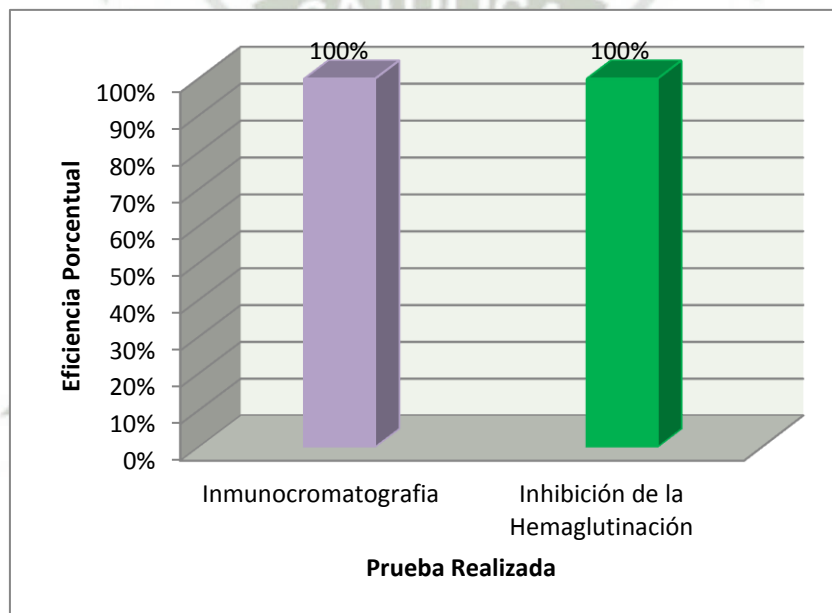


En el cuadro y gráfico N°7 se muestra la comparación del HI frente a la prueba de referencia (IC). Mediante el análisis de McNemar se determinó que no existe una variación significativa ( $p > 0.05$ ) entre estos dos tipos de exámenes diagnósticos.

**Cuadro N° 8: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.**

Prueba Diagnóstica	Negativo	Positivo	Total	Eficiencia porcentual
Inmunocromatografía	10	10	20	100%
Hemaglutinación Directa	10	10	20	100%

**Gráfico N° 8: Comparación porcentual de los resultados de la prueba Inmunocromatográfica (IC) y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.**



En el cuadro y gráfico N°8, se muestran los resultados de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación frente a la prueba inmunocromatográfica en los caninos evaluados. Siendo comparados de manera porcentual, se determinó una eficiencia del 100% para la prueba de inhibición de la hemaglutinación en relación a la Inmunocromatografía.

De acuerdo a lo expuesto por Carman y Povey (1984), se tomaron como positivos aquellos animales con títulos iguales o mayores a 1:8 ( $\leq 12.5$  UIP), estos autores además, clasificaron los títulos de anticuerpos en tres grupos: positivo bajo ( $\geq 8 \leq 32$ ), positivo moderado ( $> 32 \leq 256$ ) y positivo alto ( $> 256$ ). Sin embargo esta última clasificación no fue tomada en presente trabajo, ya que ella no interviene en la determinación de la eficiencia de la prueba. Aun así, es necesario mencionar estos detalles ya que ellos adquieren valor en el uso clínico de la prueba y en el pronóstico de los pacientes.

Todos los sueros de los animales sanos fueron negativos a la prueba de HI; sin embargo uno de ellos (canino de 5 meses de edad, sin vacunación previa) mostro un ligero título de 1:4 (25 UIP) contra parvovirus canino. Esto puede ser debido a que en los cachorros de una perra con un título muy alto a CPV-2, los anticuerpos maternos pueden persistir en el suero sanguíneo, hasta las 18 semanas de edad o más tiempo. (Greene, 2000; Quinn *et al*, 2005).

Es bien sabido que la existencia de diferentes tipos de inhibidores de la hemaglutinación en los sueros de los carnívoros hace imposible realizar exámenes serológicos o hacer una correcta interpretación de los resultados. (Gorski *et al*, 1993). Por lo tanto es imprescindible el pretratamiento del suero. En el presente estudio se ensayaron diversos métodos de purificación del suero (inactivación por calor, peryodato-glicerol, acetona, caolín al 25%), antes de realizar la inhibición de la hemaglutinación, siendo el caolín el método más eficiente. Sin embargo el caolín también puede eliminar algunos anticuerpos específicos si los sueros han sido muy diluidos antes del tratamiento, afectando significativamente los títulos finales. (Burgess, 1980). Razón por la cual, puede ser necesario realizar una calibración de la solución de caolín, antes de realizar las pruebas diagnósticas.

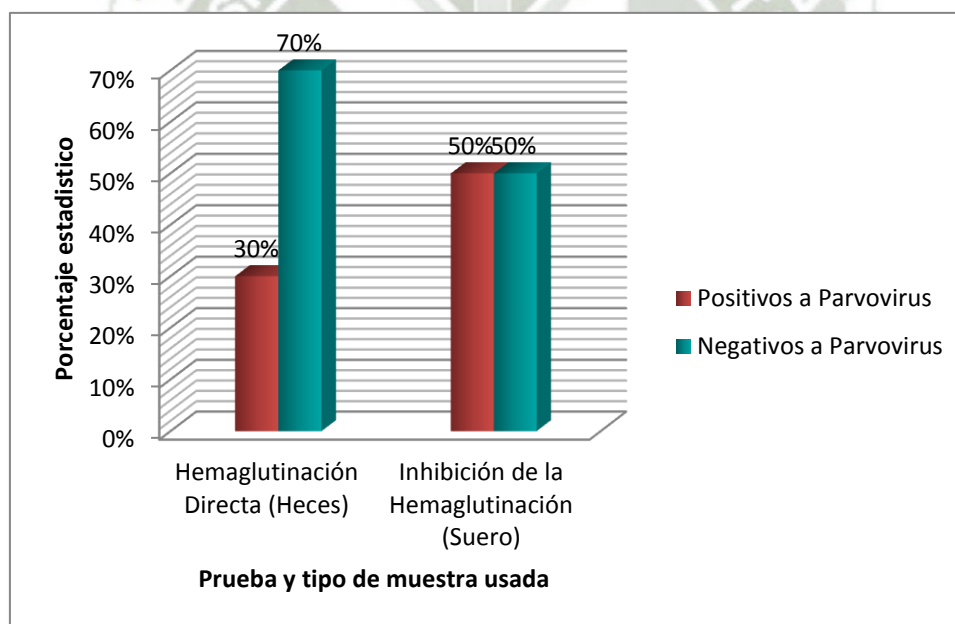
**4.5. Correlación entre la inhibición de la hemaglutinación serológica frente a la hemaglutinación directa con suspensión de heces.**

**Cuadro N° 9: Resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y de la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.**

DIAGNÓSTICO	Hemaglutinación directa (Heces)		Inhibición de la Hemaglutinación (Suero)	
	N°	%	N°	%
Positivos a Parvovirus	6	30	10	50
Negativos a Parvovirus	14	70	10	50
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>100</b>	<b>20</b>	<b>100</b>

$\chi^2 = 8.33$  A.S. ( $\chi^2_{\alpha} = 3.84$ ;  $gl=1$ ;  $\alpha=0.05$ )  $p < 0.05$

**Gráfico N° 9: Resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y de la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.**

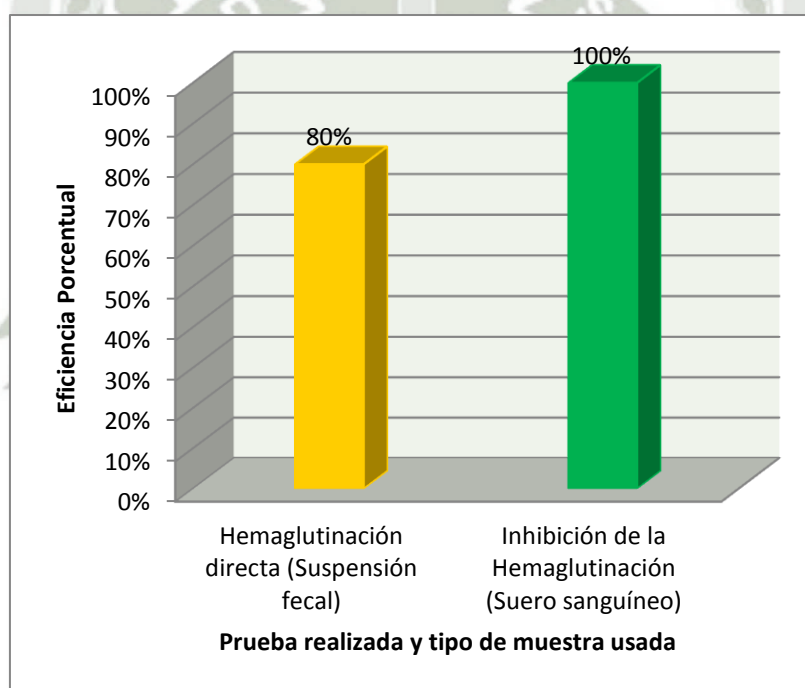


En el cuadro y gráfico N°9 se observa que aplicando la prueba estadística de Chi cuadrado encontramos diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las técnicas de HA y HI. Lo cual indica que la determinación de parvovirus usando suspensión heces (HA) no es igual que cuando usamos suero sanguíneo (HI).

**Cuadro N° 10: Comparación porcentual de los resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.**

Prueba Diagnóstica	Negativo	Positivo	Total	Eficiencia porcentual
Hemaglutinación directa (Suspensión fecal)	10	6	16	80%
Inhibición de la Hemaglutinación (Suero sanguíneo)	10	10	20	100%

**Gráfico N° 10: Comparación porcentual de los resultados de la Hemaglutinación Directa en heces y la Inhibición de la Hemaglutinación serológica.**



En el cuadro y gráfico N°10, se muestra la comparación de la eficiencia porcentual determinada para las dos pruebas evaluadas.

Seis (30%) de los caninos enfermos evaluados presentaron simultáneamente títulos HA y HI. Esto puede sugerir que la toma de muestra se realizó en la fase aguda de la infección. Por otro lado los animales enfermos que mostraron únicamente títulos HI positivos con actividad hemaglutinante fecal negativa, podría indicar que estos animales ya habían superado la etapa de eliminación fecal del virus o la excreción era en cantidades insustanciales (Mogollón *et al*, 1981; Savić-Jevđenić *et al*, 2006).

En este estudio la prueba de inhibición de la hemaglutinación ofreció rangos notables de concordancia frente a la prueba de referencia (Inmunocromatografía), razón por la cual se convierte en una prueba diagnóstica excelente para nuestro medio.





# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## V. CONCLUSIONES

1. Basado en los resultados obtenidos se concluye que los eritrocitos de porcino son los de mayor eficiencia para la prueba de Hemaglutinación con una mediana del título de 0.78 UAP, seguidas de los de canino con una mediana de 50 UAP y en último lugar los de ave con una mediana de 100 UAP.
2. Se observó que la mejor concentración de la sangre para la realización de la prueba de Hemaglutinación es del 1.2% para el caso de los eritrocitos de porcino, 0.5% para el caso de los eritrocitos del canino y nula para los eritrocitos aviares.
3. Se determinó que la Hemaglutinación Directa posee una eficiencia del 80%, con respecto a la prueba de referencia.
4. Se determinó que la Inhibición de la Hemaglutinación tiene una eficiencia del 100% con respecto a la prueba de referencia.
5. Se encontró que existen diferencias entre la técnica serológica (Inhibición de la Hemaglutinación) y la técnica mediante suspensión fecal (hemaglutinación directa) siendo la HI mejor que la HA, para el diagnóstico de parvovirus canino.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con el estudio del parvovirus canino en Arequipa mediante las técnicas de HA y HI con miras a determinar la prevalencia de la enfermedad en nuestro medio, lo cual será de gran utilidad para enfrentar y controlar la infección del virus y poder disminuir su impacto en la población canina de nuestra región.
2. Se recomienda el uso de la técnica de HI para establecer mejores programas de vacunación, ya que esta prueba permite detectar la duración de la inmunidad calostrual, indicando así el mejor momento de vacunación y evitar la neutralización de las vacunas aplicadas.
3. Se recomienda explotar las técnicas del HA y el HI para el estudio de otras enfermedades causadas por virus hemaglutinantes como el Morbillivirus canino (causante del distemper), coronavirus canino, rotavirus canino, entre muchos otros. Ya que esto permitirá una mejor diferenciación de las enfermedades que estos virus provocan y por ende la instauración de terapias más eficientes.
4. Se recomienda el estudio de la técnica de “Aglutinación en látex”, ya que con base en los estudios descritos en la literatura, esta prueba es igual de económica, sensible y específica que la hemaglutinación, pero posee la ventaja de eliminar la necesidad de obtener y conservar sangre de animales.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abbas, A. K. & Lichtman, A.H. 2004.** Inmunología Celular y Molecular. Quinta edición. Editorial Elsevier España, S.A. Madrid – España.
2. **Acheson, N. H. 2011.** Fundamentals of Molecular Virology. 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc. Printed in Asia.
3. **Aiello, S. E.; Mays, A.; Amstutz, H.E.; Anderson, D.P.; Armour, J.; Jeffcoff, L.B.; Loew, F.M. y Wolf, A.M. 2000.** Manual de Merck de Veterinaria. Quinta Edición en español. Editorial Océano. Barcelona-España.
4. **Ariza-Pinzon, S.; Fuentes, D.; Vera, B. & Villamil, L. 2003.** Correlation between ELISA and latex agglutination tests for diagnosis of canine parvovirus. Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.
5. **Aycachi Inga, R. 2007.** Hemoaglutinación. Escuela profesional de Biología. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. Perú.
6. **Balmaseda Hechavarría, A; Matute, M. L. & Mira Gómez, P. L. 2002.** Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico del dengue. Programa de Reconstrucción Pos-Huracanes. George y Mitch.
7. **Berois, M.; Delfraro, A.; Frabasile, S.; Mirazo, S. y Tomé, L. 2011.** Curso De Microbiología, Módulo De Virología. Facultad de Ciencias. Universidad de la República - UDELAR. Uruguay.
8. **Biberstein, E. L. & Zee, Y. Ch. 1994.** Tratado de Microbiología Veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
9. **Blair, R. C. & Taylor, R. A. 2008.** Bioestadística. Editorial Pearson Educación. México.

10. **Bonagura, D. J. 2001.** Kirk – Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales. XIII edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Madrid – España.
11. **Burgess, G. W. 1980.** Porcine Parvovirus Infection. Virology and Serology. Australian Bureau of Animal Health.
12. **Carman, P.S. & Povey, R.C. 1984.** The Seroprevalence of Canine Parvovirus-2 in a Selected Sample of the Canine Population in Ontario. Can Vet Journal. Vol. 25: Págs. 259-262.
13. **Cuello Portal, S. & Rosado Ruiz-Apodaca, I. 2014.** Inmunodiagnóstico en Veterinaria. Principios y Aplicaciones. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. CENSA, Cuba.
14. **Daniels, W. W. 2002.** Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa S.A. de C.V., México.
15. **Day, M. J. & Schultz, R. D. 2014.** Veterinary Immunology. Principles and practice. Second Edition. Taylor & Francis Group, LLC. Boca Raton, FL 33487-2742.
16. **De Leeuw, P. W. & Guinée, P. A. M. 1981.** Laboratory Diagnosis in Neonatal Calf and Pig Diarrhoea. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science. Vol. 13. Martinus Nijhoff Publishers. London.
17. **Ettinger, S. J. & Feldman, E. C. 2007.** Tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato. Sexta edición. Volumen 1 y 2. Elsevier España, S.A. Madrid – España.
18. **Fenner, F.; Bachmann, P. A.; Gibbs, E. P. J.; Murphy, F. A.; Studdert, M. J. & White, D. O. 1992.** Virología veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
19. **Fernán-Zegarra Romero, J. 2010.** Histología Normal veterinaria.

- 20. Flores Castro, R. 1987.** Parvovirus Canina y Aspectos de Inmunización. Laboratorios Litton de México, S. A. de C.V. Ciencia Veterinaria Vol. 4, págs.131-159.
- 21. García Sacristan, A.; Castejón Montijano, F.; De la Cruz Palomino, L. F.; González Gallego, J.; Murillo López de Silanes, M.D. & Salido Ruiz, G. 1996.** Fisiología Veterinaria. Editorial McGraw-Hill – Interamericana. Madrid – España.
- 22. Gartner, L. P. & Hiatt, J. L. 2011.** Histología Básica. Editorial Elsevier. Barcelona, España.
- 23. Glantz, S. A. 2005.** Bioestadística. Sexta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
- 24. Gómez, N. & Guida, N. 2010.** Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. Editorial Inter-Médica S.A.I.C.I. Buenos Aires – Argentina.
- 25. Gorski, J.; Daniel, A.; Mizak, B. & Zwierzchowski, J. 1993.** Requirements for Haemagglutination Inhibition test for Diagnosis of Parvovirus Infections of Carnivores. Bulletin of the Veterinary Institute in Puławy 38, 59-66.
- 26. Greene, C. E. 2000.** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
- 27. Gutiérrez Pabello, J. A. 2010.** Inmunología Veterinaria. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.
- 28. Gutiérrez Peceros, V.; Belaunde Villalón, L. & Cobos Zelada, M. 1996.** Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de Arbovirosis. Instituto nacional de salud. Lima – Perú.
- 29. Hickman, C. P.; Roberts, L. S.; Keen, S. L.; Larson, A.; L'Anson, H. & Eisenhour, D. J. 2008.** Integrated Principles of Zoology. Fourteenth edition. McGraw-Hill Higher Education. Boston – EE.UU.

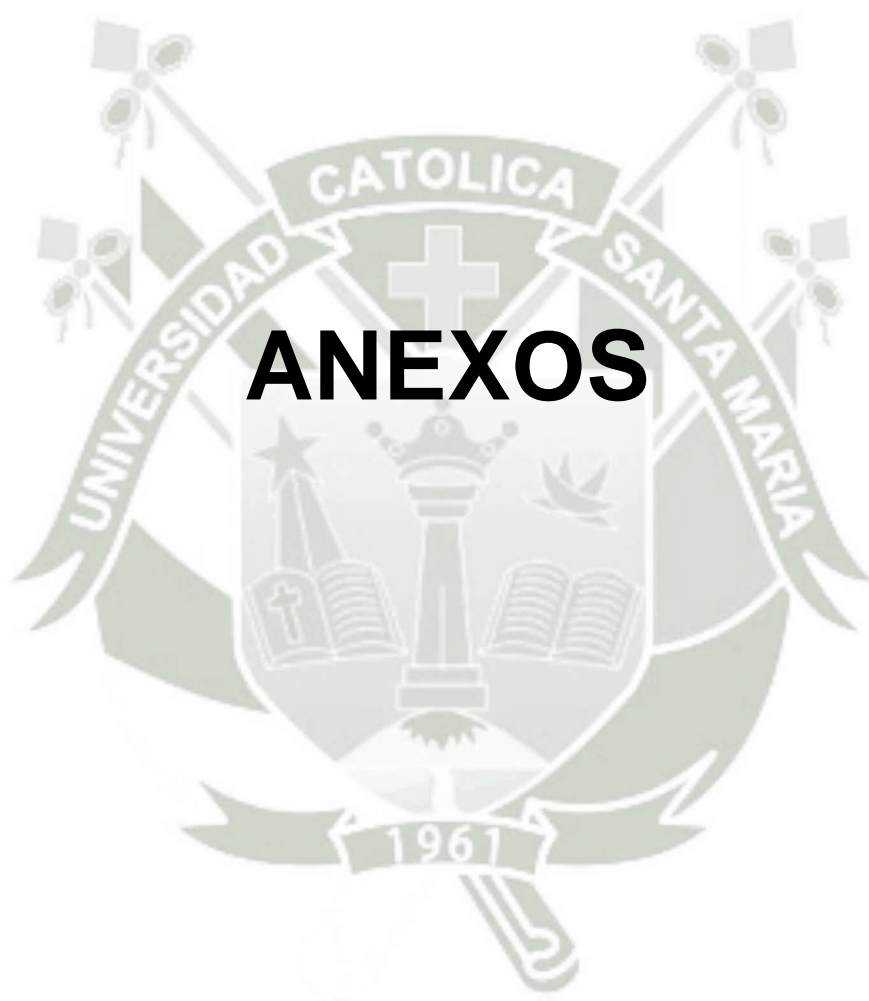
- 30. Hurtado Hernández, D. 2012.** Nueva Perspectiva de la Parvovirus Canina en el Sur del Valle de Aburra. Trabajo de grado para Optar el Título de Medica Veterinaria. Corporación Universitaria Lasallista. Caldas – Antioquia. Colombia.
- 31. Jaramillo Arango, C. J. & Martínez Maya, J. J. 2010.** Epidemiología veterinaria. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México.
- 32. Juárez Flores, A. F. 2011.** Cambios hematológicos en perros positivos a parvovirus canino. Tesis presentada para Obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia – Michoacán. México.
- 33. Khan, M.; Rabbni, M.; Muhammad, K.; Murtaza, N.; & Nazir, J. 2006.** Isolation and Characterization of Canine Parvovirus. International Journal of Agriculture & Biology, Vol. 8, No. 6, 2006.
- 34. Kumar, M.; Nandi, S. & Manohar, M. 2010.** Comparison of virus isolation and Haemagglutination Assay with Polymerase Chain Reaction for Diagnosis of Canine Parvovirus. Indian Veterinary Journal Vol. 87: 849 – 852.
- 35. Larkin, P. & Stockman, M. 2002.** El libro de los perros. Editorial Grijalbo. Barcelona - España.
- 36. Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, Ch. A.; Krieger, M.; Scott, M.P.; zipursky, S. L. & Darnell, J. 2005.** Biología celular y Molecular. 5ta Edición. Editorial Médica Panamerica. Buenos aires – Argentina.
- 37. López Tejeda, E. 2010.** Separatas de Sistemática Animal. Impresión mimeografiada. UNSA. Arequipa.
- 38. MacLachan, N. J. & Dubovi, E. J. 2011.** Fenner's Veterinary Virology. Fourth Edition. Elsevier. London NW1 7BY, UK.

- 39. Manteca Vilanova, X. 2002.** Etología clínica veterinaria del perro y del gato. Segunda edición. Editorial Multimédica, S.A. Barcelona – España.
- 40. Manrique Meza, J. & Bustinza Esquivel, R. 2014.** Separatas de Inmunología para alumnos de Medicina Veterinaria. Impresión mimeografiada. UCSM. Arequipa, Perú.
- 41. Marulappa, S. Y. & Kapil, S. 2008.** Simple Tests for Rapid Detection of Canine Parvovirus Antigen and Canine Parvovirus-Specific Antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, Jan. 2009, Vol. 16 N° 1; p. 127–131.
- 42. Mogollón G., J. D.; Cortés C., E.; Benavides O., O. J. y Forero P., G. 1981.** Parvovirus canina en Colombia II. Aislamiento y serología. *Revista ICA. Colombia*. Vol. 19 (Núm. 2) p. 201 – 207.
- 43. Morgan, R. V.; Bright, R.M. & Swartout M. S. 2004.** Clínica de Pequeños Animales. Cuarta edición. Editorial Elsevier, Madrid – España.
- 44. Moscoso Velarde, R. B. 2002.** Evaluación macroscópica del efecto cicatrizante de la sábila (*Aloe vera*) en heridas incisas en cuyes. Tesis presentada para Optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista. UCSM. Arequipa – Perú.
- 45. Murphy, F. A.; Gibbs, E. P. J.; Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. 1999.** *Veterinary Virology*. Third Edition. Academic Press. Printed in the United States of America.
- 46. Nandi, S. & Kumar, M. 2010.** Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian Journal Virology*. Vol. 21(1):31–44.
- 47. Nelson, R. W. & Couto, C. G. 2010.** Medicina interna de pequeños animales. Cuarta Edición. Elsevier España, S. L. Barcelona - España.
- 48. Nelson, D. L. & Cox, M. M. 2006.** Lehninger. Principios de Bioquímica. Cuarta edición. Ediciones Omega, S.A. Barcelona – España.

49. **Parthiban, S.; Mukhopadhyay, H. K.; Ravikumar, K.; Antony, P. X. & Pillai, R. M. 2012.** HA-HI and PCR assays for detection of canine parvoviral enteritis. Online Journal of Veterinary Research – OJVR, Volume 16 (3):127-132.
50. **Perez Mejia, J. 2002.** Histología Veterinaria.
51. **Pinto, J.; Barco, M.; Afanador, M. C.; Merchán, A. M.; Montañez, M. F.; Andrade, F. & Torres, O. 2005.** Obtención de anticuerpos policlonales IgY antiparvovirus canino a partir de yema de huevo de gallina. Universitas Scientiarum, Revista de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Vol. 10, N° 1, 37-44.
52. **Pumarola, A.; Rodriguez-Torres, A.; Garcia-Rodriguez, J. A. & Piedrola-Angulo, G. 1999.** Microbiología y parasitología médica. Segunda edición. Masson, S.A. Barcelona – España.
53. **Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.C.; Leonard, F.C. & Maghire, D. 2005.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
54. **Ramírez Mendoza, H.; Carreón Nápoles, R.; Mercado García, C. & Rodríguez Torres, J. 1996.** Hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación del paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participa en la prueba. Revista Veterinaria México, Vol.27, N°3: 257-259.
55. **Reece, W. O. 2004.** Dukes Fisiología de los animales domésticos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza – España.
56. **Ruiz Romero, R. A.; Candanosa Aranda, E.; Sánchez Godoy, F. y Ducoing Watty, A. 2007.** Diagnóstico del parvovirus canino-2 (pvc-2) por inmunohistoquímica en perros domésticos. Revista Veterinaria México, Volumen 38, Número 1. Págs. 41-53.

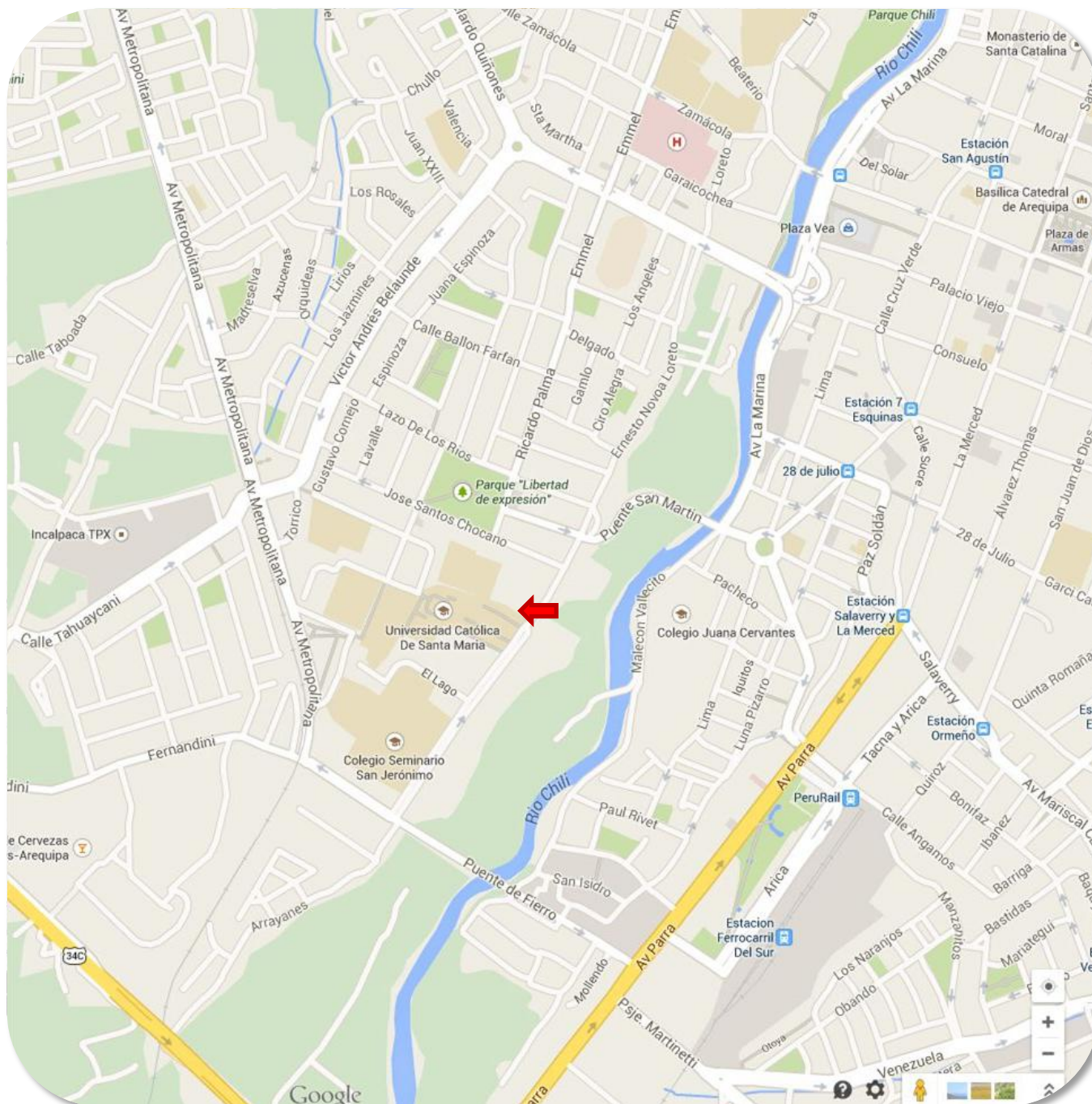
- 57. Román Tejada, C. H. 2013.** Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* en gatos (*Felis catus*) en la zona de río seco en el distrito de cerro colorado, Arequipa. Tesis presentada para Optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista. UCSM. Arequipa – Perú.
- 58. Ross, M. H. & Pawlina, W. 2008.** Histología texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires - Argentina.
- 59. Ruckebusch, Y.; Phaneuf, L. P. & Dunlop, R. 1994.** Fisiología de pequeñas y grandes especies. Editorial el Manual Moderno, S.A. De C.V. México, D.F.
- 60. Ryan, K. J.; Ray, G. C.; Ahmad, N.; Drew, W. L. & Plorde, J. J. 2011.** Sherris Microbiología Médica. Quinta edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México.
- 61. Sánchez Romaní, E. L.; Náquira Velarde, C. G. & Vega Chirinos, E. S. 2002.** Manual de procedimientos para el diagnóstico serológico de las zoonosis parasitarias. Ministerio de Salud del Perú, Instituto Nacional de Salud. Lima – Perú.
- 62. Sarute, N. 2012.** Detección del virus Distemper canino por RT-PCR en tiempo real y caracterización genética de aislamientos del Río de la Plata mediante el análisis de los genes de la hemaglutinina y la proteína de fusión. Tesis de Maestría PEDECIBA Biología. Universidad de la República de Uruguay. Montevideo, Uruguay.
- 63. Savić-Jevđenić, S.; Trailović, D.; Vidić, B. & Jovanović, M. 2006.** Diagnostic Methods for Canine Parvovirus. Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 56. No. 5-6, 515-527.
- 64. Schaer, M. 2006.** Medicina clínica del perro y el gato. Editorial Masson, S.A. Barcelona – España.

65. **Schöning, B. 2008.** Guía práctica del comportamiento del perro. Editorial Hispano Europea, S. A. Barcelona – España
66. **Senda, M.; Hirayama, N.; Itoh, O. & Yamamoto, H. 1988.** Canine Parvovirus: Strain Difference in Haemagglutination Activity and Antigenicity. J. gen. Virol. (1988), Vol. 69, Págs. 349-354.
67. **Skalka, B. 2000.** Virología Veterinaria. Universidad de la habana, facultad de ciencias agropecuarias, escuela de medicina veterinaria. Editorial Ciencia – Técnica. Instituto cubano del libro. La Habana – Cuba.
68. **Sosa da Silva, K. A. 2009.** Estudio de la diversidad del Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) mediante el análisis de repetidos en el genoma viral. Universidad de la República. Montevideo - Uruguay.
69. **Strottmann, D. M.; Scortegagna, G.; Kreutz, L. C.; Barcellos, L. J. G.; Frandoloso, R. & Anziliero, D. 2008.** Diagnóstico e estudo sorológico da infecção pelo parvovírus canino em cães de Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciência Rural, Santa Maria, Vol.38, N°2, p.400-405.
70. **Taragano de Azar, R. 2000.** Mi perro sin raza. Editorial Albatros. Buenos aires – Argentina
71. **Thompson, M. S. 2008.** Diagnóstico diferencial clínico en pequeños animales. Editorial Elsevier Doyma, S.L. Barcelona - España.
72. **Tizard, I. R. 2009.** Introducción a la inmunología veterinaria. Octava edición. Editorial Elsevier España, S.L. Barcelona – España.
73. **Villavicencio Salinas, E. J. & Torres Torres, M. C. D. 2007.** Indicadores básicos de salud Veterinaria para pequeños animales, Arequipa. Tesis presentada para Optar el Título Profesional de Médico Veterinario y Zootecnista. UCSM. Arequipa – Perú.



## VIII. ANEXOS

### ANEXO N° 1: Mapa o croquis de ubicación



Fuente: Google Maps (<https://maps.google.com/>)

*Ubicación de la Universidad Católica de Santa María (Flecha roja)*

## ANEXO N° 2: Reactivos para Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación

### A. ANTÍGENO DE PARVOVIRUS CANINO

- Se utilizó la vacuna de Biocan P de Bioveta a. s. Republica Checa. Lote 675721A. Vacuna viva contra parvovirus canino (CPV-2) en perros, agente liofilizado. Composición para 1 mL. Con una concentración de min.  $10^{5.0}$  TCID<sub>50</sub>, max.  $10^{6.2}$  TCID<sub>50</sub>.
- Este liofilizado fue suspendido en 1 mL de buffer PBS pH 6,4 y mantenido a 4°C.

### B. ANTÍGENO DE PARVOVIROSIS CANINO CON 8 UNIDADES HEMAGLUTINANTES

Se prepara en función del título obtenido en la prueba de HA.

### C. SUERO CONTROL POSITIVO

- Se utilizó un antisuero contra parvovirus canino, proveído por Dr. Fernando Fernández Fernández, el cual no necesito de tratamientos previos para su utilización en la prueba de HI.
- Durante los ensayos previos a las pruebas finales también se usó el antisuero Gastroglobulin de laboratorios Vencofarma de Brasil. Suero contra parvovirus y coronavirus canina. Ampolla de 10 mL. Composición: inmunoglobulinas contra el virus parvovirus canino 1000.0 TCID<sub>50</sub>. El cual, aunque con menor título también resultó útil para la prueba.

### D. SUERO CONTROL NEGATIVO

- Se utilizó suero humano, ya que como menciona, las personas no desarrollan inmunidad contra la enfermedad, este suero fue sometido al igual que todas las muestras al tratamiento con caolín.

## ANEXO N° 3: Preparación de Buffer y Soluciones para Hemaglutinación

### A. SOLUCIÓN DE ALSEVER

Tomado de Sánchez *et al* 2002.

Glucosa anhidra	18,66 g
Cloruro de sodio	4,18 g
Citrato de sodio	8,0 g
Ácido cítrico	0,55 g
Agua destilada	1000,00 mL

### B. BUFFER FOSFATO SALINO (PBS) 0,15 M.

Tomado de Sánchez *et al* 2002.

#### Solución 1

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.04 g
Agua destilada	100.00 mL

#### Solución 2

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.13 g
Agua destilada	100.00 mL

#### **PBS pH 7,2**

Solución 1	7.0 mL
Solución 2	18.0 mL
NaCl	2.1 g
Agua destilada (Completar)	250.0 mL

#### **PBS pH 6,4**

Solución 1	18.4 mL
Solución 2	6.7 mL
NaCl	2.1 g
Agua destilada (Completar)	250.0 mL

- ❖ *Nota: se puede preparar diversos volúmenes pero manteniendo las proporciones indicadas.*

### **C. SOLUCIÓN DE CAOLÍN AL 25 %.**

Tomado de De-Leeuw & Guinée 1981:

- Preparar una suspensión de caolín al 25% en ácido clorhídrico 5 N (solución peso/volumen), pesar 25g de caolín y suspenderlo en 100 mL de ácido. Agitar y centrifugar a 4000 RPM durante 10 min.
- Lavar tres veces con PBS, cada vez seguida por centrifugación.
- Esterilizar la suspensión de caolín al 25% en PBS, mediante autoclave por 1 hora a 121°C y conservar a 4°C.

### **D. SOLUCIÓN DE ERITROCITOS PORCINOS AL 30 %.**

- Lavar los eritrocitos cinco veces en Alsever centrifugando a 2000 RPM por 5 minutos y eliminando el sobrenadante.
- Lavar los glóbulos rojos una vez en PBS pH 7,2.
- Suspender los eritrocitos en buffer PBS (pH 6,4) al 30 % (solución volumen/volumen). Para ello; tomar 300 uL de eritrocitos sedimentados y suspenderlos en 1000 uL de PBS, para obtener la solución al 30% de glóbulos rojos lavados.

## ANEXO N° 4: Tablas de resultados

Tabla N°1: Títulos obtenidos en la prueba de Hemaglutinación

N°	CANINO						PORCINO						AVE					
	0,5%		1%		2%		0,5%		1%		2%		0,5%		1%		2%	
	Título	UAP	título	UAP	Título	UAP	Título	UAP	Título	UAP	Título	UAP	Título	UAP	Título	UAP	Título	UAP
1	1:2	50	1:2	50	1:2	50	1:256	0.39	1:128	0.78	1:32	3.13	1:1	100	1:1	100	1:1	100
2	1:2	50	1:2	50	1:1	100	1:512	0.20	1:128	0.78	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100
3	1:2	50	1:2	50	1:1	100	1:1024	0.10	1:256	0.39	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100
4	1:4	25	1:2	50	1:1	100	1:1024	0.10	1:128	0.78	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100
5	1:2	50	1:2	50	1:1	100	1:512	0.20	1:128	0.78	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100
6	1:2	50	1:2	50	1:1	100	1:512	0.20	1:128	0.78	1:32	3.13	1:1	100	1:1	100	1:1	100
7	1:2	50	1:1	100	1:1	100	1:256	0.39	1:128	0.78	1:32	3.13	1:1	100	1:1	100	1:1	100
8	1:2	50	1:2	50	1:1	100	1:512	0.20	1:128	0.78	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100
9	1:2	50	1:1	100	1:1	100	1:1024	0.10	1:256	0.39	1:128	0.78	1:1	100	1:1	100	1:1	100
10	1:2	50	1:2	50	1:2	50	1:1024	0.10	1:128	0.78	1:128	0.78	1:1	100	1:1	100	1:1	100
11	1:2	50	1:2	50	1:2	50	1:512	0.20	1:256	0.39	1:128	0.78	1:1	100	1:1	100	1:1	100
12	1:8	12.5	1:2	50	1:1	100	1:512	0.20	1:128	0.78	1:64	1.56	1:1	100	1:1	100	1:1	100

Títulos obtenidos en la primera parte del estudio, y su transformación a valores porcentuales para su manejo estadístico

**Tabla N° 2: Resultados de la prueba de Hemaglutinación directa (HA) en los caninos evaluados.**

Canino	Hemaglutinación directa			Prueba Inmuno-cromatográfica
	Título	UAP	Interpretación	
1	1:1	100	-	-
2	1:1	100	-	-
3	1:1	100	-	-
4	1:1	100	-	-
5	1:1	100	-	-
6	1:1	100	-	-
7	1:1	100	-	-
8	1:1	100	-	-
9	1:1	100	-	-
10	1:1	100	-	-
11	1:32	3.13	+	+
12	1:1	100	-	+
13	1:32	3.13	+	+
14	1:1	100	-	+
15	1:64	1.56	+	+
16	1:1	100	-	+
17	1:128	0.78	+	+
18	1:256	0.39	+	+
19	1:32	3.13	+	+
20	1:1	100	-	+
Positivos a Parvovirus			6	10
Negativos a Parvovirus			14	10
Total			20	20

En la hemaglutinación directa (muestra de heces), un título  $\geq 1:32$  ( $\leq 3.13$ UAP) es considerado como positivo a parvovirus. Mientras que un título  $< 1:32$  ( $> 3.13$  UAP) se considera como negativo.

**Tabla N° 3: Resultados de la prueba de la Inhibición de la Hemaglutinación (HI) en los caninos evaluados.**

Canino	Inhibición de la Hemaglutinación			Prueba Inmuno-cromatográfica
	Título	UIP	Interpretación	
1	1:1	100	-	-
2	1:1	100	-	-
3	1:1	100	-	-
4	1:1	100	-	-
5	1:4	25	-	-
6	1:1	100	-	-
7	1:1	100	-	-
8	1:1	100	-	-
9	1:1	100	-	-
10	1:1	100	-	-
11	1:32	3.13	+	+
12	1:256	0.39	+	+
13	1:64	1.56	+	+
14	1:128	0.78	+	+
15	1:256	0.39	+	+
16	1:64	1.56	+	+
17	1:128	0.78	+	+
18	1:128	0.78	+	+
19	1:64	1.56	+	+
20	1:128	0.78	+	+
Positivos a Parvovirus			10	10
Negativos a Parvovirus			10	10
Total			20	20

En la inhibición de la hemaglutinación (muestras de sueros), un título  $\geq 1:8$  ( $\leq 12.5$  UIP) es considerado como positivo a parvovirus. Mientras que un título  $< 1:8$  ( $> 12.5$  UIP) se considera como negativo.

## ANEXO N° 5: Pruebas estadísticas

### 1. Pruebas de Normalidad para los Títulos Hemaglutinantes

Resumen de procesamiento de casos

	Animal	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Titulo	CANINO	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%
Porcentual	PORCINO	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%
UAP	AVE	36	100,0%	0	0,0%	36	100,0%

Descriptivos<sup>a</sup>

Animal	Estadístico	Error estándar	
Titulo Porcentual UAP	Media	63,5417	
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
	Media recortada al 5%	64,0432	
	Mediana	50,0000	
	Varianza	655,134	
	Desviación estándar	25,59558	
	Mínimo	12,50	
	Máximo	100,00	
	Rango	87,50	
	Rango intercuartil	50,00	
	Asimetría	,515	,393
	Curtosis	-,968	,768
	PORCINO	Media	,8794
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior
Media recortada al 5%		,7977	
Mediana		,7800	
Varianza		,700	
Desviación estándar		,83650	
Mínimo		,10	
Máximo		3,13	
Rango		3,03	
Rango intercuartil		1,17	
Asimetría		1,639	,393
Curtosis		2,356	,768

a. Titulo Porcentual UAP es constante cuando Animal = AVE. Se ha omitido.

Pruebas de Normalidad<sup>b</sup>

Animal	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk			
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.	
Titulo Porcentual UAP	CANINO	,396	36	,000	,706	36	,000
	PORCINO	,297	36	,000	,774	36	,000

a. Corrección de significación de Lilliefors

b. Titulo Porcentual UAP es constante cuando Animal = AVE. Se ha omitido.

## 2. Pruebas estadísticas para la concentración del 0,5%

### Pruebas NPar

Rangos			
	Animal	N	Rango promedio
Titulo Porcentual	Canino	12	18,50
	Porcino	12	6,50
	ave	12	30,50
	Total	36	

### Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>	
	Titulo Porcentual
Chi-cuadrado	33,263
gl	2
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Animal

Datos evaluados mediante el programa “IBM SPSS Statistics 22”

### Prueba de especificidad de Dunn

Depend.: Titulo UAP 0,5%	Multiple Comparisons p' values (2-tailed); Título UAP 0,5% (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: animal Kruskal-Wallis test: H (2,N= 36) =33.26275 p=.0000		
	Canino R:18.500	Porcino R: 6.5000	Ave R:30.500
Canino		0.015815	0.015815
Porcino	0.015815		0.000000
Ave	0.015815	0.000000	

Datos evaluados mediante el programa “STATISTICA”

### 3. Pruebas estadísticas para la concentración del 1,0%

#### Pruebas NPar

Rangos			
	Animal	N	Rango promedio
Titulo Porcentual	Canino	12	19,50
	Porcino	12	6,50
	ave	12	29,50
	Total	36	

#### Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>	
	Titulo Porcentual
Chi-cuadrado	31,802
gl	2
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Animal

Datos evaluados mediante el programa “IBM SPSS Statistics 22”

#### Prueba de especificidad de Dunn

Depend.: Titulo UAP 1,0%	Multiple Comparisons p' values (2-tailed); Título UAP 1,0% (Spreadsheet2) Independent (grouping) variable: animal Kruskal-Wallis test: H (2,N= 36) =31.80188 p=.0000		
	Canino R:19.500	Porcino R: 6.5000	Ave R:29.500
Canino		0.007522	0.060223
Porcino	0.007522		0.000000
Ave	0.060223	0.000000	

Datos evaluados mediante el programa “STATISTICA”

#### 4. Pruebas estadísticas para la concentración del 2,0%

##### Pruebas NPar

Rangos			
	Animal	N	Rango promedio
Titulo Porcentual	Canino	12	23,00
	Porcino	12	6,50
	ave	12	26,00
	Total	36	

##### Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>	
	Titulo Porcentual
Chi-cuadrado	29,956
gl	2
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Animal

Datos evaluados mediante el programa “IBM SPSS Statistics 22”

##### Prueba de especificidad de Dunn

Depend.: Titulo UAP 2,0%	Multiple Comparisons p' values (2-tailed); Título UAP 2,0% (Spreadsheet3) Independent (grouping) variable: animal Kruskal-Wallis test: H (2,N= 36) =29.95633 p=.0000		
	Canino R:23.000	Porcino R: 6.5000	Ave R:26.000
Canino		0.000375	1.000000
Porcino	0.000375		0.000017
Ave	1.000000	0.000017	

Datos evaluados mediante el programa “STATISTICA”

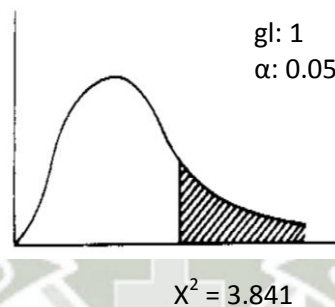
## 5. Prueba de McNemar para los datos de la Hemaglutinación Directa

### 1. Planteamiento de hipótesis

Ho: No existe diferencia entre la aplicación de la prueba IC y la prueba de HA

Hi: Existe diferencia entre la aplicación de la prueba IC y la prueba de HA

### 2. Nivel de significancia



### 3. Cuadro de Datos

Antes	Después		Total
	+ (Enfermos)	- (Sanos)	
+ (Enfermos)	6 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	10
- (Sanos)	0 <sup>c</sup>	10 <sup>d</sup>	10
Total			20

### 4. Herramienta Estadística

$$Mc = \frac{(|b - c| - 0.5)^2}{b + c}$$

$$Mc = 2.25$$

### 5. Toma de decisión:

$$Mc = 2.25 < 3.84 \text{ (} p > 0.05 \text{)}$$

Se acepta la Ho

### 6. Interpretación:

Con una probabilidad del 95%, la aplicación de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Hemaglutinación directa, son iguales.

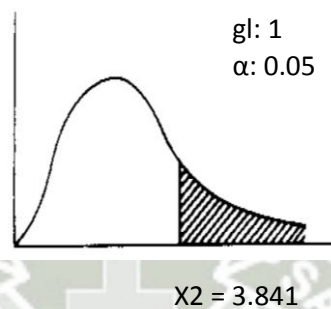
## 6. Prueba de McNemar para los datos de la Inhibición de la Hemaglutinación.

### 1. Planteamiento de hipótesis

Ho: No existe diferencia entre la aplicación de la prueba IC y la prueba de HI

Hi: Existe diferencia entre la aplicación de la prueba IC y la prueba de HI

### 2. Nivel de significancia



### 3. Cuadro de Datos

Antes	Después		Total
	+ (Enfermos)	- (Sanos)	
+ (Enfermos)	10 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	10
- (Sanos)	0 <sup>c</sup>	10 <sup>d</sup>	10
Total			20

### 4. Herramienta Estadística

$$Mc = \frac{(|b - c| - 0.5)^2}{b + c}$$

$$Mc = 0.00$$

### 5. Toma de decisión:

$$Mc = 0.00 < 3.84 \quad (p > 0.05)$$

Se acepta la Ho

### 6. Interpretación:

Con una probabilidad del 95%, la aplicación de la prueba de Inmunocromatografía y la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación, son iguales.

## 7. Análisis de la Hemaglutinación Directa y la INHIBICIÓN de la Hemaglutinación mediante la prueba de Chi cuadrado

### PRUEBA DE JI CUADRADO

Tipo de estudio: Transversal

Nivel de confianza: 95.0%

Tabla	Prueba		Total
	Heces	Suero	
Positivo	6	10	16
Negativo	14	10	24
Total	20	20	40

Prueba Ji-cuadrado de Independencia	Estadístico	Valor p
Sin corrección	1.6667	0.1967
Corrección de Yates	0.9375	0.3329

Datos evaluados mediante el programa "EPIDAT - Análisis epidemiológico de datos tabulados"

ANEXO N° 6: Fotografías

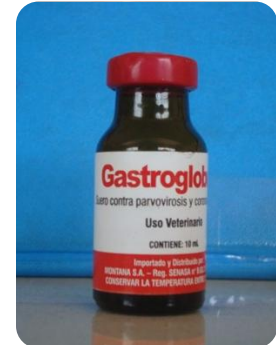
1. Reactivos



Vacuna Biocan P de laboratorios Bioveta a. s. Republica Checa



Antisuero contra parvovirus canino, fabricado en el laboratorio veterinario del Dr. Fernández.



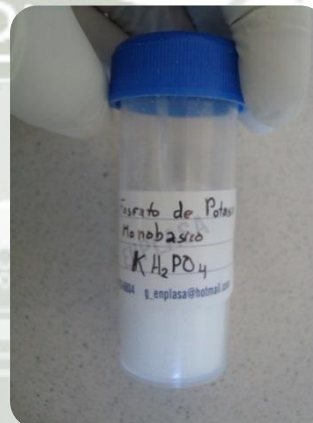
Antisuero Gastroglobulin de laboratorios Vencofarma de Brasil.



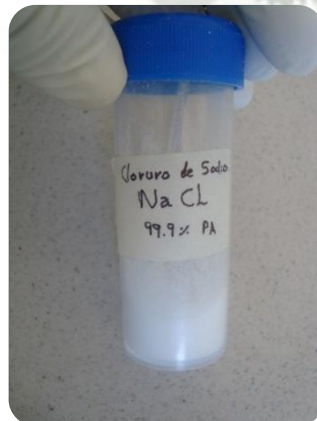
Frasco de Caolín 2.5 kg de laboratorios Merck



Frasco con Ácido Clorhídrico al 37%



Salas para la fabricación de buffer PBS

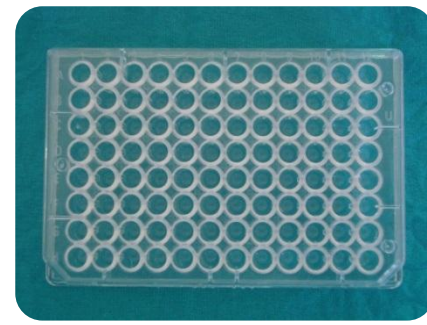


Reactivos para la fabricación de la solución de Alsever.

## 2. Materiales



Prueba Inmunocromatográfica para la detección rápida de parvovirus canino.



Microplaca de titulación de 96 pozas de fondo en U



Micropipetas automáticas simples: 5 - 50uL (abajo) y 100-1000uL (arriba)



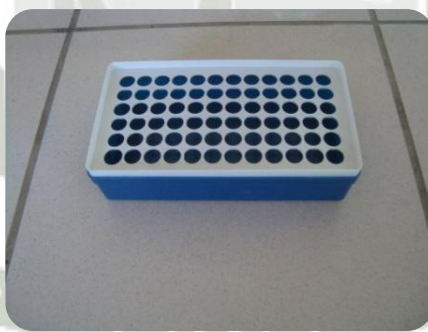
Puntas (tips) para micropipeta de 50uL



Puntas (tips) para micropipeta de 1000uL



Tubos de microcentrifugación



Gradilla (rag) para tubos de microcentrifugacion.



Tubo de ensayo, Termometro y bageta.



Tijera, Pinza, Encendedor.



Frasco de vidrio.

### 3. Equipos de laboratorio



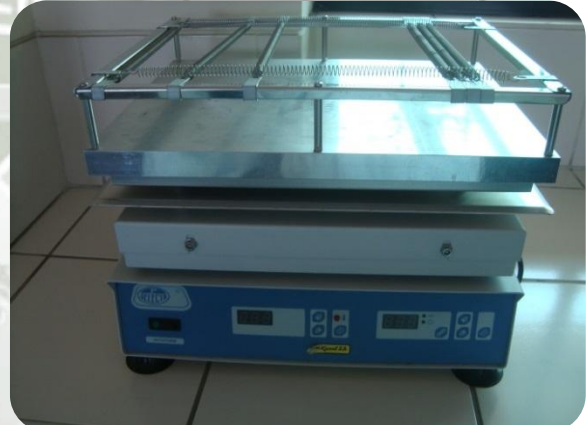
Autoclave



Balanza



Centrifugadora



Homogenizador de placas



Baño María o termostato.



Cámara de Luz UV

#### 4. Caninos evaluados

##### Caninos Negativos a Parvovirus

Canino 1  
Nombre: Chikis  
Raza: Pequinés  
Edad: 18 meses  
Sexo: macho



Canino 6  
Nombre: Negra  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 18 meses  
Sexo: hembra



Canino 2  
Nombre: Pelusa  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 12 meses  
Sexo: hembra



Canino 7  
Nombre: Negrito  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 12 meses  
Sexo: macho



Canino 3  
Nombre: Canela  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 24 meses  
Sexo: hembra



Canino 8  
Nombre: Manus  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 8 meses  
Sexo: hembra



Canino 4  
Nombre: Coquito  
Raza: Teckel  
Edad: 4 meses  
Sexo: macho



Canino 9  
Nombre: Vetén  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 24 meses  
Sexo: macho



Canino 5  
Nombre: Rubi  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 5 meses  
Sexo: hembra



Canino 10  
Nombre: Puka  
Raza: Sin raza  
definida  
Edad: 6 meses  
Sexo: hembra



### Caninos Positivos a Parvovirus

Canino: 11  
Nombre: Doki  
Raza: Perro sin pelo  
Edad: 4 meses  
Sexo: macho



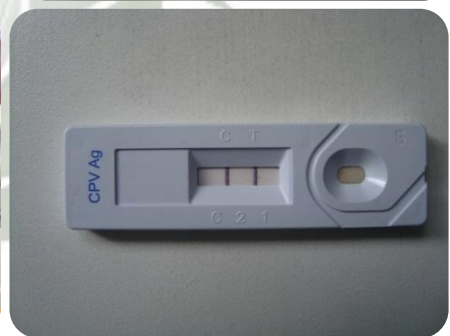
Canino 12  
Nombre: Jack  
Raza: Sin raza definida  
Edad: 4 meses  
Sexo: macho



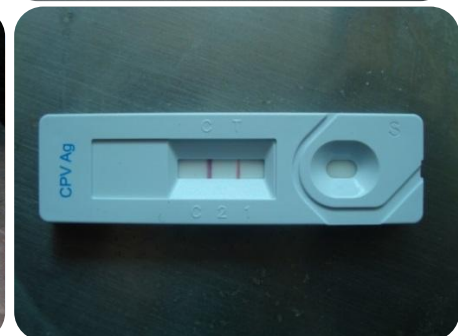
Canino 13  
Nombre: Spok  
Raza: Sin raza definida  
Edad: 3 meses  
Sexo: macho



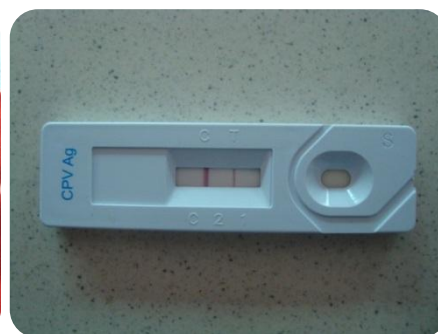
Canino 14  
Nombre: Beker  
Raza: Perro sin pelo  
Edad: 3 meses  
Sexo: Macho



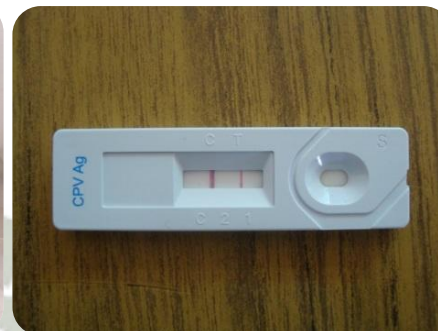
Canino 15  
Nombre: Dieguito  
Raza: Cocker spaniel  
Edad: 6 meses  
Sexo: Macho



Canino 16  
Nombre: Alex  
Raza: Schnauzer  
Edad: 3 meses  
Sexo: Macho



Canino 17  
Nombre: Thor  
Raza: Rottweiler  
Edad: 4 meses  
Sexo: macho



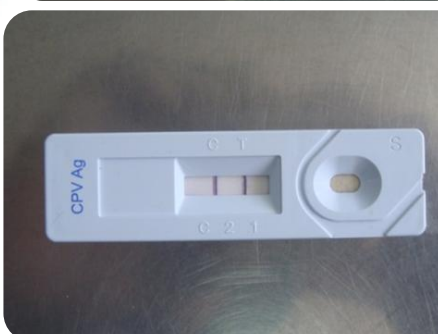
Canino 18  
Nombre: Cafecita  
Raza: Sharpey  
Edad: 4 meses  
Sexo: Hembra



Canino 19  
Nombre: Amarilla  
Raza: Sharpey  
Edad: 4 meses  
Sexo: macho

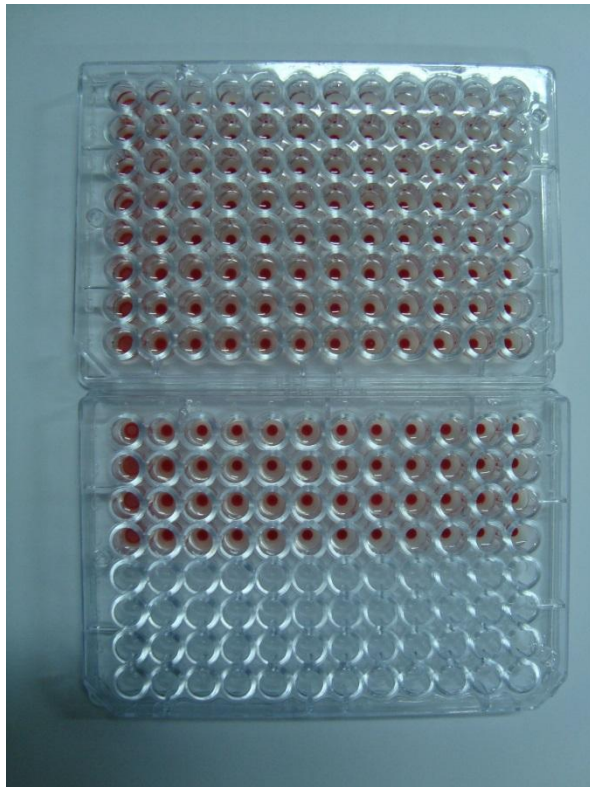


Canino 20  
Nombre: Ginko  
Raza: Schnauzer  
Edad: 7 meses  
Sexo: macho





Fotografías



Muestras  
sanguineas

Muestras  
sanguineas

Esquemas

Dilución: 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096

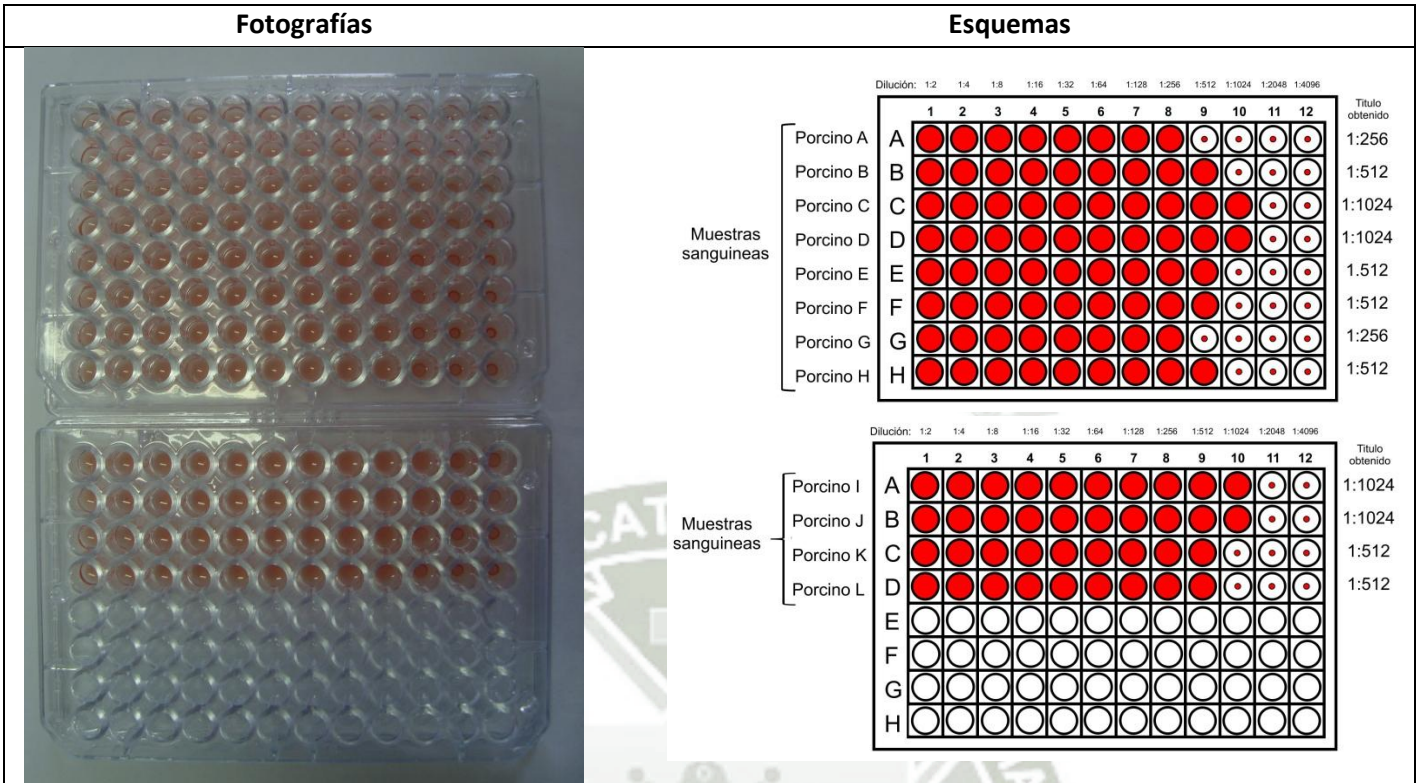
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Título obtenido
Canino A	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:2
Canino B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1

Dilución: 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096

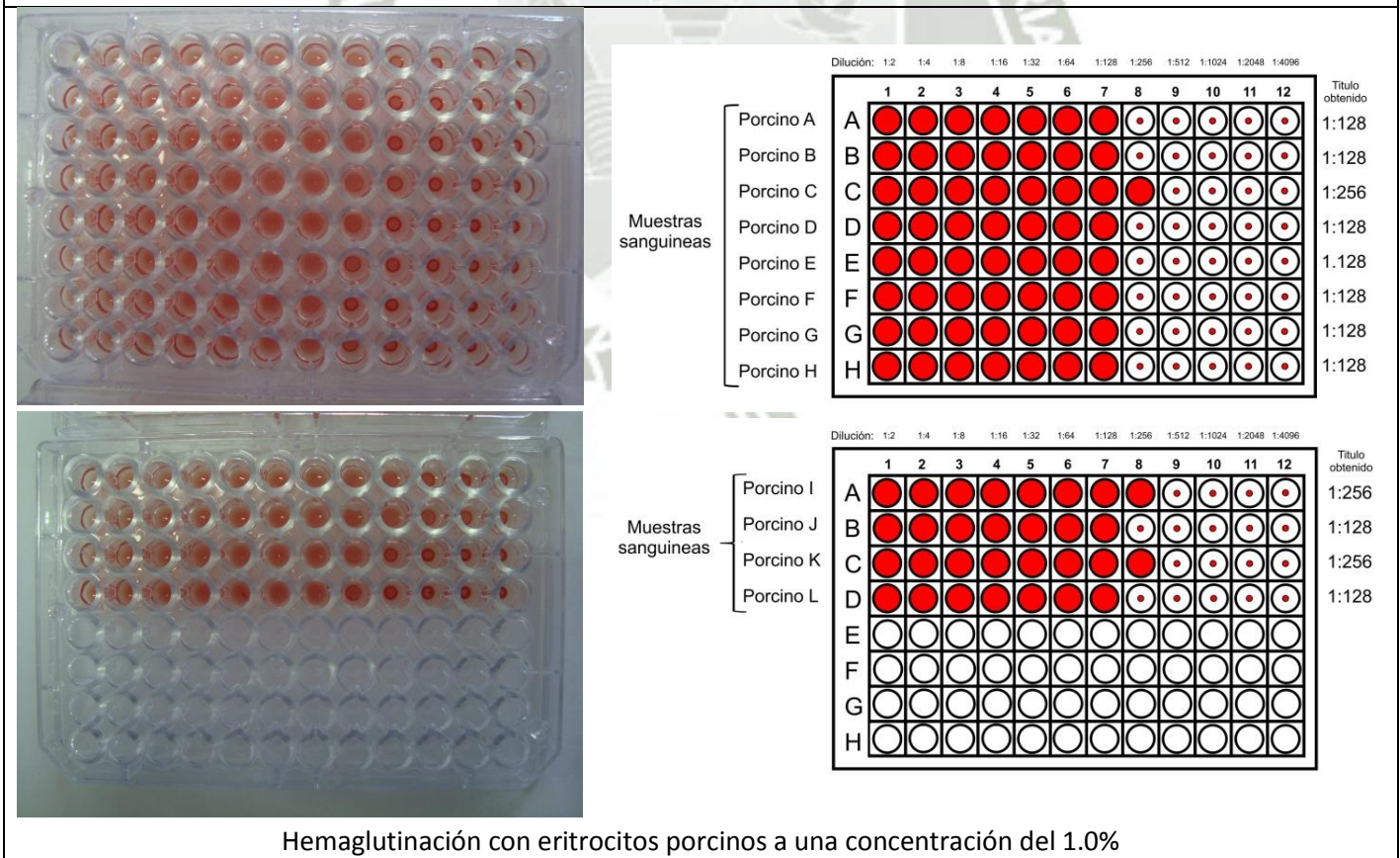
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Título obtenido
Canino I	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
Canino J	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:2
Canino K	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:2
Canino L	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1:1
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

Hemaglutinación con eritrocitos caninos a una concentración del 2,0%

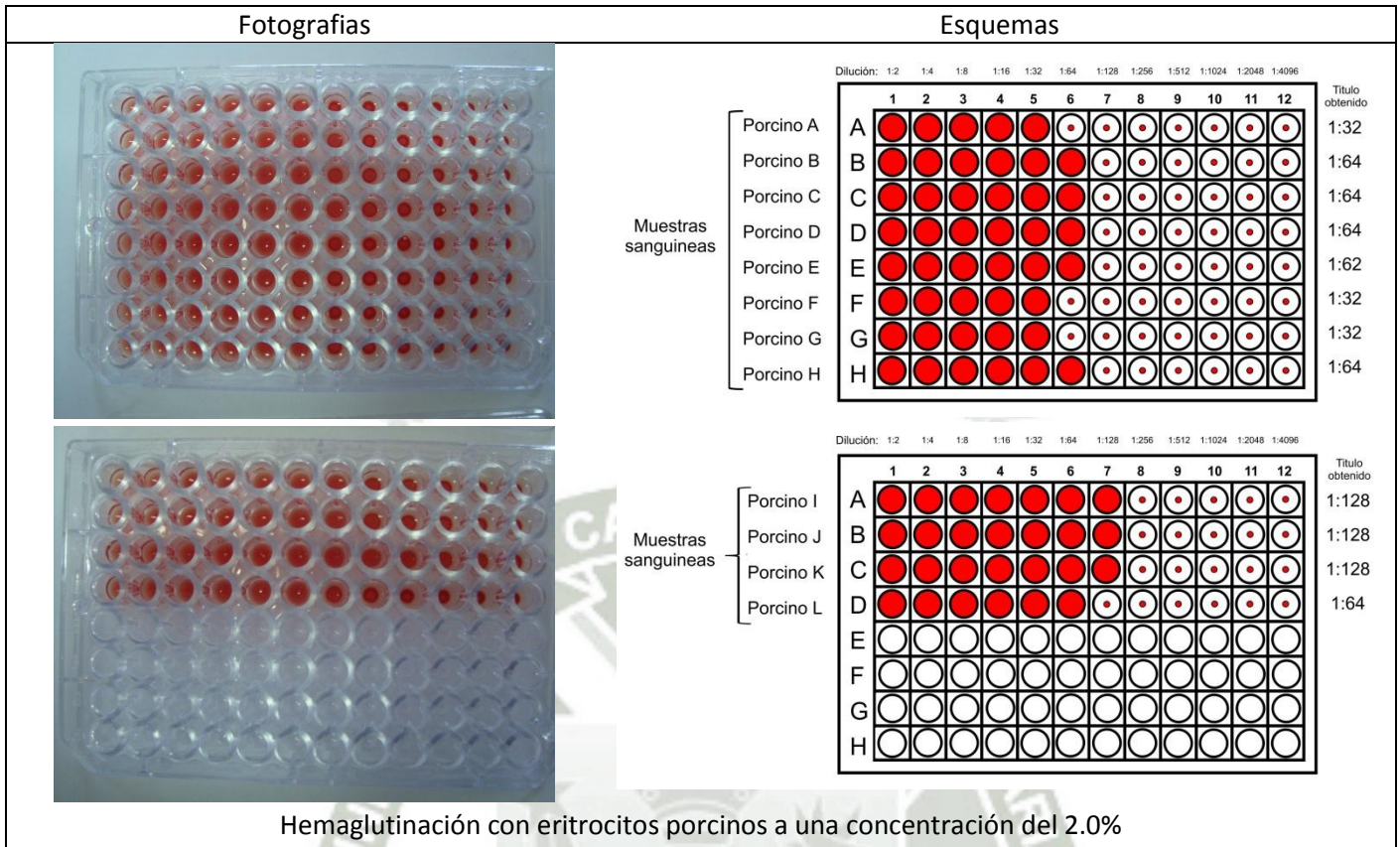
**b. Resultados de la Hemaglutinación con eritrocitos porcinos**



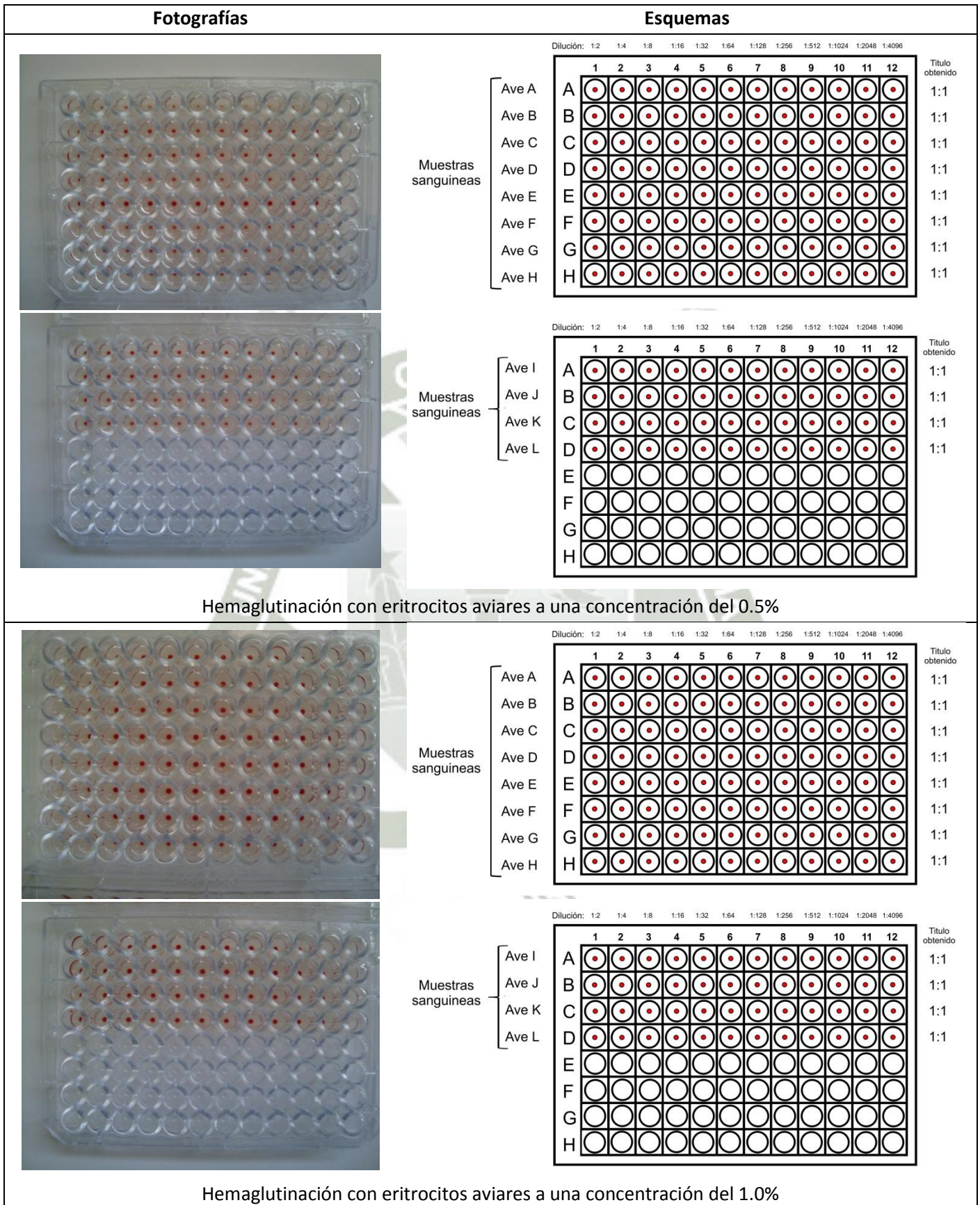
Hemaglutinación con eritrocitos porcinos a una concentración del 0.5%



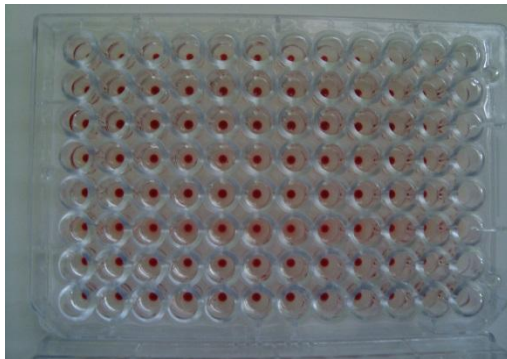
Hemaglutinación con eritrocitos porcinos a una concentración del 1.0%



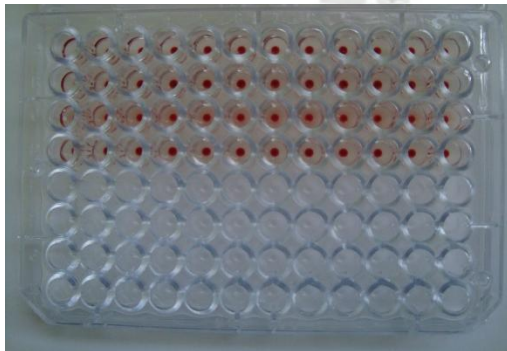
**C. Resultados de la Hemaglutinación con eritrocitos aviares.**



Fotografías



Muestras  
sanguíneas



Muestras  
sanguíneas

Esquemas

Dilución: 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Título obtenido
Ave A	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave B	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave C	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave D	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave E	E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave F	F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave G	G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave H	H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1

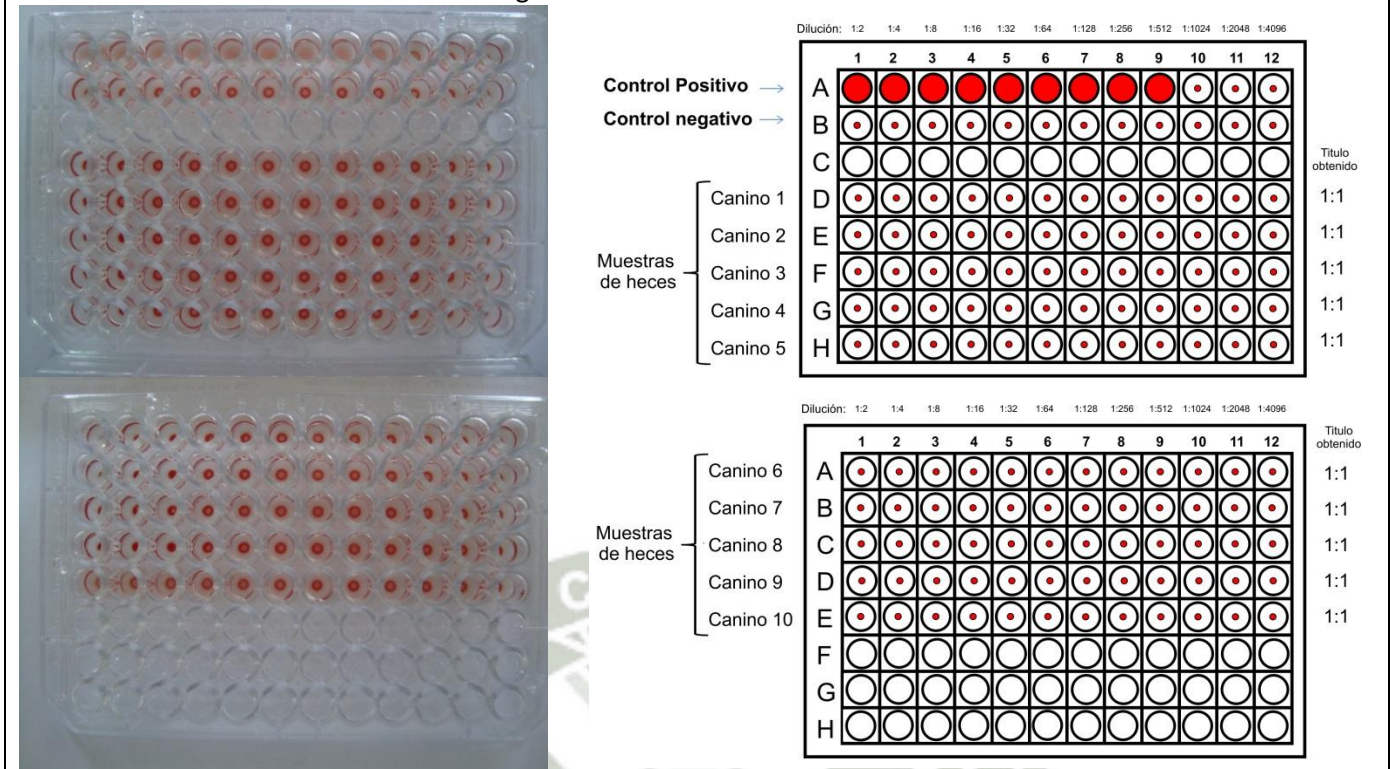
Dilución: 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 1:128 1:256 1:512 1:1024 1:2048 1:4096

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Título obtenido
Ave I	A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave J	B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave K	C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
Ave L	D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	1:1
	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

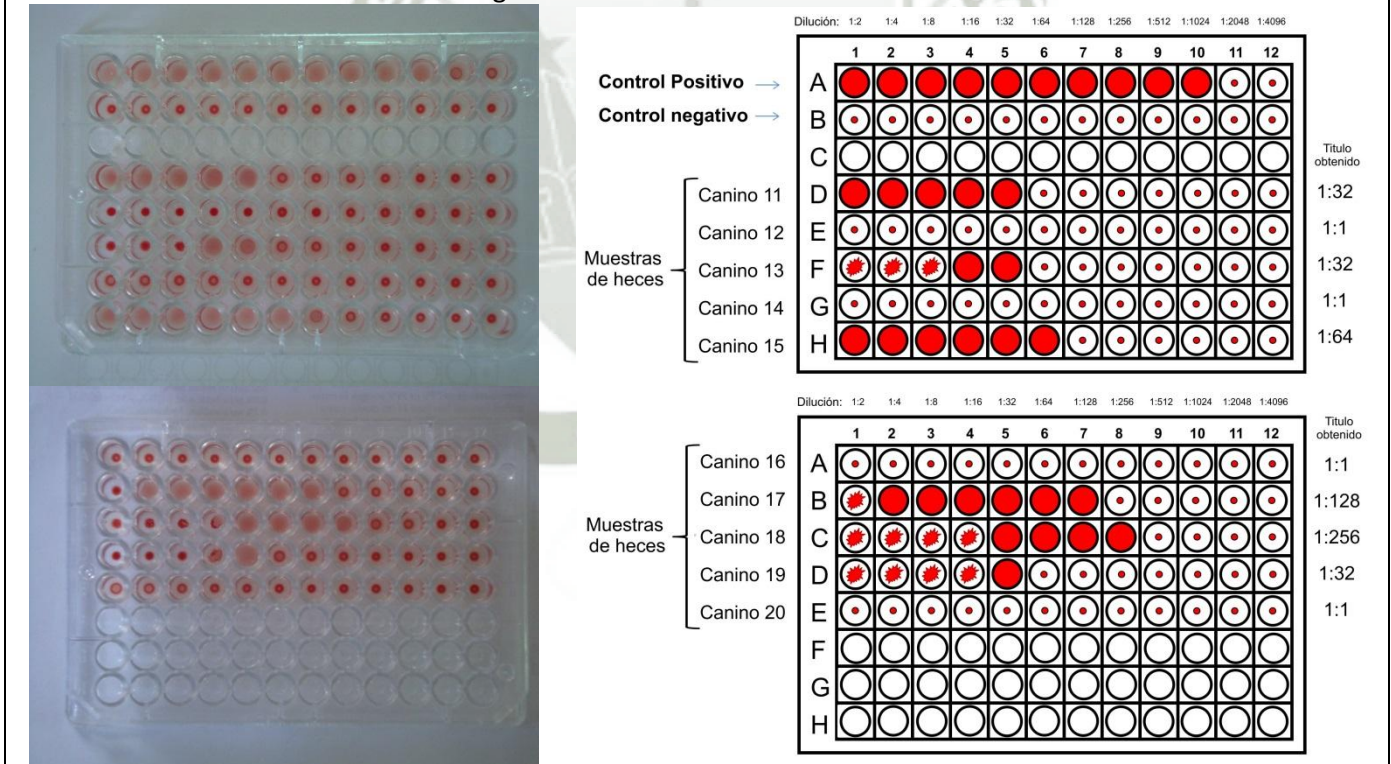
Hemaglutinación con eritrocitos aviares a una concentración del 2.0%

**d. Resultados de la prueba de Hemaglutinación en los caninos evaluados.**

**Hemaglutinación Directa en caninos sanos**



**Hemaglutinación Directa en caninos enfermos**



**INTERPRETACIÓN:**



**Hemaglutinacion positiva**



**Hemaglutinacion negativa**

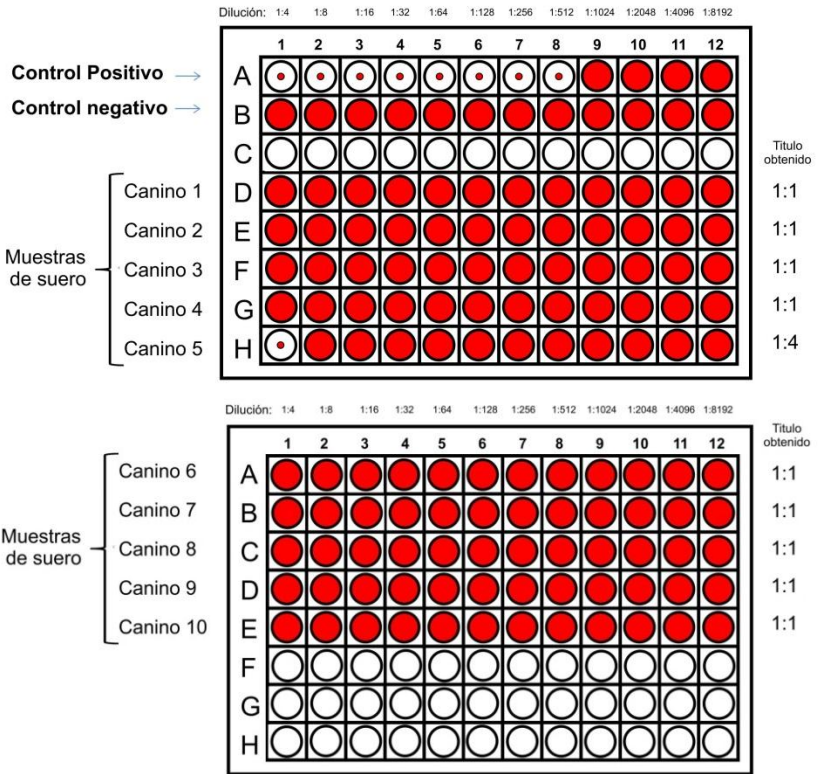


**Interrupcion de la Hemaglutinacion**

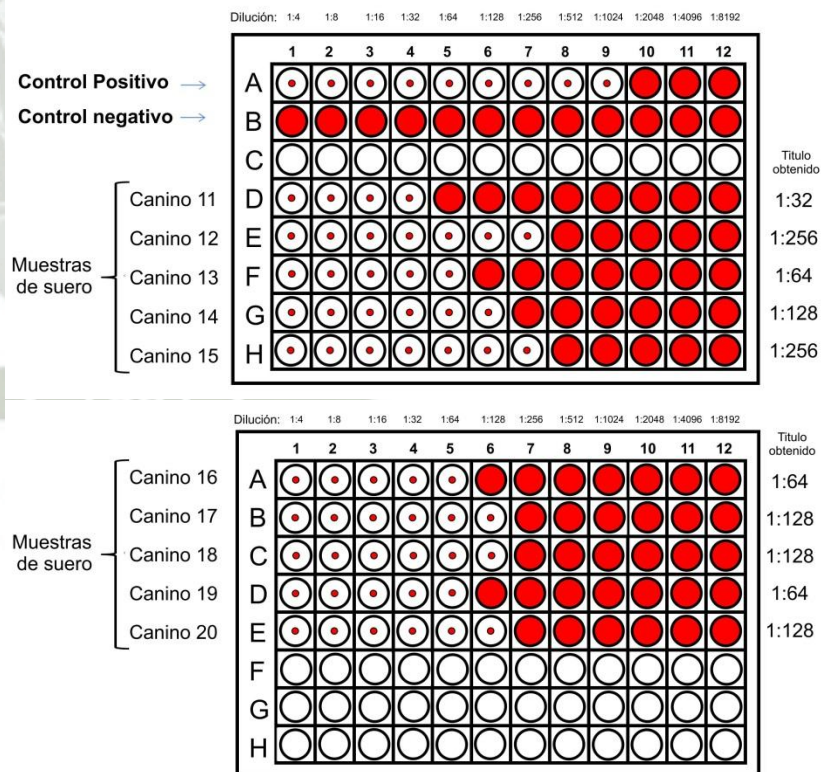
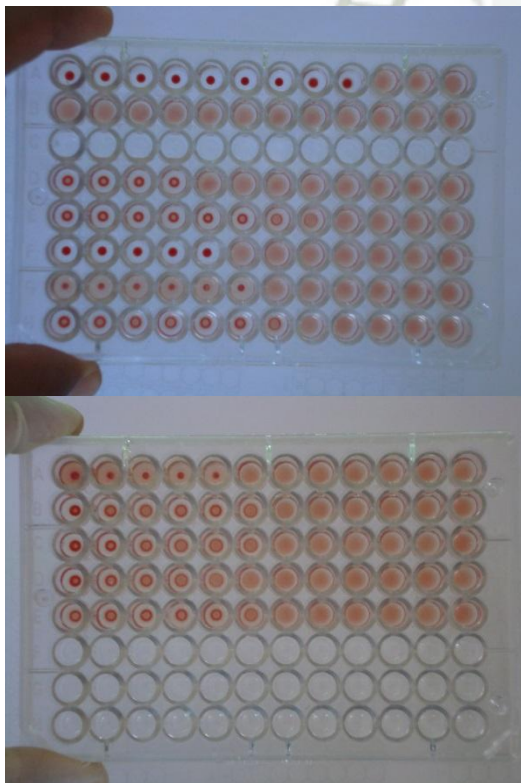
En la muestras de los caninos 13, 17, 18 y 19 se puede observar la interrupcion de la hemaglutinación, esto se debe a la presencia de inhibidores (contaminantes) en las heces que interfieren con la reaccion de HA, por lo cual puede ser necesario ademas de la centrifugacion de las heces su tratamiento con sustancias purificantes o filtracion. Para obtener un aislado mas purificado del virus. Un titulo  $\geq 1:32$  es considerado como especifico para parvovirus canino.

**e. Resultados de la prueba de inhibición de la Hemaglutinación en los caninos evaluados.**

Inhibición de la Hemaglutinación en caninos sanos



Inhibición de la Hemaglutinación en caninos enfermos



**INTERPRETACIÓN:**



Inhibición de la Hemaglutinación positiva

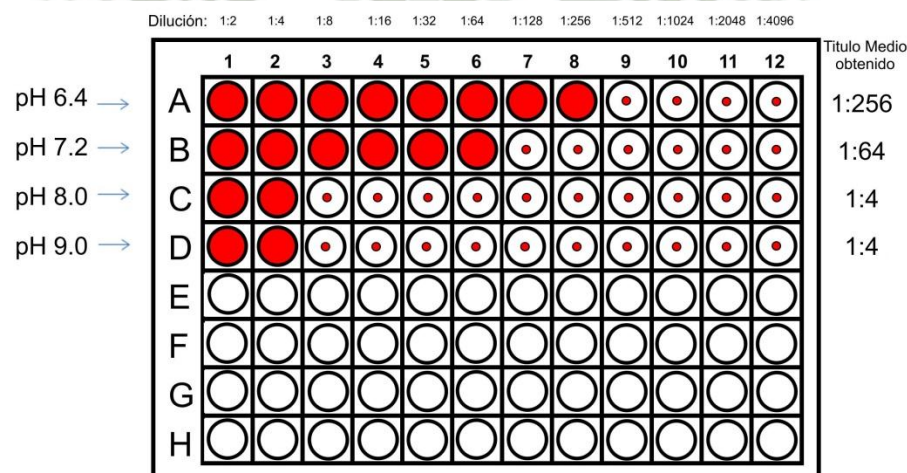


Inhibición de la Hemaglutinación negativa

En la inhibición de la hemaglutinación un título  $\geq 1:8$  es considerado positivo

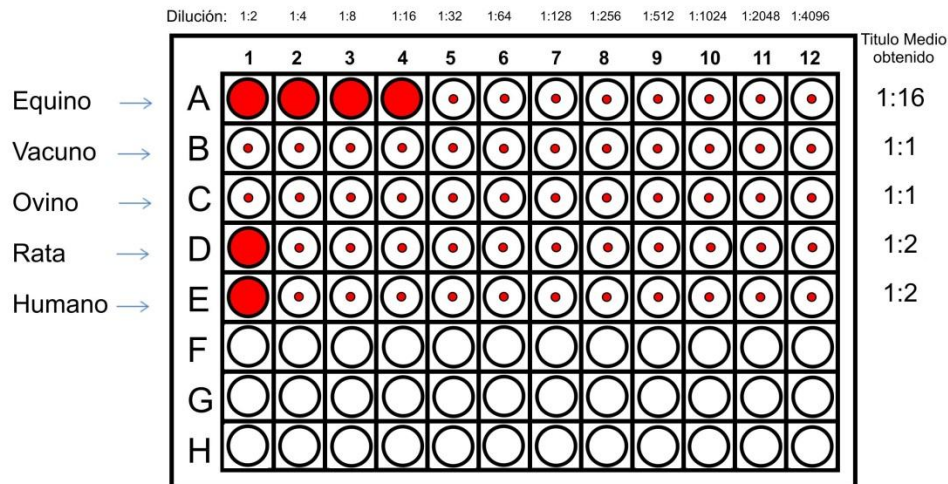
## ANEXO N° 7: Anotaciones

1. Durante los ensayos se observó que los títulos comienzan a ser visibles a partir de 1 hora de incubación y son legibles ya hacia las 2 horas de incubación, pero en el caso de las muestras evaluadas se prefirió esperar un tiempo de incubación de 4 horas, para poder realizar la lectura clara la reacción.
2. Previo a la experimentación, el parvovirus canino también fue evaluado a diferentes pH, observándose que su mayor actividad se daba cuando actuaba a pH 6,4 alcanzando un título medio de 1:256. Esta actividad disminuía a medida que se elevaba el pH. Siendo en promedio 1:64 a pH de 7,2, y 1:4 a pH de 8 o 9. Todas evaluaciones se realizaron a una concentración del 1% de eritrocitos en Alsever.

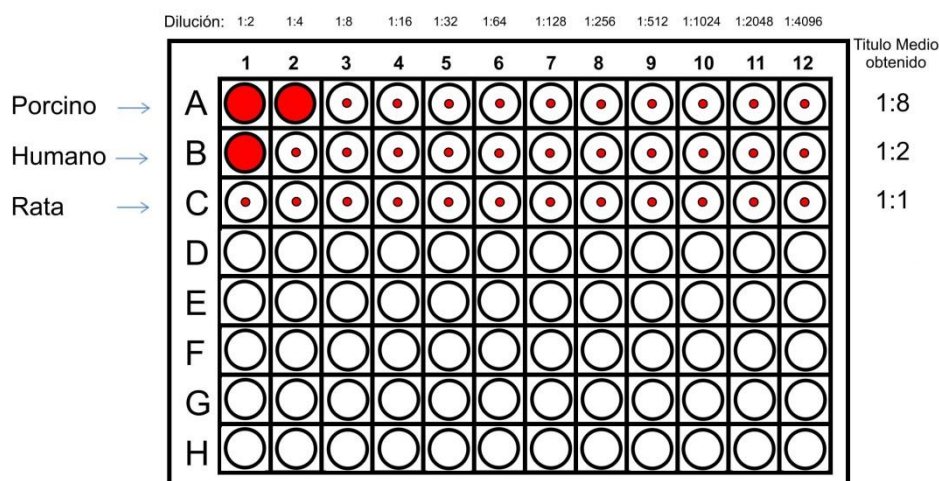


3. Haciendo uso de la técnica de HI se evaluó también muestras de suero de seres humanos, encontrándose un título nulo de anticuerpos contra parvovirus canino, en forma similar a lo reportado por otros autores (Mogollón *et al*, 1981; Biberstein y Zee, 1994; Gómez y Guida, 2010), lo cual refuerza la teoría de que los humanos parecen ser refractarios a la infección por parvovirus canino, condición por la cual el suero humano podría ser utilizado como control negativo.

4. Además de las sangres evaluadas en el estudio, se hizo algunos ensayos con sangres de otras especies (equino, vacuno, ovino, rata y humano). Con estas sangres preparadas al 1% en Alsever, frente al parvovirus canino y a un pH de 6.4, se obtuvo los siguientes títulos promedio:



5. Además del uso de la técnica de HA para el diagnóstico de parvovirus canina, se trabajó también con antígeno de morbillivirus canino (distemper) enfrentándolo con diversos tipos de sangre (porcino, humano y rata), a la concentración del 1% y un pH de 6.4, se obtuvo los siguientes títulos:



6. Se aplicó la técnica de Hemoadsorción - Elución - Hemaglutinación (HEMA), para el aislamiento y titulación de coronavirus canino a partir de la vacuna parvo-corona. Haciendo uso de sangre de ratas albinas (*Rattus norvegicus*), pudo aislarse y titularse el coronavirus. Con esto se comprobó que el HEMA puede ser una técnica muy útil para la diferenciación de coronavirus del parvovirus. Además el extracto de coronavirus se enfrentó a sangre de porcino, humano y rata, preparadas al 1% y a un pH del 7.2, encontrándose los siguientes títulos:

