

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Respuesta inmune humoral frente a virus de importancia veterinaria en
perros inmunizados durante la esterilización quirúrgica**

Por

Lucía KUSTER MOULIÁ

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Medicina Veterinaria

Modalidad: Ensayo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2023

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Agustina Algorta

Segundo miembro:



Rodrigo Puentes

Tercer miembro:



Natalie Ruiz

Cuarto miembro:

Laureana De Brun



Autor: Lucía Kuster

Fecha: 22 /12/2023

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rodrigo Puentes por apoyarme en la elaboración de éste trabajo, por dedicar tanto tiempo, contagiarme su pasión por la investigación y simplemente por creer que esto era posible.

A la Dra. Laureana De Brun por su ayuda incondicional en la elaboración de esta tesis.

A los laboratorios privados por proporcionar las vacunas para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Fernando Fumagali por desinteresadamente acompañarnos con este proyecto y proporcionarnos sus conocimientos en la realización de las cirugías para que podamos realizar el trabajo.

A toda la Secretaría de Estado de Salud (Instituto Pasteur) de San Pablo. Especialmente a la Dra. Helena Ruthner Batista-Área de Biología Molecular a la Dra. Andrea de Cassia da Silva (Jefe de la sección de diagnóstico), a la Dra. Graciane Caporale, Dra. Luciana Botelho, Dra. Juliana Ferreira, Dra. Eliane de Almeida y todo el Instituto Pasteur de San Pablo por su interés y apoyo en este trabajo.

A todos los integrantes del refugio "OBA" de la ciudad de Durazno que nos abrieron las puertas para la realización de la investigación.

A todos los animales que participaron.

A nuestros amigos y familiares que acompañaron nuestros esfuerzos durante tanto tiempo y nos apoyaron enérgicamente en este proceso.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
IMPORTANCIA DE LA INMUNIZACIONES EN PEQUEÑOS ANIMALES.....	12
TIPOS DE VACUNAS.....	13
ENFERMEDADES VIRALES.....	15
RABIA.....	15
DISTERPER CANINO.....	19
PARVOVIROSIS.....	26
RESPUESTA INMUNE	30
INTERFERENCIA DE LA CIRUGÍA SOBRE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE.....	32
HIPÓTESIS	36
OBJETIVOS	36

MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.

FIGURAS:

Figura 1. ImmunoComb Canine Vaccicheck, BiogalGaled Laboratories Acs. Ltd, escalacolorimétrica.....
.....37

Figura 2. Título de anticuerpos antirrábicos por grupo durante el ensayo.....41

Figura 3. Detección de anticuerpos contra parvovirus canino mediante kit comercial Elisa modificado (ImmunoComb Canine Vaccicheck, BiogalLaboratoriesAcs.Ltd.....42

Figura 4. Detección de anticuerpos contra distemper canino mediante kit comercial Elisa modificado (ImmunoCombCanineVaccicheck, BiogalLaboratoriesAcs.Ltd.....43

TABLAS:

Tabla 1. Resumen de datos de grupo control y grupo de estudio a través del tiempo.

Comparación de la respuesta inmune entre el grupo esterilizado y no esterilizado para el Parvovirus y Distemper canino.....41

RESUMEN

En Uruguay la vacunación en caninos se realiza parcialmente poniendo en riesgo la protección de todos los animales susceptibles a las infecciones virales, lo que implica un potencial riesgo para la Salud Pública. Se vacuna a determinadas poblaciones de animales limitándose a los que reciben atención veterinaria periódicamente. A su vez las revacunaciones en los animales muchas veces no se realizan o se realizan tardíamente. Si observamos las diferentes situaciones podemos inferir que podrían no ser suficientes los caninos que llegan a ser vacunados adecuadamente para lograr una “protección de rebaño” adecuada. Por otro lado, no existen controles oficiales sobre el status inmunitario de la población canina vacunada. Las infecciones víricas son muy contagiosas y tienen una tasa de mortalidad elevada, siendo las vacunas la medida de control más importante. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar la viabilidad de que se puedan vacunar los caninos durante la cirugía realizada en las campañas de esterilización masiva. Partiendo de la base de que la cirugía genera estrés para los animales, es necesario comprobar si ese estrés es suficientemente alto como para disminuir la calidad de la respuesta inmune en los animales vacunados durante el acto quirúrgico. Para esto se inmunizaron dos grupos de animales (esterilizados y no esterilizados) para Parvovirus, Distemper canino y Rabia con la primera dosis (día 0) aplicada durante el acto quirúrgico y la segunda a los 30 días posteriores. Se determinó la respuesta inmune humoral para Parvovirus y el virus de Distemper canino mediante kit comercial de ELISA modificado y para el virus de la rabia, mediante la técnica *Rapid fluorescent focus inhibition test* (RFFIT) en colaboración con el Instituto Pasteur de São Paulo. Los resultados mostraron que todos los animales que fueron inmunizados durante la esterilización quirúrgica generaron al día 30 y al día 60, un título de anticuerpos mayor a 0.5UI/ml (nivel mínimo de protección) específicos contra la rabia. Para parvovirus y distemper se obtuvo una diferencia significativa entre el día 0 y 60 en su respuesta inmunitaria a la vacuna. Según los resultados obtenidos, la primovacunación no se vio afectada por el acto quirúrgico, pudiendo asumir que para aumentar la cobertura vacunal poblacional se puede realizar la inmunización durante las cirugías.

SUMMARY

In Uruguay, vaccination of dogs is carried out, jeopardizing the protection of all animals susceptible to viral infections, which implies a potential risk to Public Health. Only certain populations of animals are vaccinated, limited to those that receive regular veterinary care. Also, revaccinations are often not carried out or are carried out late. Analyzing the different situations, we can argue that few dogs could be adequately vaccinated. On the other hand, there are no official controls on the immune status of the vaccinated canine population. Viral infections are highly contagious and have a high mortality rate; vaccinations are the most important control measure. This thesis aimed to evaluate the feasibility of vaccinating dogs during surgeries carried out in mass sterilization campaigns. Since surgery generates stress in the animals, it is necessary to check whether it is high enough to reduce the immune response in vaccinated animals during surgery. For this, two groups of animals (sterilized and non-sterilized) were immunized against Parvovirus, distemper, and rabies, with the first dose (day 0) applied during the surgical procedure and the second 30 days later. The humoral immune response to Parvovirus and canine Distemper virus was determined using a commercial modified ELISA kit and using the Rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) technique in collaboration with the Pasteur Institute in Sao Paulo, the rabies virus was quantified. The results indicated that all the immunized animals during surgical sterilization were generated at day 30 and day 60, with an antibody titer greater than 0.5UI/ml (minimum level of protection), the same as the control group (without sterilization) for rabies. For parvovirus and distemper, a significant difference was obtained between days 0 and 60 in their immune response to the vaccine. According to the results obtained, immunization was not affected by the surgical act, and we can conclude that immunization can be performed during surgery to increase population vaccination coverage.

INTRODUCCIÓN

Los animales históricamente han formado parte de la vida humana, comprendiendo un papel fundamental en el bienestar del mismo, aportando desde su compañía hasta ser una fuente de alimento. El perro como animal de compañía es considerado hoy día en nuestra sociedad parte de la familia y se encuentra en estrecho contacto con las mismas estando expuestos ambos a diversos agentes infecciosos (Walsh et al. 2009).

Teniendo en cuenta que en Uruguay la vacunación en caninos se realiza parcialmente, por no ser obligatoria, se pone en riesgo la protección de todos los animales susceptibles a enfermedades, implicando en algunos casos un potencial riesgo para la Salud Pública (Moreno, J., Burghi, N., Piaggio, J., y Puentes, R. 2012).

En nuestro país, la vacunación en perros se limita muchas veces sólo a aquellos que reciben atención veterinaria periódicamente (Franco y Puentes, 2020). En la mayor parte de los planes de vacunación, la vacuna contra rabia es la última que el animal recibe cuando es cachorro, y en muchos casos al no completarse el plan de vacunación, la misma se omite. A su vez las revacunaciones muchas veces no se realizan o se realizan tardíamente. Si observamos las diferentes situaciones, podemos inferir que muchos caninos podrían no recibir el plan de vacunación adecuado a lo largo de su vida, según las recomendaciones internacionales (Moreno, et al, 2012). Por otro lado, no existen controles oficiales sobre el status inmunitario de la población canina vacunada, de forma que no se conoce si los animales vacunados, están protegidos de una posible exposición a patógenos de interés o si son necesarias revacunaciones para garantizar esa protección.

El riesgo de contagio en los caninos es posible y son muchos los factores que pueden influir para que los animales no presenten un nivel adecuado de protección tras la vacunación. Esto puede deberse a la calidad de las vacunas y su capacidad inmunogénica, la forma de conservación de las mismas, la correcta administración, el estado de sanidad del animal, estado nutricional o si se aplican durante una cirugía con el consecuente estrés inmunológico que causan los procedimientos quirúrgicos (Angele y Faist, 2002; Reese et al. 2008). Por lo tanto, del punto de vista sanitario, esta situación debe ser abordada de forma integral, considerando todos estos

aspectos como influyentes en una respuesta inmune adecuada (Moreno et al., 2012). Evaluando la posibilidad de vacunar durante la esterilización quirúrgica y si la respuesta inmune es suficiente.

Las infecciones víricas son muy contagiosas y tienen una tasa de mortalidad elevada siendo las vacunas la medida de control más importante. El parvovirus canino (CPV) y el virus Distemper canino (CDV) son los agentes responsables de las principales infecciones virales en canes domésticos (Casabone, 2015)

La rabia es una enfermedad causada por el virus rabia (RABV). Este es un virus neurotrópico ARN, de cadena negativa perteneciente al género *Lyssavirus* (familia *Rhabdoviridae*). RABV es la especie tipo de este género y es el responsable de la mayoría de los casos en humanos y animales (Fooks et al., 2014).

El virus del Distemper canino pertenece al género *Morbillivirus*, familia *Paramyxoviridae*. Es un virus envuelto, pleomórfico, con un diámetro aproximado entre 150 – 300 nm y contiene un genoma de ARN de cadena negativa no segmentada que se encuentra empaquetado por la proteína de la nucleocápside (Martella et al. 2011). Es el agente causal de una enfermedad sistémica grave. Se localiza en tejido epitelial, por lo cual el animal puede manifestar signos respiratorios, intestinales y dermatológicos, frecuentemente agravados por infecciones bacterianas secundarias. Es una enfermedad de gran letalidad, siendo la inmunización a través de la vacunación sistemática, la única medida profiláctica eficaz para su control. Aunque igualmente se han producido brotes ocasionales de la enfermedad aun en animales vacunados (Feijóo., 2020).

El parvovirus canino (CPV) es un virus de ADN monocatenario, uno de los más importantes que afectan a los perros (Nandi S, Chidri, Kuma, ChauhanRs, 2010). El CPV se encuentra en todo el mundo y los signos de infección pueden ser leves o causar gastroenteritis grave, leucopenia, deshidratación, letargo y muerte (Goddard y Leisewitz, 2010). La vacunación contra el CPV se realiza de forma rutinaria y es el método más efectivo para controlar la enfermedad (Altman et al., 2017; Nandi et al., 2013), pero siguen ocurriendo casos con frecuencia (Filipov et al., 2016). Los fracasos de la vacunación están bien reconocidos en la literatura y el momento inadecuado de la vacunación puede aumentar el riesgo de exposición a la enfermedad (Altman., Kelman y Ward, 2017).

En investigaciones previas realizadas en un muestreo reducido en el departamento de Montevideo, se encontró que apenas el 36% de perros vacunados contra la rabia tenían niveles de anticuerpos considerados protectores para esta enfermedad (Moreno et al. 2012) y resultados preliminares de otro estudio del mismo grupo, indicaron que puede ser viable lograr niveles de protección contra la rabia si son inmunizados durante una cirugía como la esterilización (Puentes et al. 2016). En cuanto a la parvovirus, estudios previos examinaron los efectos de varias vacunas disponibles sobre las respuestas inmunitarias siguiendo las respuestas blastogénicas de los linfocitos y las respuestas de anticuerpos humorales en perros antes y después de las cirugías y se determinó que los títulos séricos contra el parvovirus canino (CPV) aumentaron al doble o más en 17 de 20 perros estudiados y muchos perros tuvieron un aumento en el día 7 (Miyamoto et al 1995). En este sentido, la presente propuesta tiene como principal objetivo, evaluar la inmunogenicidad de una vacuna polivalente comercial, aplicada durante la cirugía realizada para la esterilización en caninos. Este objetivo se centra en la posibilidad de que en un futuro se pudiera aprovechar el acto quirúrgico en las campañas de esterilización masiva, para lograr inmunizar a los animales. Esto permitiría una mayor cobertura vacunal y por ende una mayor inmunidad de rebaño en la población susceptible. Partiendo del conocimiento existente desde hace mucho tiempo que las cirugías generan cierto grado de estrés para los animales (Miyamoto et al., 1995), es necesario comprobar si ese estrés es suficientemente alto como para disminuir la calidad de la respuesta inmune en los animales vacunados durante la esterilización quirúrgica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1-IMPORTANCIA DE LA INMUNIZACIONES EN PEQUEÑOS ANIMALES

La vacunación en animales de compañía ha sido una de las verdaderas historias de éxito de la medicina veterinaria, siendo una de las mayores contribuciones a la mejora de la salud de las mascotas (Iturbe et al., 2017). Juega un papel importante en la reducción de las tasas de mortalidad, la prevención de casos clínicos y el control de la propagación de los virus. Sin embargo, la eficacia de la vacunación puede verse afectada por diferentes factores, incluida la programación de la vacuna y la neutralización de la vacuna por los anticuerpos maternos (Vila et al., 2018). Experimentos demuestran que, bajo ciertas condiciones, es posible superar los anticuerpos de la madre y para inducir a un protocolo de vacunación a pesar de la edad de los animales y la presencia de los mismos (Chappuis, 1998). La respuesta del animal a la vacuna depende de muchos factores como la calidad de las vacunas y su capacidad inmunogénica, la forma de conservación de las mismas, la correcta administración, el estado de sanidad del animal, estado nutricional o si se aplican durante una cirugía con el consecuente estrés inmunológico que causan los procedimientos quirúrgicos (Angele y Faist, 2002; Reese et al. 2008). Las vacunas pueden ser divididas en esenciales y opcionales. Las esenciales son aquellas vacunas que previenen enfermedades de distribución mundial potencialmente mortales y deben ser administradas a todos los animales independientemente de las circunstancias o situación geográfica a intervalos recomendados. Las vacunas esenciales para caninos protegen frente a la infección por Parvovirus Canino tipo 2 (CPV-2), Virus de Distemper Canino (CDV) y Adenovirus Canino tipo 1 (CAV-1). En nuestro país la mayoría de las vacunas se comercializan de forma multivalente, dificultando la diferenciación entre vacunas esenciales y opcionales en el momento de la administración. Por otro parte, no se conoce a ciencia cierta la incidencia y/o prevalencia de la mayoría de los agentes infecciosos presentes en las poblaciones caninas y felinas de Uruguay (Franco y Puentes, 2020)

Las infecciones víricas son muy contagiosas y tienen una tasa de mortalidad elevada siendo las vacunas la medida de control más importante. Teniendo en cuenta que en Uruguay la vacunación en caninos se realiza parcialmente, por no ser obligatoria, se pone en riesgo la protección de todos

los animales susceptibles a enfermedades, implicando en algunos casos un potencial riesgo para la Salud Pública (Moreno et al, 2012). En nuestro país, la vacunación en perros se limita muchas veces sólo a aquellos que reciben atención veterinaria periódicamente (Franco y Puentes, 2020). En la mayor parte de los planes de vacunación, la vacuna contra rabia es la última que el animal recibe cuando es cachorro, y en muchos casos al no completarse el plan de vacunación, la misma se omite. A su vez las revacunaciones muchas veces no se realizan o se realizan tardíamente. Si observamos las diferentes situaciones, podemos inferir que muchos caninos podrían no recibir el plan de vacunación adecuado a lo largo de su vida, según las recomendaciones internacionales (Moreno et al, 2012). En investigaciones previas realizadas en el departamento de Montevideo, se encontró que apenas el 36% de perros vacunados contra la rabia tenían niveles de anticuerpos considerados protectores para esta enfermedad y resultados preliminares de otro estudio del mismo grupo, indicaron que puede ser viable lograr niveles de protección contra la rabia durante una cirugía como la esterilización (Puentes et al. 2016).

En el caso del virus del moquillo canino (VMC) y el parvovirus canino (CPV) provocan infecciones con altas tasas de mortalidad en perros, siendo virus que afectan a perros no vacunados o perros con protocolos de vacunación incompletos o inadecuados (Vila et al., 2018) La vacunación contra el CPV se realiza de forma rutinaria y es el método más efectivo para controlar la enfermedad (Altman et al., 2017; Nandi et al., 2013). Los fracasos de la vacunación están bien reconocidos en la literatura y el momento inadecuado de la vacunación puede aumentar el riesgo de exposición a la enfermedad (Altman, Kelman y Ward, 2017). La administración de una vacuna en un animal implica necesariamente un gasto energético para que se establezca una respuesta inmune satisfactoria. Por tanto, para que esta respuesta generada sea eficiente y robusta, siempre es ideal que el animal a ser vacunado se encuentre en buen estado de salud. Sin embargo, frente a situaciones de riesgo de contraer alguna enfermedad infecciosa prevenible por vacunación, se debe poner en la balanza los beneficios de adelantar la vacunación del animal, aún en situaciones consideradas “sub óptimas” de salud (Franco y Puentes, 2020). O si se aplican durante una cirugía con el consecuente estrés inmunológico que causan los procedimientos quirúrgicos (Angele y Faist, 2002; Reese y col., 2008).

2-TIPOS DE VACUNAS

Las vacunas se pueden dividir en infecciosas y no infecciosas. La mayoría de las vacunas utilizadas en los animales de compañía contienen organismos atenuados, es decir en estado infeccioso pero con su virulencia reducida (“modifiedlive virus” - MLV o vacunas vivas atenuadas). Los patógenos se encuentran intactos y viables, estimulan la inmunidad induciendo una infección de bajo nivel al replicarse en el animal sin producir una patología tisular significativa o signos clínicos de enfermedad infecciosa. Las vacunas infecciosas presentan la ventaja de inducir una inmunidad más efectiva en sitios anatómicos importantes cuando son administradas de forma parenteral, y producen una inmunidad celular y humoral más robusta. Algunas vacunas infecciosas se presentan para ser administradas en las mucosas directamente (intranasales u orales) y por lo tanto, son más efectivas en Veterinaria (Day et al., 2016; Flores, 2007). Sin embargo, estas vacunas son menos estables, por lo que deben mantenerse estrictamente a temperaturas entre 2 y 8 °C y una vez reconstituidas debe evitarse su exposición a agentes químicos que puedan inactivarlas. Estas vacunas se presentan usualmente en el mercado en forma liofilizada, debiendo usarse en un periodo no mayor a una hora después de su reconstitución (Welborn et al., 2011).

Las vacunas no infecciosas (también llamadas vacunas muertas o inactivadas), contienen un organismo inactivado, pero antigénicamente intacto, o un antígeno natural o sintético derivado de ese organismo. Los organismos no infecciosos no son capaces de infectar, replicarse o inducir signos clínicos de enfermedad infecciosa. Generalmente para estimular una respuesta protectora requieren de múltiples dosis (incluso en animales adultos) y el uso de adyuvantes para aumentar su potencia. Estas vacunas se administran de forma parenteral y es menos probable que estimulen eficientemente ambas vías de la respuesta inmune, o sea la inmunidad humoral y celular. Generalmente la protección generada es de menor duración comparándola con la inducida por las vacunas infecciosas (Day et al., 2016; Flores, 2007). Los adyuvantes comprenden una variedad de sustancias químicas que estimulan una reacción inflamatoria que determinará una mejor respuesta inmune al antígeno vaccinal. Si bien el hecho de que los microorganismos en vacunas muertas no pueden recuperar su virulencia, de allí que se les considere más seguras, los residuos de adyuvantes en ellas utilizados pueden permanecer en las áreas de vacunación en la mascota y ser responsables de reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad (Welborn et al., 2011)

La protección contra la infección natural durante las primeras semanas de vida está dada por la transferencia pasiva de inmunoglobulinas, posteriormente esa protección puede ser obtenida mediante la utilización de vacunas que posean una adecuada capacidad inmunogénica y generen una combinación de respuesta inmunológica humoral y celular (Hass et al. 2008; Franco y Puentes, 2020).

3-ENFERMEDADES VIRALES

3.1 RABIA

La rabia es una enfermedad zoonótica viral que causa una inflamación progresiva y fatal del cerebro y la médula espinal. Clínicamente, tiene dos formas: Rabia furiosa: caracterizada por hiperactividad y alucinaciones. Rabia paralítica: caracterizada por parálisis y coma (OMSA, 2018). El virus rabia (RABV) es un virus neurotrópico ARN, de cadena negativa perteneciente al género *Lyssavirus* (de Lisa, deidad griega que representaba la ira frenética), familia *Rhabdoviridae* (Fooks et al., 2014). Los lisavirus son patógenos neurotrópicos esenciales (Fookset al., 2017).

La rabia humana transmitida por perros puede eliminarse atacando la enfermedad en su origen: los perros infectados. Concientizar a las personas sobre cómo evitar las mordeduras de perros rabiosos, buscar tratamiento cuando son mordidos y vacunar a los animales, puede interrumpir con éxito el ciclo de transmisión de la rabia. Se estima que la rabia causa 59000 muertes humanas al año en más de 150 países, con el 95% de los casos en África y Asia. Debido al subregistro y las estimaciones inciertas, es probable que este número sea una subestimación grave. La carga de morbilidad la soportan de manera desproporcionada las poblaciones rurales pobres, y aproximadamente la mitad de los casos son atribuibles a niños menores de 15 años (WorldHealthOrganization, 2022). Aunque es fatal una vez que aparecen los signos clínicos, la rabia es completamente evitable. Las vacunas, los medicamentos y las tecnologías han estado disponibles durante mucho tiempo para prevenir la muerte por rabia. Sin embargo, la rabia todavía mata a decenas de miles de personas cada año. De estos casos, aproximadamente el 99% se adquieren por la mordedura de un perro infectado (WorldHealthOrganization, 2022).

Transmisión de la enfermedad

La transmisión se produce con el contacto del virus (generalmente a través de saliva) con piel no indemne y mucosas o menos frecuentemente por el tracto respiratorio. En el sitio de inoculación, el virus presenta una baja tasa de replicación a nivel de las células musculares y posteriormente afecta a los husos neuromusculares y el nervio que inerva el huso. Si el inóculo es alto o hay inoculación directamente sobre el nervio, la infección llegará a las placas terminales motoras sin una replicación previa en el músculo, lo que puede explicar la variabilidad en el tiempo de incubación de la enfermedad. Desde el sitio de inoculación el virus se propaga de forma centrípeta por los nervios periféricos hacia el sistema nervioso central (SNC), donde prolifera y comienza la propagación centrífuga, nuevamente por nervios periféricos hacia otros tejidos (entre ellos, glándulas salivales). El virus de la rabia no es viable fuera del huésped y puede ser inactivado por la luz del sol, el calor y la desecación. (Singh, Rupprecht, Bleck, 2015)

La infección en las personas suele producirse por la mordedura o el arañazo profundo de un animal infectado, y la transmisión por perros rabiosos es la fuente de hasta el 99% de los casos humanos. En América, los murciélagos son la principal fuente de infección en los casos mortales de rabia, puesto que la transmisión al ser humano por mordedura de perros rabiosos se ha interrumpido casi por completo. La rabia del murciélago se ha convertido recientemente en una amenaza para la salud pública en Australia y Europa Occidental. Los casos mortales en humanos por contacto con zorros, mapaches, mofetas, chacales, mangostas y otros huéspedes carnívoros salvajes infectados son muy raros, y no hay casos conocidos de transmisión a través de mordeduras de roedores. También puede haber transmisión al ser humano por contacto directo con mucosas o heridas cutáneas recientes con material infeccioso, generalmente saliva. Aunque es muy raro, también se puede contraer la enfermedad por trasplante de órganos infectados o inhalación de aerosoles que contengan el virus. La transmisión de persona a persona por mordeduras o saliva es teóricamente posible, pero nunca se ha confirmado; lo mismo ocurre con la ingestión de carne cruda o de otros tejidos de animales infectados (WorldHealthOrganization, 2022).

Signos y síntomas

La infección clínica por el virus de la rabia se divide en forma clásica en tres etapas principales: prodrómica, furiosa y paralítica (Lackay, Kuang y Fu, 2008). La fase prodrómica en perros dura por lo general de 2 a 3 días y se observa aprensión, nerviosismo, ansiedad, aislamiento y fiebre variable. Hay dilatación pupilar con o sin pesadez palpebral o reflejos corneales (Green y Dreesen, 1993). En la etapa furiosa los perros se muestran con un cambio de conducta: se esconden en rincones oscuros o muestran una agitación inusitada y dan vueltas intranquilos. En la fase paralítica se observa parálisis de los nervios motores posteriores que suele progresar del sitio de la herida hasta afectar todo el SNC (Green y Dreesen, 1993).

Situación en Uruguay

El último caso de rabia humana en Uruguay fue en 1966 y el último caso de rabia canina ocurrió en 1983 en Rocha (OPS, 2005). En octubre de 2007, luego de 25 años sin registros de rabia en el país, se reintroduce la rabia por la frontera brasilera con un brote o epizootia de rabia paralítica que afectó a bovinos, equinos, ovinos y suinos con más de 300 casos hasta 2014 en los departamentos de Rivera, Tacuarembó, Artigas y Cerro Largo, vinculados a murciélagos hematófagos (Ministerio de Salud Pública Uruguay, 2017, Guarino et al,2013). Posteriormente en el departamento de Rivera, en el año 2008 se hizo el primer diagnóstico de Rabia en murciélagos no hematófagos. Por su comportamiento migratorio y sinantrópico, es probable que éstos lleguen a estar en contacto con perros (González, Briano, y Guarino, 2009).

Actualmente asistimos a una situación epidemiológica compleja con la reintroducción de la rabia animal vinculada a murciélagos. La Comisión Nacional Honoraria de Zoonosis (CNHZ) del Ministerio de Salud Pública (MSP) informó el hallazgo de un murciélago infectado con el virus de la rabia en el centro de Montevideo. Este hallazgo se da en el marco de la vigilancia de la rabia que desarrollan de forma permanente y conjunta el MSP y el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Ya habían sido detectados dos casos antes en Paysandú, por lo que es el tercero desde noviembre del año pasado a hoy en el país. La actual situación es de riesgo para las personas y mascotas que entran en contacto con murciélagos, porque el virus mantiene un ciclo aéreo en estos animales insectívoros de nuestro país.(MSP, 2023)

Situación en la región

En las Américas la rabia humana transmitida por perros se encuentra en vías de eliminación, pero aún se registran casos en Bolivia, Haití, Guatemala, Brasil y República Dominicana. Además, desde 2014 se han registrado casos de rabia canina en áreas de Argentina, Paraguay, Brasil y Perú, en zonas declaradas sin rabia canina desde hace más de diez años, lo que llevó a una alerta epidemiológica en junio de 2015 por parte de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la salud (OPS/OMS, 2015; Castilho et al., 2017). El Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires junto al Ministerio de Salud de la Nación de Argentina informó en mayo de 2021 un caso confirmado de rabia humana. Argentina no presentaba casos de rabia humana desde 2008, sin embargo registraba casos en murciélagos todos los años en varias provincias incluida la de Buenos Aires (MSP, 2021).

Diagnóstico

La observación clínica como máximo puede conducir a la sospecha de rabia, porque los signos de la enfermedad no son característicos y pueden variar mucho de un animal a otro. El único modo de llevar a cabo un diagnóstico fiable de la rabia es identificar el virus o alguno de sus componentes específicos mediante pruebas de laboratorio. La prueba más utilizada en el diagnóstico de la rabia es la FAT, que recomiendan tanto la OMS como la OIE. Esta prueba de referencia puede utilizarse directamente sobre un frotis de impresión y también para confirmar la presencia del antígeno de la rabia en cultivo celular o en tejido encefálico de ratones que se hayan inoculado con fines de diagnóstico. La FAT es muy sensible y específica (96–99%), y otorga resultados fiables en muestras frescas en menos de 2 horas. La sensibilidad de la FAT depende de la muestra, del grado de autólisis (McElhinney et al., 2014) y del tipo de muestra (Barrat y Aubert, 1995). Otro método diagnóstico es el aislamiento viral, utilizando células de neuroblastoma o la inoculación intracraneal de ratones con saliva del animal infectado. En pacientes que presentan anticuerpos positivos la sensibilidad es muy baja, en seronegativos oscila entre 50%-60%. Anticuerpos neutralizantes en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). En cuanto a la biología molecular por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se trata de una técnica rápida y con adecuada sensibilidad y especificidad en biopsia y saliva (sensibilidad 60%-100%). Sin embargo presenta muy baja sensibilidad en LCR. (Frantchez. V y Medina. J , 2018)

Tratamiento

En cuanto al tratamiento, la administración eficaz de inmunoglobulinas poco después de la exposición (en los días siguientes, y cuanto antes mejor), puede prevenir la aparición de síntomas y la muerte. La prevención postexposición consiste en el tratamiento local de la herida, la administración de inmunoglobulina antirrábica (si está indicada) y la vacunación inmediata (Johnson, N., Cunningham, A.F., y Fooks, A.R., 2010)

Pronóstico y mortalidad

La rabia es rápidamente progresiva y la muerte ocurre generalmente en los primeros tres días de hospitalización (cinco a siete días luego del inicio de los síntomas) o con una media de supervivencia de 18 días en aquellos pacientes que reciben cuidados intensivos. Dado el mal pronóstico de estos pacientes, el tratamiento es sintomático. De todas formas se aconseja realizar la profilaxis post exposición con vacuna e inmunoglobulina contra la rabia, ya que los escasos sobrevivientes a la enfermedad la recibieron. Se han intentado varios protocolos de tratamientos sin éxito (Jackson 2016).

Vacunas

La vacunación es la estrategia de control más importante para interrumpir la circulación del virus en la población canina (OPS, 2005). Muchas vacunas eficaces contra la rabia canina se encuentran disponibles y la observación empírica y de modelos de transmisión de la rabia indican que puede ser erradicada si el 70% de la población de perros fue vacunada varias veces (Coleman y Die, 1996; Kayali et al., 2003). La recomendación establecida en los años ochenta por el Programa Regional para la Eliminación de la Rabia era vacunar a 80% de la población canina estimada (OPS, 2005). Para la vacunación de animales contra la rabia, se utilizan vacunas de virus inactivados (en el caso de los animales de compañía y del ganado), de virus atenuados vivos (en el caso de la fauna salvaje y de los perros vagabundos) o vacunas recombinantes (para fauna salvaje, perros y gatos). Virus rábico inactivado cepa Pasteur VP 12 al menos 1 U.I. Las vacunas deben proporcionar una protección inmunitaria durante al menos 1 año. La potencia, la eficacia y la inocuidad de las vacunas se establecen y controlan mediante pruebas que se hayan formuladas a partir de una farmacopea reconocida (OMSA, 2018).

3.2 DISTEMPER CANINO

El virus del distemper canino (CDV) pertenece al género *Morbilivirus*, familia *Paramixoviridae*, junto con otros virus causantes de enfermedades en mamíferos (Barret, 1999). Presenta envoltura, contiene una molécula de ARN de hebra simple de sentido negativo y de aproximadamente 15 Kb, el cual está asociado a una nucleoproteína (NP), siendo el gen que codifica esta proteína un blanco idóneo para el diagnóstico del virus mediante métodos moleculares, particularmente la RT PCR (Frisk et al., 1999; Jozwik y Frymus, 2002).

Transmisión de la enfermedad

El virus ingresa al huésped por la ruta nasal u oral e inicia la replicación mediante la activación de la señalización de linfocitos por el receptor de la molécula (SLAM/CD150), que se expresa en las superficies de las células inmunes, como los macrófagos alveolares y/o las células dendríticas del tracto respiratorio. Las células del sistema inmune circulante infectadas diseminan el virus por todo el sistema linfático entre 3 y 6 días post infección, seguido de una diseminación posterior al epitelio de tejidos aproximadamente 10 días después de la infección (Freitas, Leme, Saporiti, Alfieri y Alfieri, 2018).

Es una enfermedad de alta morbilidad y mortalidad variable, endémica en el mundo entero, siendo susceptibles a la infección natural la mayoría de los carnívoros terrestres y en particular los miembros de las familias canidae (perro, perro salvaje, perro australiano, zorro, coyote, lobo y chacal, entre otros) y mustelidae (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armiño, marta y nutria, entre otros). Tiene la característica de ser altamente contagiosa, afectando básicamente a cachorros menores a un año, quienes constituyen el grupo etario de mayor susceptibilidad, aunque no están exentos de padecerla caninos en cualquier etapa de su vida. Los animales infectados eliminan el virus a través de sus secreciones corporales desde el séptimo día post infección, aún aquellos que no presentan signos clínicos. El virus es lábil y poco resistente a las condiciones del medio ambiente (Green y Appel, 1998).

Signos y síntomas

La infección puede resultar en una variedad de formas clínicas, dependiendo de la edad al momento de la infección, del estado inmunológico del huésped y de la virulencia de la cepa

(Krakowka y Koestner, 1976). Los sistemas afectados son el respiratorio, el gastrointestinal, el tegumentario y el nervioso, además causa inmunosupresión y es perdurable en el tiempo, favoreciendo así infecciones secundarias (Lempp et al. 2014, Summers y Appel, 1994). La edad parece ser un factor de importancia en la incidencia, ya que los animales más susceptibles son aquellos que presentan entre 3 y 6 meses de edad. En este sentido, el continuo nacimiento de cachorros en los centros urbanos proporciona de manera constante individuos susceptibles. Este fenómeno parece no presentarse en centros con baja densidad poblacional, donde en general enferman animales de todas las edades (Green y Appel, 1998).

Existe gran variación en cuanto a la severidad y la duración de la enfermedad clínica, aproximadamente el 50% de los perros infectados desarrollan enfermedad subclínica o muy leve (Appel, 1970). Los signos varían desde no detectables, hasta la presentación de un cuadro severo, con o sin compromiso nervioso y un 50% de mortalidad (Appel, 1970). El desarrollo de fiebre bifásica representa un hallazgo clínico característico (Wright, N., Cornwell, A.,Thomspson, H., y Lauder, I., 1974). El primer aumento de la temperatura ocurre entre 3 y 6 días post infección y puede pasar desapercibido, mientras que el segundo pico aparece varios días después y se caracteriza por hipertermia generalmente continúa seguida por la aparición de signos respiratorios y/o gastrointestinales.

Situación en uruguay

En Uruguay, existen estudios epidemiológicos de la enfermedad entre los años 1992-2005 en el Hospital de la Facultad de Veterinaria. Se realizaron con el fin de observar la incidencia de la enfermedad. Se analizaron un total de 799 casos con diagnóstico de Distemper canino. Los signos clínicos que predominaron en un 57,17% de los casos, fueron los signos neurológicos. En cuanto a su distribución anual se encontró mayor frecuencia en el segundo semestre. Los animales que mayoritariamente enfermaron tenían menos de 12 meses, sin embargo todas las edades fueron afectadas por el virus. Del total de animales estudiados, 73 de ellos estaban 12 vacunados y 31 en plan de vacunación, e igualmente enfermaron (Feijóo et al., 2009).

El genoma del ARN del CDV tiene una alta variabilidad genética, evidenciada por varios linajes que siguen un patrón geográfico global. Las trayectorias evolutivas y la dinámica poblacional de los linajes de CDV aún no están claras y son discutibles, particularmente en América del Sur, donde

hay relativamente pocas secuencias disponibles. El ingreso y expansión en la zona sur de Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile y Uruguay) se produjo a través de tres eventos migratorios independientes y dieron origen a los linajes EU1/SA1 y SA2. Los linajes sudamericanos tienen combinaciones específicas de aminoácidos bajo selección positiva que constituyen firmas de relevancia taxonómica y evolutiva (Fuques et al., 2022).

Situación en la región

En nuestro continente existen algunos antecedentes de estudios epidemiológicos sobre la enfermedad. En la República de Cuba, el diagnóstico de la enfermedad se realizó mediante las manifestaciones clínicas, análisis de laboratorio y anatomía patológica. Concluyen los autores que la prevalencia fue de 1,85%, la mortalidad alcanzó la cifra de 0,73% y en el caso de la letalidad se obtuvo un 39.84%. También se realizó un estudio en el estado de Pernambuco (Brasil), en el año 2012 entre los meses de Agosto a Diciembre. Las muestras fueron colectadas de caninos no vacunados de más de 10 años y de caninos no vacunados de tres meses. De las muestras analizadas, el 90.38% fueron positivas al virus del Distemper Canino y el 28,72% presentaron niveles de anticuerpos altos, el 47,88% y el 23,40% promedio presentaron niveles de anticuerpos bajos (Chaves et al., 2014). En el estado de Rio Grande do Sul (Brasil), se realizó un estudio cuyo objetivo fue realizar un análisis de los principales signos clínicos de ciento setenta y cinco animales (175) con sospechas de presentar la enfermedad y fue confirmada en 84 caninos (50,9%). En dichos animales el signo clínico más frecuente fue la conjuntivitis (77.5%) y con respecto a la evolución clínica de la enfermedad 42 animales fueron dados de alta, 30 animales debieron ser eutanasiados y 12 animales murieron durante el tratamiento (Dossin et al., 2012).

Diagnóstico

La inmunofluorescencia directa (IFD) permite detectar virus a partir de hisopados de conjuntiva, mucosa genital, tejidos, sangre, líquido cefalorraquídeo u orina. Es imprescindible realizarla en la etapa aguda de la enfermedad.

También se puede realizar la prueba de ELISA, siendo esta una prueba útil ya que la IgM en perros infectados persiste entre 5 semanas a 3 meses, dependiendo de la cepa y la respuesta del

hospedador. En perros vacunados la IgM persiste por aproximadamente 3 semanas (Bernard, Shen y Gorham, 1982).

Por inmunohistoquímica se detectan antígenos virales y/o cuerpos de inclusión, de improntas vaginales, prepuciales o conjuntivales, y de lavado bronquial, así como en sedimentos urinarios o LCR al inicio de la infección. En casos subagudos o crónicos estas pruebas pueden resultar negativas, aunque no se descarta la presencia del virus (Kristen B. y Vandeveld M., 1978).

Se puede confirmar infección al segundo día de ocurrida mediante RT-PCR, debido a su capacidad de amplificar fragmentos del ácido nucleico en forma exponencial, aun habiendo en la muestra una sola molécula. La observación de partículas virales en materia fecal mediante microscopía electrónica, el virus puede ser aislado de las mismas muestras usadas para IFD y ser identificado (Kristen B. y Vandeveld M., 1978).

Tratamiento

El distemper canino representa un reto para el clínico de pequeños animales debido a la carencia de terapéuticas específicas con fármacos antivíricos, y a la dificultad para formular un correcto pronóstico (Green y Appel, 1998). Al tratarse de una enfermedad viral que involucra diferentes órganos o sistemas, el tratamiento convencional es inespecífico y de sostén, por lo que debe adaptarse a cada caso particular. Básicamente deben controlarse las infecciones bacterianas secundarias, y tratar los signos clínicos observados.

Lo empleado con mayor frecuencia consiste en antibioticoterapia ya que los cuadros de neumonía a menudo se complican con infecciones bacterianas secundarias, causadas por *Bordetellabronchiseptica* entre otras, por lo que es necesario administrar antibióticos de amplio espectro, siendo de elección ampicilina o amoxicilina-clavulánico. Fluidoterapia debe ser suministrada a los animales en todos los casos, por la posible deshidratación ocasionada por los signos digestivos (vómitos, diarreas) o anorexia, la que se presenta en casi todos los animales enfermos. Se deben administrar soluciones electrolíticas balanceadas por vía intravenosa. Se pueden suministrar vitaminas del grupo B, para reemplazar las que se pierden a causa de la anorexia y la diuresis y debido a que estimulan el apetito. Se han mencionado beneficios en el uso del ácido ascórbico intravenoso, sin embargo aún no se ha corroborado su eficacia (Green y Appel, 2006). El empleo de antipiréticos está justificado en los cuadros febriles con temperaturas

superiores a 40°C. El uso de medicación anticonvulsiva y sedante para el tratamiento de los trastornos neurológicos es menos gratificante, ya que la encefalitis multifocal es progresiva y conduce a tetraplejía e incapacitación, por lo que frecuentemente está indicada la eutanasia. Para interferir con la replicación viral se ha preconizado la aplicación por vía intramuscular de vacunas de virus homólogo atenuado. En caninos de hasta ocho kg de peso se aplica una dosis, y en individuos que superan ese peso se aplica una dosis doble. Transcurridas 24 horas, se aplica a todos los animales, sin importar su peso una única dosis final (Green y Appel, 1998).

Vacunas

La vacuna contra el VDC es considerada por el Grupo de Directrices de Vacunación de la Asociación Mundial de Veterinarios de Pequeños Animales (WSAVA), como vacuna esencial, o sea, aquella que todos los perros en todo el mundo deben recibir rutinariamente, en los intervalos recomendados, para proveer protección (Day et al., 2016). Un protocolo de vacunación en perros sugerida por WSAVA es, iniciarlo a los 45 – 60 días de edad y luego cada 15 – 30 días hasta los 4 meses de edad. De acuerdo con esta recomendación, el protocolo completo de vacunación incluiría 3 o 4 vacunas, dependiendo de la edad de inicio de este (Day et al. 2016). Esto continúa considerándose una práctica apropiada teniendo en cuenta la persistencia de la inmunidad pasiva de origen materno que puede evitar el correcto desarrollo de la inmunidad activa originada por la vacunación contra el VDC (Martella et al. 2011).

El VDC se caracteriza por afectar negativamente tanto a la inmunidad innata como adaptativa desde momentos iniciales del cuadro infeccioso gracias a su elevado linfotropismo y capacidad de generar disrupción en funciones esenciales de células inmunes. Lo anterior se explica por complejas interacciones entre las proteínas virales y elementos propios de cada vía de señalización, que limita el desarrollo de una respuesta inmune antiviral Th1 efectiva y en perfecto equilibrio con una respuesta de mucosas Th2. Esta última cumple el rol fundamental de evitar infecciones productivas neutralizando agentes patógenos a nivel de superficies mucosas, mediante la secreción de anticuerpos IgA específicos. La respuesta Th1 permite eliminar infecciones ya establecidas utilizando linfocitos T citotóxicos CD8+ secretores de IFN γ y células plasmáticas secretoras de anticuerpos neutralizantes de los isotipos IgG2a e IgG2c séricos. Considerando esta diferenciación funcional, una estrategia de vacunación óptima debe ser capaz de estimular ambas respuestas, de forma sólida y equilibrada. No obstante, se ha descrito que los virus atenuados

utilizados en vacunas polivalentes poseen un linfotropismo y capacidad de inducir inmunosupresión residual, comprometiendo el balance de las respuestas inmunes mencionadas (Sereda et al. 1999). Es más, la vacunación con virus atenuado afecta la actividad proliferativa de linfocitos T y neutrófilos favoreciendo la emergencia de infecciones oportunistas, lo que destaca la importancia de vacunar solamente animales sanos (Strasser et al. 2003). Lo mencionado anteriormente demuestra que, a pesar de la capacidad que tiene el sistema inmune de responder adecuadamente a otro tipo de infecciones luego de los 6 meses de edad, 1) el desarrollo de un cuadro multisistémico en animales inmunizados mayores de 18 meses, 2) la incapacidad del sistema inmune de modular negativamente y controlar la población de linfocitos T autorreactivos responsables de la patología autoinmune en SNC y 3) la patología postvacunal descrita sugiere que para el caso de VDC, el sistema inmune no es completamente maduro, dependiendo en la mayoría de los casos de programas de vacunación bien diseñados para establecer una respuesta inmune sólida y duradera. Esto último tiene especial relevancia en aquellos animales más susceptibles, como individuos menores de 18 meses de edad y especies silvestres, en los que es recomendable recurrir a vacunas recombinantes que prescinden del patógeno y sólo utilizan algunos de sus antígenos para estimular adecuadamente al sistema inmune del hospedero. Esta última afirmación se sustenta en la evidencia de la capacidad del virus vacunal atenuado de revertir de manera fugaz su virulencia y causar encefalomiелitis postvacunal letal en caninos y, de modo similar, un cuadro multisistémico de 90-100% de morbilidad y letalidad en hurones de patas negras (*Mustela putorius furo*) (Summers y Appel 1994, vonMessling et al. 2003). Considerando estos antecedentes y utilizando virus viruela del canario o virus sarampión como vectores genéticos de los antígenos inmunodominantes de VDC, se ha demostrado la capacidad de estas vacunas recombinantes para estimular una rápida y sólida respuesta inmune tipo Th1, caracterizada por títulos de anticuerpos neutralizantes séricos hasta por 3 años (Larson et al. 2006, Bronson et al. 2007, Rouxel et al. 2009). La primera de ellas posee la ventaja adicional de estar exenta de la interferencia por parte de los anticuerpos maternos, y al carecer de partículas de VDC, de la reversión de virulencia potencial y de la inmunosupresión residual presente en las vacunas polivalentes convencionales, permitiendo de esta forma vacunar animales desde las 4 semanas de edad (Larson et al. 2007, Pardo et al. 2007). En animales correctamente inmunizados, la infección es incapaz de establecer un estado de inmunosupresión gracias a la sólida respuesta inmune antiviral desarrollada, que se caracteriza por la eliminación de cepas virulentas antes del establecimiento de la viremia secundaria, entre el tercer y quinto día post infección (Tipold et al. 2001).

Las vacunas polivalentes convencionales son capaces de estimular la secreción de anticuerpos neutralizantes tipo IgG1 e IgG2b, éstas sólo tienen una distribución sérica y un limitado poder de difusión a superficies mucosas (Martella et al. 2011). Los antígenos virales más relevantes en la inducción de inmunidad adaptativa no sólo corresponden a la hemaglutinina, sino que además a las proteínas de fusión y de la nucleocápside, siendo las dos primeras los principales objetivos de los anticuerpos neutralizantes debido a que la interacción con los receptores celulares depende exclusivamente de éstas (Zhao et al. 2008). El adecuado estímulo sobre el tejido linfoide asociado a mucosas, induce la proliferación de linfocitos T helper y citotóxicos junto con la secreción de anticuerpos IgA específicos, siendo estos últimos capaces de reconocer, unirse a las glicoproteínas virales e interferir con el reconocimiento de CD150 en los primeros momentos de la exposición al virus, evitando su diseminación primaria dependiente de linfocitos y la interferencia de las vías de señalización de citoquinas e interferones, necesarias para el normal desarrollo de la respuesta innata y adaptativa. El desarrollo de vacunas recombinantes que promuevan inmunidad estratégica es uno de los principales desafíos para el control de virus distemper, tanto en poblaciones urbanas como silvestres bajo riesgo de infección (Bronson et al. 2007, Rouxel et al. 2009). En este contexto, y considerando la inespecificidad de hospedero de VDC, disponer de vacunas seguras de fácil administración y bajo costo que permitan proteger poblaciones silvestres con mínima intervención en el ecosistema y desde edades tempranas, como también generar inmunidad de masa de manera más rápida frente a brotes esporádicos, es un desafío que debe contemplar el uso de vacunas que puedan ser administradas vía oral o intranasal. Aunque para VDC no se han desarrollado vacunas con estas características, se ha demostrado para virus respiratorio sincicial humano, otro miembro de la familia Paramyxoviridae capaz de inhibir la respuesta Th1, que vacunas recombinantes administradas vía intranasal son capaces de estimular una muy buena respuesta tipo Th1 tanto celular como humoral, y con una distribución de sus elementos efectores tanto sistémica como en superficies mucosas (Mok et al. 2007). Esta evidencia demuestra que, a pesar de la capacidad que tiene el virus respiratorio sincicial de inhibir la respuesta adaptativa tipo Th1 a nivel de la sinapsis inmunológica (González et al. 2009), la vacunación estratégica promueve el desarrollo de una respuesta inmune sólida mientras previene el despliegue de los mecanismos responsables de aquella disrupción y de los procesos inmunopatológicos característicos de la infección.

3.3 PARVOVIROSIS

El parvovirus canino (CPV) es un virus de ADN monocatenario, más importantes que afectan a los perros (Nandi, Chidri, Kuma, Chauhan, 2010). Es un pequeño virus (26 nm de diámetro), desnudo, con una simple hebra de ADN de aproximadamente 5200 nucleótidos que está envuelta por una cápside icosaédrica conformada por dos proteínas, VP1 y VP2 (Strasheim, Gruenberg, Veijalainen, Sgro, y Parrish, 1994). El CPV se encuentra en todo el mundo y el cuadro clínico de infección puede ser asintomático o cursar con gastroenteritis grave, leucopenia, deshidratación, letargo y muerte (Goddard y Leisewitz, 2010). El virus tiende a mantenerse por largos periodos de tiempo en las superficies y el ambiente y es resistente a altas temperaturas ambientales, debido a la ausencia de envoltura (Hurtado, 2012), de allí que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en meses cálidos (Ernst, Martin, y Thibaut, 1992).

Transmisión de la enfermedad

La principal vía de infección es oral. Se han publicado estudios que demuestran que la exposición por vía oral de perros susceptibles con materia fecal contaminada, o bien con filtrados de cultivos de tejido conteniendo parvovirus, da como resultado un cuadro clínico característico (Eugster, Bendele, y Jones, 1978). Los perros infectados excretan grandes cantidades de virus en sus heces. La presencia de esta enfermedad en poblaciones caninas, se debe a la estabilidad del virus en el medio, la dosis del virus para infectar y la alta propagación del mismo. (Romero, Aranda, Godoy y Watty. 2007). El virus también puede contaminar las superficies en las perreras, el alimento, los recipientes para agua de beber, los collares y las correas. Además, este virus es muy resistente a las condiciones ambientales extremas como son, el calor, frío, humedad, sequedad y puede sobrevivir durante largos periodos bajo condiciones adversas (Green, 2006).

Signos y síntomas

Los perros que se ven principalmente afectados son los cachorros mayores de 6 meses, aunque pueden enfermarse caninos de cualquier edad, especialmente si no están vacunados (Tamimi N. 2017). Se pueden observar cuadros de gastroenteritis, generalmente hemorrágica, anorexia, debilidad, hipertermia, deshidratación y muerte, afectando en su gran mayoría a cachorros. Actualmente se ha visto en varios países, incluyendo a Uruguay, que la patogenicidad y la

virulencia de la enfermedad parece estar aumentada, viéndose en la clínica algunos casos de cuadros más severos y con mayor letalidad (Feijóo, 2020).

Situación en Uruguay

En un estudio realizado con 142 sueros de animales adultos provenientes de la ciudad de Montevideo, y sin antecedentes de vacunación, se encontró que un 89,4% y un 91% de los animales fueron seropositivos a CPV-2 y CPV-2c respectivamente, con títulos hemoaglutinantes promedios de 1/930 y 1/1370 (Eliopulos et al. 2010). Por un lado, este trabajo demuestra el alto porcentaje de inmunización natural que ocurre con CPV en estos animales. Si bien ya no se detecta la variante CPV-2 en la naturaleza existen reacciones cruzadas entre esta y las nuevas variantes lo que explica el alto porcentaje encontrado en ese estudio. (Streck et al. 2009; Castro et al. 2011).

En un análisis filodinámico del parvovirus canino en el Uruguay se evidenciaron dos invasiones sucesivas por diferentes variantes. Este estudio menciona que la variante predominante entre el 2006 y 2009 fue la CPV-2c de origen europeo. En los años 2010 y 2011 fue detectada la variante CPV-2a de origen asiático en una frecuencia de 85%. Los resultados apoyan la hipótesis de que los eventos de invasión no son raros, e indican que las cepas actuales pueden recibir una capacidad de invasión y reemplazo inesperadamente alta.(Maya et al. 2013)

Situación en la región

En el año 2011 en Argentina se encontró la variante CPV-2c en mayor proporción de muestras positivas analizadas provenientes de distintas partes de ese país. Al analizar la secuencia completa de la VP2 de distintos aislamientos se pudo observar que, a nivel nucleotídico, muestras argentinas de CPV-2c tienen un 99,3% a 99,9% de identidad con relación a cepas internacionales (Calderón et al, 2012). En Brasil, se han detectado las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c en diferentes proporciones en casos clínicos de las ciudades de Río de Janeiro y Porto Alegre (Streck et al. 2009; Castro et al. 2011).

El panorama epidemiológico en América del Sur presenta una variabilidad genética en las variantes de CPV. Todas las cepas pertenecen al linaje CPV-2a y el escenario epidemiológico actual es consecuencia de migraciones intra e intercontinentales de cepas de diferentes orígenes

geográficos siendo responsables de los grandes cambios epidemiológicos resaltando la amenaza de invasión de fuentes externas. (Grecco S. et al. 2018)

Diagnóstico

El diagnóstico de Parvovirus canina, en la mayoría de los países, se realiza de forma presuntiva principalmente por antecedentes clínicos. Sin embargo, varios métodos se han desarrollado para detectar al patógeno a partir muestras de materia fecal: aislamiento viral en cultivos celulares, Hemoaglutinación, SAT (Slideagglutination test), ELISA (Enzyme-LinkedImmunoSorbentAssay, Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), SNAP (test comercial basado en el método del ELISA) e Inmunocromatografía (Desario et al., 2005; Marulappa y Kapil, 2009; Schmitz et al., 2009; Puentes et al., 2010, 2012). En Uruguay probablemente el diagnóstico sea también presuntivo por sintomatología clínica en la mayoría de las clínicas veterinarias, sin un diagnóstico definitivo de respaldo (Guerrero y Machin, 2013).

Tratamiento

En cuanto al tratamiento no existen productos que actúen específicamente en contra del parvovirus, por lo que se recomienda como medida auxiliar para contrarrestar los efectos de la deshidratación y evitar la aparición de infecciones secundarias causadas por bacterias. Tan pronto como se identifica el problema es necesario administrar una terapia a base de líquidos. La vía de administración más recomendable es intravenosa; la aplicación subcutánea puede ofrecer buenos resultados (Troutt, 1972).

La terapia con soluciones electrolíticas debe ser prolongada. La administración de antibióticos ha sido recomendada por numerosos autores para prevenir la presentación de infecciones secundarias. La ampicilina es el antibiótico de elección (Carmichael, L., Pollock, R. V. y Woods, C. B 1980). Otros tratamientos incluyen gentamicina y cefalosporinas (Kramer, J. M., Meunier, P. C. y Pollock, R. 1980).

Es conveniente administrar alguno de los protectores de la mucosa intestinal, particularmente los elaborados a base de caolin, pectina y emulsiones de hidróxido de aluminio. Es recomendable vigilar que el tratamiento no favorezca la presentación del vómito. La forma cardíaca de la

enfermedad suele ocurrir de manera súbita, por lo que no hay oportunidad de aplicar terapia alguna.

Vacunas

La vacunación contra el CPV se realiza de forma rutinaria y es el método más efectivo para controlar la enfermedad (Altman et al., 2017; Nandi et al., 2013), pero siguen ocurriendo casos con frecuencia (Filipov et al., 2016). Los fracasos de la vacunación están bien reconocidos en la literatura y el momento inadecuado de la vacunación puede aumentar el riesgo de exposición a la enfermedad (Altman, Kelman y Ward, 2017).

Las vacunas atenuadas de parvovirus derivan de cepas patógenas, que a través de numerosos pases en cultivos celulares, sufrieron una considerable reducción de su virulencia. Algunos estudios realizados con cepas atenuadas demuestran que la aplicación de dosis masivas, no causan enfermedad en perros desde los 4 días y hasta los 7 años de edad, ni en hembras gestantes. Es común que la cepa vacunal sea eliminada en las heces de los animales vacunados; pero esto ocurre por periodos cortos y con títulos de virus muy bajos. Se había demostrado en el año 1983 que la aplicación de vacunas de origen canino, usando virus vivo modificado, induce una inmunidad de por lo menos dos años (Pollock y Carmichael, 1982). Actualmente según la Guía de vacunación de la WASAVA con vacunas de alta calidad la inmunidad llega a tres años. (WASAVA, 2016). La eficacia de las vacunas vivas de origen canino, para prevenir la infección natural del parvovirus en más de 6000 perros estudiados por Carmichael y sus colaboradores en 1982, fue mayor al 98% en animales que eran seronegativos al momento de la vacunación; sin embargo, sólo alcanzó 50% de efectividad cuando se vacunaron animales con cierto grado de anticuerpos maternos (títulos de 1:10 a 1:20). Estos autores concluyeron que la inmunidad activa que se obtiene con vacunas vivas atenuadas de parvovirus canino en cachorros, se produce con mayor rapidez que cuando se utiliza otro tipo de vacunas contra esta enfermedad.

Los perros que han respondido a la vacunación con vacunas atenuadas esenciales mantienen una inmunidad sólida (memoria inmunológica) durante muchos años en ausencia de cualquier vacunación repetida (Bohm et al. 2004, Mouzin et al. 2004, Mitchell et al. 2012, Schultz 2006)

3-RESPUESTA INMUNE A LA VACUNACIÓN

Como se mencionó anteriormente las vacunas consisten en microorganismos o fracciones de los mismos que, cuando son administradas a un animal, inducen una respuesta inmunológica capaz de protegerlo frente al contacto posterior con el agente inicial. La respuesta inmune inducida resulta del desarrollo de células efectoras y células de memoria. Las vacunas deben ser eficaces para inducir protección y seguras para no producir enfermedad en el huésped. La eficacia de una vacuna está relacionada con la capacidad de estimular las células presentadoras de antígeno, seguido por la liberación de las citoquinas apropiadas y la estimulación de los linfocitos T cooperadores (Th), T citotóxicos (Tc) y B, generando un número adecuado de células de memoria y efectoras específicas para el antígeno inoculado. El antígeno contenido en la vacuna debe permanecer, preferiblemente en lugares específicos del tejido linfoide, lo que permite la estimulación continua de las células del sistema inmune. Idealmente, se espera que la vacuna sea capaz de conferir protección a largo plazo frente a una nueva exposición al agente, logrando una inmunidad de larga duración. La memoria inmunológica permitirá una respuesta inmune más intensa frente a una nueva exposición al patógeno (Flores, 2007).

La vacunación de rutina en cachorros se da en las primeras semanas de vida, tiempo durante el cual hay un cambio considerable en el sistema inmunológico de estos animales. Los cachorros recién nacidos deben obtener protección inmunológica pasiva mediante la ingestión de calostro en las primeras horas de vida. El momento de la vacunación está determinado por el período de tiempo requerido para que las inmunoglobulinas adquiridas pasivamente se degraden, permitiendo así que se genere una respuesta inmune endógena por el neonato. Es esencial para el cachorro la transferencia pasiva de inmunidad a través de la ingestión de inmunoglobulinas calostrales (Igs), la cual los protegerá durante el período neonatal. Los caninos presentan una placentación endoteliocoreal en la que existe una barrera relativamente impenetrable para la transferencia in útero de las inmunoglobulinas maternas. Se acepta generalmente que pequeñas cantidades de IgG pueden pasar a través de esta barrera, de tal manera que el cachorro recién nacido tiene una concentración sérica de IgG que se aproxima al 5% del nivel adulto. Puede haber una variación considerable entre los cachorros de una misma camada en la eficiencia de la captación de las inmunoglobulinas calostrales, relacionado con el tamaño y la fuerza del recién nacido individual y las habilidades maternas de la perra. El calostro canino es rico en IgG e IgA y

ambas inmunoglobulinas están presentes en mayor concentración que en el suero de la perra. Por el contrario, la leche contiene significativamente más IgA que IgG, y esta IgA también está presente en mayor concentración que en el suero canino. Los cachorros recién nacidos tienen una concentración sérica de IgG de 1,2 mg/ml que aumenta a 23 mg/ml 12h después de la ingestión de calostro (Day, 2007). Al mismo tiempo que la inmunidad derivada de la madre (MDA, motherderivedantibodies) protege a los cachorros en el período neonatal de posibles infecciones, las concentraciones elevadas de inmunoglobulina materna inhiben el desarrollo de la respuesta inmune neonatal endógena durante el tiempo necesario para que las proteínas maternas sean degradadas. El punto en el que un cachorro se vuelve inmunocompetente (generalmente se considera que es entre las 6 y las 12 semanas de edad) está determinado por la concentración de inmunoglobulina calostrada ingerida (Day, 2007). Entonces, los anticuerpos maternos tienen un efecto protector frente a la infección en las primeras semanas de vida. Sin embargo, en un momento dado, los niveles de anticuerpos son insuficientes para proteger al cachorro frente a la enfermedad y, por el contrario, bloquean el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz estimulada por las vacunas. Este período es conocido como "ventana de susceptibilidad" (Flores, 2007).

4-INTERFERENCIA DE LA CIRUGÍA SOBRE LA RESPUESTA DEL SISTEMA INMUNE

Varias investigaciones han confirmado la inducción de inmunosupresión por la anestesia general y cirugías tanto en animales como en el hombre (Felsburg et al. 1986; Nakama et al. 1990). La excesiva respuesta inflamatoria, junto con una evidente deficiencia de la respuesta inmune mediada por células siguiendo una cirugía importante, parece ser la responsable del incremento de las subsecuentes sepsis encontrada en los pacientes (Angele y Faist, 2002). En vista de esto, la mayoría de las investigaciones médico-científicas se han dirigido hacia la evaluación de la progresión e inter-relación de mediadores que se activan o suprimen después de una cirugía (Angele y Faist, 2002). En la mayoría de los estudios clínicos realizados, las alteraciones en los parámetros inmunes de pacientes siguiendo una cirugía, han sido evaluadas basándose en las funciones de células de sangre periférica y niveles plasmáticos de varios mediadores (Angele y Faist, 2002). En este sentido, se ha observado una falta de reactividad de monocitos circulantes estimulados con bacterias o endotoxinas luego de la realización de cirugías en pacientes sanos.

Esta alteración de las funciones de los monocitos, ha sido observada durante al menos tres a cinco días luego del acto quirúrgico (Haupt et al. 1998). En contraste, otros estudios han demostrado un aumento de la secreción de IL-1 β e IL-10 por monocitos estimulados con endotoxinas luego de la cirugía. Las diferencias en la severidad del trauma quirúrgico, podrían explicar esos resultados divergentes (Angele y Faist, 2002). En cuanto a la presentación de antígenos ejercidas por estas células en el contexto de una respuesta inmune, las investigaciones realizadas sugieren que existe una depresión en la capacidad de macrófagos de cumplir esta función siguiendo una injuria o cirugía mayor. Esto consecuentemente provoca además una disminución de la inmunidad mediada por células, incrementando la susceptibilidad a la infección (Angele y Faist, 2002).

Por otro lado, en lo que se refiere a la función de los linfocitos T, se han realizado ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, donde se ha observado alteración en la habilidad de los linfocitos T para responder contra mitógenos como Concaivalina A y fitohemaglutinina (Ayala et al. 1994). Se ha observado además, que el grado de depresión de esos linfocitos, está correlacionada con la complejidad de la cirugía (Angele y Faist, 2002).

En lo que se refiere a la función de los linfocitos B, se ha observado una significativa disminución en la producción de anticuerpos luego de una cirugía traumática y pérdida de sangre (Abraham y Freitas, 1989). En este sentido, una disminución de los niveles de inmunoglobulinas en suero, ha sido detectada durante al menos 3 días luego de la cirugía (Abraham y Freitas, 1989). Una explicación de esta disminución de las células B, podría deberse a la disminución de la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T, que también se ven comprometidos por el acto quirúrgico. Como se sabe, las citoquinas de las células T son prerrequisitos para una adecuada proliferación de linfocitos B y secreción de inmunoglobulinas (Angele y Faist, 2002).

Basado en estos antecedentes, donde se observa un compromiso de la respuesta inmune en animales sometidos a cirugías, se podría pensar que la vacunación durante esta práctica en animales, se traduce en fallas en la respuesta inmunológica. Todo acto quirúrgico implica un traumatismo directo al organismo, porque expone moléculas que normalmente no se encuentran en el medio extracelular, a las cuales el sistema inmune puede reconocer, e iniciará una respuesta inflamatoria aguda, con la consecuente producción de proteínas mensajeras llamadas citocinas proinflamatorias. Las citocinas pro inflamatorias se encargarán de generar cambios en el tejido conectivo y el sistema vascular, lo que produce una vasodilatación que provoca la salida de líquido al espacio extracelular, lo que permitirá

llegar al sitio de la lesión a los leucocitos y proteínas efectoras solubles, con el fin de responder al estímulo agresor mediante mecanismos innatos y adaptativos. Una vez que el estímulo agresor ha sido controlado, la respuesta fisiológica normal llevará a la producción de mediadores antiinflamatorios que permitan realizar una adecuada reparación tisular para llevar a los tejidos lesionados por el proceso quirúrgico a su estado normal (López-Bago et al. 2018.)

En este sentido, Miyamoto et al. (1995) evaluaron los efectos en la respuesta inmune pre y post quirúrgica, de vacunas comerciales para caninos contra varios patógenos. Mediante blastogénesis y detección de anticuerpos en suero, observaron que la cirugía en los animales no alteró significativamente los parámetros inmunológicos analizados, obteniendo un nivel de protección aceptable en la respuesta inmune contra Parvovirus canino y Distemper canino. Por otro lado, Taura et al. (1995) sugieren que la vacunación de perros inmediatamente antes de la cirugía, posiblemente impida una inmunosupresión postquirúrgica observada en perros no vacunados, y observan diferencias en cuanto al protocolo anestésico utilizado, detectando una mayor depresión de la inmunocompetencia en animales anestesiados con halotano más que con Isoflurano.

En un trabajo realizado en gatos, que habían sido vacunados contra la Panleucopenia felina, herpesvirus felino, calicivirus felino y rabia, antes, durante y luego de la esterilización, no se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos detectados. La esterilización realizada durante o cerca de la vacunación no perjudicó las respuestas de anticuerpos de los animales. Por lo tanto, los autores sugieren que los gatos pueden ser vacunados en el período perioperatorio cuando sea necesario, sin que exista interferencia en la calidad de la respuesta inmune esperada (Reese et al. 2008).

Se sugiere que la falla en la vacunación puede ser debida a múltiples factores, se puede mencionar la circulación de nuevas variantes genéticas de los virus, la baja reactividad cruzada entre las cepas atenuadas y las cepas de campo circulantes, la interferencia de anticuerpos pasivos, fallas individuales en la respuesta inmune, calidad, conservación y variabilidad genética del inmunógeno, la eventualidad de una posible infección anterior al momento de la vacunación, o protocolos de vacunación incorrectos, entre otros (Koutinas et al. 2002; Negrão et al. 2006; Martella et al. 2011; Budaszewski et al. 2014; Riley y Wilkes, 2015; Day et al. 2016; Anis et al. 2018).

HIPÓTESIS

Es posible lograr un nivel de protección inmunológica en caninos contra las principales enfermedades virales, vacunando durante la esterilización quirúrgica.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

Determinar la respuesta inmune humoral en animales inmunizados contra rabia, parvovirus y distemper canino, que fueron sometidos a esterilización quirúrgica al momento de la vacunación.

Objetivos específicos:

1. Detectar los anticuerpos anti-rábicos, anti-parvovirus y anti-Distemper canino producidos luego de la primovacunación administrada durante la esterilización quirúrgica y la respuesta al booster (30 días después), mediante la técnica *Rapid fluorescent focus inhibition test* (RFFIT) y ELISA semicuantitativos.
2. Comparar los títulos de anticuerpos contra los tres virus entre animales inmunizados durante el acto quirúrgico con animales inmunizados sin cirugías programadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestreos

Esta tesis contó con la autorización de la comisión de experimentación animal a la CHEA: CEUAFVET (Exp número: 346/16).

Se utilizó para la investigación un total de 30 caninos cruzas de ambos sexos. Los criterios de inclusión para este ensayo fueron que sean animales clínicamente sanos de entre 1 y 6 años de edad y sin antecedentes de vacunación contra el virus de la rabia, parvovirus y distemper. Se realizaron desparasitaciones al grupo a ensayar y se les realizó un examen objetivo general. Antiparasitario amplio espectro (Appryl): Cada comprimido contiene Pirantel (como pamoato) 50 mg, Albendazole 300 mg, Prazicuantel 50 mg. Dosis:1 tableta por cada 10 kg de peso vivo.

Se conformaron dos grupos al azar: el primer grupo de 15 caninos inmunizados durante la esterilización quirúrgica (día 0) y día 30 con una vacuna comercial polivalente atenuada y el segundo grupo 15 caninos controles inmunizados en las mismas condiciones que el grupo 1, pero sin cirugía en el día 0.

Desparasitación:

Antiparasitario amplio espectro (Appryl): Cada comprimido contiene Pirantel (como pamoato) 50 mg, Albendazole 300 mg, Prazicuantel 50 mg.

Dosis: 1 tableta por cada 10 kg de peso vivo.

Anestesia:

Pre medicación: xilacina, dipirona.

Mantenimiento: diazepam, ketamina.

Se colectaron muestras de sangre de la vena cefálica con mariposas 21G de todos los animales los días 0, 30 y 60 posvacunación. Las mismas se colocaron en tubos secos y se enviaron al laboratorio refrigeradas. Posteriormente se centrifugaron durante 20 minutos a 2200 rpm y luego se almacenaron los sueros a -20°C hasta su procesamiento.

Detección de anticuerpos anti-rábicos

Para la detección de anticuerpos anti-rábicos se utilizó la técnica *Rapid fluorescent focus inhibition test* (RFFIT) en el Instituto Pasteur de São Paulo (Laboratorio de Referencia en la región). Siguiendo las recomendaciones de la OMSA (2013), se incubaron los sueros problemas con 100 FFD₅₀ (dosis formadora de focos en 50% de cultivos) de virus rábico durante 90 minutos a 37°C con atmósfera controlada (5% CO₂). Posteriormente se sembraron 2,5 x 10⁴ células/pocillo de la línea BHK (células de riñón de hámster neonato) en placas de 96 pocillos y se incubaron en igual condiciones por 20hs. Luego se fijaron las células con acetona y se realizó la Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-IgG de perro conjugados a FTIC (Isotiocianato de Fluoresceína). La reacción se visualizó en microscopio invertido de Fluorescencia a 200X.

Detección de anticuerpos contra Parvovirus y Distemper canino

La detección de anticuerpos contra PVC y VDC se realizó mediante un kit comercial de ELISA modificado (Figura 1) ImmunoCombCanineVaccicheck, (BiogalGaledLaboratoriesAcs. Ltd.) Se determinaron los niveles de IgG contra ambas enfermedades en los sueros de los animales muestreados. El kit cuenta con una sensibilidad de 88% para parvovirus y 100% para distemper. Y una especificidad de 100% para parvovirus y de 92% para distemper canino. El procedimiento se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se colocaron los sueros problemas en los pocillos indicados, se introdujo un peine en el cual se encuentran los antígenos virales y un control positivo, se realizaron sucesivas incubaciones de dicho peine en las filas siguientes las cuales contienen anti IgG canino y sustrato para la enzima. Finalmente se compararon los resultados con una escala colorimétrica. Un tono de color igual o más oscuro que el punto de referencia se considera una respuesta positiva. Un tono de color que coincida con S2 se considera un resultado no concluyente. Un tono de color tenue de S1 o menos se considera un resultado negativo.

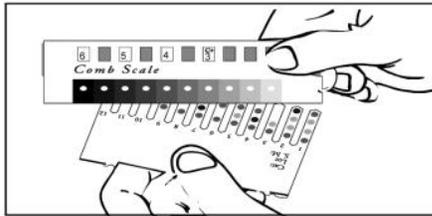
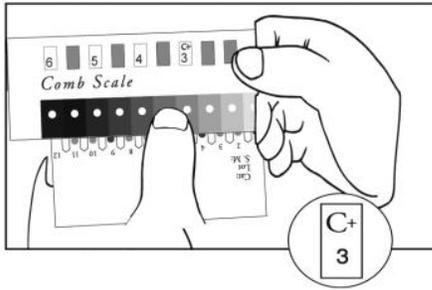


Figura 1. ImmunoComb Canine Vaccicheck, BiogalGaled Laboratories Acs. Ltd, escala colorimétrica.

Análisis de resultados

Se confeccionaron planillas Excel con la identificación de cada individuo y sus respectivos resultados de las tres virosis. Se realizó un análisis descriptivo de las variables a través de porcentajes, tablas y gráficos. Para comparar los títulos antirrábicos entre grupos se utilizó la prueba t de student para comparar las medias entre grupos (Graphpadprism 8).

Para comparar la respuesta a anticuerpos entre grupos para el parvovirus y Distemper, variables categóricas se realizó la prueba de χ^2 .

RESULTADOS

Animales:

15 caninos inmunizados durante la esterilización quirúrgica (día 0) y día 30 con una vacuna comercial polivalente. 8 Caninos macho, 7 Caninos hembra con condición corporal buena (3-4) peso de 10-15 kg.

15 caninos inmunizados día 0 y día 30 con una vacuna comercial polivalente. 8 Caninos macho, 7 Caninos hembra con condición corporal buena (3-4) peso de 10-15 kg.

Comparación de la respuesta inmune entre el grupo esterilizado y no esterilizado para el virus de la rabia

Se pudo observar una respuesta a la vacunación en ambos grupos de estudio (Fig 2). El día 0 no hubo diferencia significativa entre el grupo esterilizado y el grupo control con una media para el grupo control de 0,9793 UI/mL y para el grupo esterilizado 0,1373 UI/mL con una diferencia de -0.8420 y un valor de $p=0,294$.

En el día 30 no hubo diferencia significativa entre el grupo esterilizado y el grupo control, con una media para el grupo control de 6,216 UI/mL y grupo esterilizado 4,207 UI/mL con una diferencia de -2,009 con un valor $p=0,267$.

Para el día 60 no hubo diferencia significativa entre el grupo esterilizado y el grupo control, los valores obtenidos para el grupo control tuvieron una media de 12,19 UI/mL y grupo esterilizado 17,63 UI/mL con una diferencia de 5,440 con un valor $p=0.287$.

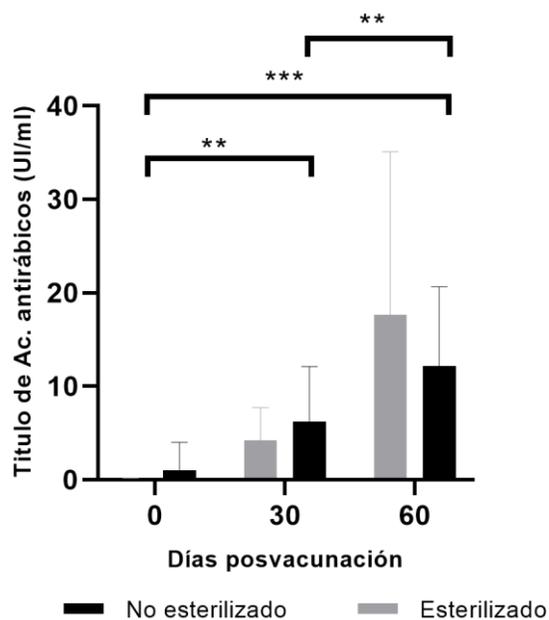


Figura 2. Título de anticuerpos antirrábicos por grupo durante el ensayo. Animales inmunizados.

Círculos grises animales del grupo esterilizado y círculos negro animales del grupo control (sin esterilizar)

Tabla 1. Resumen de datos para Rabia de grupo control y grupo de estudio a través del tiempo.

		Media	
Grupo	día 0	día 30	día 60
Esterilizado	0.1373	4.207	17.63
No esterilizado (control)	0.9793	6.216	12.19
diferenci SE	0.787	1.775	5.007

Comparación de la respuesta inmune entre el grupo esterilizado y no esterilizado para el Parvovirus y Distemper canino.

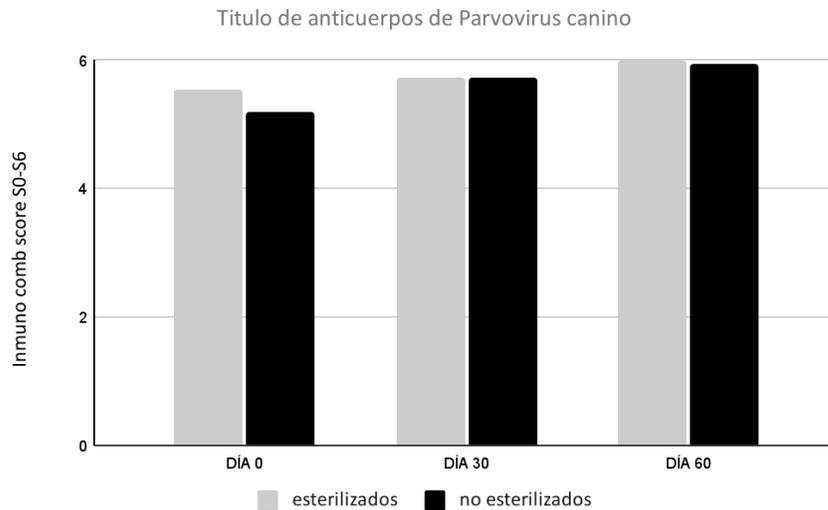


Figura 3. Detección de anticuerpos contra parvovirus canino mediante kit comercial Elisa modificado (InmunoCombCanineVaccicheck, BiogalLaboratoriesAcs. Ltd). Barra gris grupo de animales esterilizados , barra negra animales enteros.

No existe diferencias significativas el día 0 entre el grupo esterilizado y el no esterilizado. Lo mismo para los días 30 y 60. Entre días hay diferencia significativa eso quiere decir que se detectó un efecto *booster* de la vacuna.

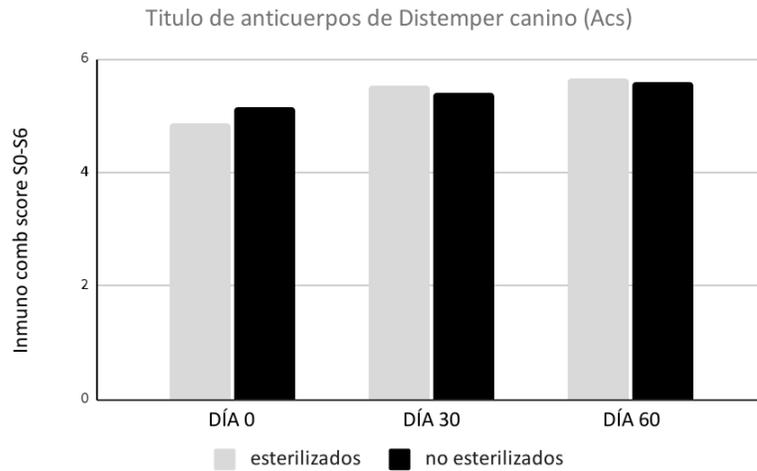


Figura 4. Detección de anticuerpos contra distemper canino mediante kit comercial Elisa modificado (ImunoCombCanineVaccicheck, BiogalLaboratoriesAcs. Ltd). Barra gris grupo de animales esterilizados, barra negra grupo control.

No se encontraron diferencias significativas entre los días 0, 30 y 60 entre grupo esterilizado y no esterilizado para distemper canino.

No hay diferencia significativa entre días para distemper, no se observó el efecto booster de la vacuna.

DISCUSIÓN

Esta tesis tuvo como objetivo principal, abordar un aspecto importante y de uso práctico para la medicina canina, en lo relacionado a la vacunación contra la rabia, PVC y VDC. Se evaluó cómo incide la esterilización, práctica común muy utilizada en Uruguay para el control de la población canina, en la respuesta inmune humoral contra estas enfermedades. La vacunación individual de los animales es importante, no solo para proteger al individuo, sino también para reducir el número de animales susceptibles en una población y de ese modo la prevalencia de la enfermedad. Aunque sea difícil obtener cifras precisas, incluso en los países desarrollados, se estima que sólo el 30 – 50% de la población de animales de compañía está vacunada, y este valor es significativamente menor en las naciones en desarrollo (Day et al. 2016).

Los resultados obtenidos una vez finalizado el trabajo, apuntaron a profundizar los conocimientos sobre la respuesta inmune de caninos contra estos virus de importancia veterinaria, bajo condiciones adversas del punto de vista inmunológico, como el estrés producido durante un procedimiento quirúrgico. Con esto, se buscó analizar alternativas para mejorar la cobertura vacinal existente actualmente en nuestro país. Por lo tanto, la pregunta que originó esta tesis fue: ¿es posible inmunizar animales durante las campañas de esterilización masiva? Está demostrado en la literatura que existe un compromiso inmunológico causado por el acto quirúrgico tanto en componentes del sistema inmune innato como adaptativos (Abraham y Freitas, 1989, Ayala et al. 1994, Angele y Faist, 2002). Por estos antecedentes, fue necesario la realización de este ensayo, con el fin de responder la pregunta planteada.

Al realizar un trauma quirúrgico, las células dañadas secretan IL-1 y ácido úrico, estimulando así la respuesta inflamatoria y el aumento del daño en la zona. Las células dañadas iniciarán un proceso de muerte, que estimulará la secreción de esta interleucina y de otras proteínas como el factor inducible por hipoxia (HIF), que estimulará la secreción de más IL-1 por la célula dañada y las que se encuentren cerca. Esto a su vez inducirá la producción de quimiocinas y el incremento de moléculas de adhesión tanto en los leucocitos como en el endotelio vascular (Sims y Smith 2010).

Una vez en el sitio de lesión, las células reclutadas se activan para realizar su función correctamente y secretan citocinas que regulan e incrementan la reacción inflamatoria. Las células dendríticas, plaquetas, mastocitos, macrófagos, neutrófilos y linfocitos T son los principales

moduladores de la respuesta inflamatoria (Abbas AK, Litchman AH, Pillai S. 2012) (Kumar et al. 2010).

El proceso quirúrgico produce un claro desequilibrio en el sistema inmunológico, pues ante la pérdida de continuidad de los tejidos, se exponen moléculas que indican que ha ocurrido un daño celular, como la proteína nuclear HMGB1, diversos componentes mitocondriales y material genético; estas moléculas serán reconocidas por diversos receptores celulares y causarán una activación celular desencadenando una respuesta inflamatoria, la cual tiene como fin reparar los tejidos dañados y dar lugar al proceso de cicatrización (López-Bago et al. 2018).

Miyamoto et al. (1995) habían demostrado la eficacia de la vacunación en perros sometidos a cirugías. Ellos evaluaron la respuesta contra Parvovirus y Distemper canino, sin embargo la vacunación se había realizado dentro de los 10 días previos hasta el tercer día posterior a la cirugía. Los resultados de ese trabajo, demostraron que se obtuvo un nivel aceptable en la respuesta inmune para Parvovirus y Distemper Canino. Por otra parte, otros investigadores (Reese et al. 2008), evaluaron la respuesta inmune a la vacunación contra distintos patógenos incluyendo la rabia, antes, durante y luego de la cirugía. Pero este experimento se realizó en gatos que habían sido vacunados contra la Panleucopenia felina, herpesvirus felino, calicivirus felino y rabia, antes, durante y luego de la esterilización. En este caso, la respuesta encontrada fue que no se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos detectados. La esterilización realizada durante o cerca de la vacunación no perjudicó las respuestas de anticuerpos de los animales. Por lo tanto, los autores sugieren que los gatos pueden ser vacunados en el período perioperatorio cuando sea necesario, sin que exista interferencia en la calidad de la respuesta inmune esperada (Reese et al. 2008). pero la respuesta podría no ser extrapolable a la especie canina.

Previamente, Puentes et al. (2016), había evaluado la respuesta contra rabia en cachorros, inmunizando durante la esterilización y como control inmunizando sin esterilización, pero a diferencia de la presente tesis solo evaluaron una única dosis, no realizado un booster a los 30 días y posterior evaluación a los 60 días. En ese anterior trabajo seis de siete animales respondieron superando el nivel de protección con una sola dosis ($p < 0.05$). Con esta tesis, se duplicó el número de animales estudiados, se utilizaron animales adultos y se logró aumentar el nivel de protección a la totalidad de los animales con una segunda dosis a los 30 días de la cirugía, demostrando así, por

un lado al igual que Puentes et al. (2016) la viabilidad de la inmunización durante la esterilización y por otro lado la importancia de la revacunación para lograr el 100% de los animales inmunizados con títulos protectores. El nivel de anticuerpos en sangre, 0.5 UI/mL, ha sido aceptado a nivel de la comunidad científica internacional y de organismos como la OMSA, como el nivel mínimo de protección frente a la exposición con el virus de la rabia (OMSA, 2018). Teniendo en cuenta los resultados previos en investigaciones realizadas en el departamento de Montevideo, que encontraron que apenas el 36% de perros vacunados contra la rabia tenían niveles de anticuerpos considerados protectores para esta enfermedad (Moreno et al. 2012), surge como estrategia esta oportunidad de inmunizar los animales en el momento de la esterilización contribuyendo a mejorar los niveles de protección contra la rabia de la población canina y contribuir a la Salud pública ya que se trata de una zoonosis altamente mortal.

Por otra parte, en cuanto a PVC y VDC en el presente trabajo, no se pudo concluir de la misma manera, ya que el punto de partida, o sea los niveles de anticuerpos contra ambas virosis al día 0, ya eran muy elevados, no permitiendo un aumento significativo al día 60 post vacunación. Son necesarias futuras investigaciones para estas dos enfermedades, que permitan valorar la respuesta serológica tras la inmunización durante la cirugía. Sería oportuno en futuras investigaciones no utilizar para el ensayo animales provenientes de refugios de animales donde la casuística de estas enfermedades virales es alta, como alternativa se debería realizar con animales jóvenes que tienen menor probabilidad de haber estado expuestos a estos virus y generar inmunidad de manera natural.

Desde otro punto de vista, es interesante discutir el nivel de anticuerpos contra parvovirus y distemper canino encontrado al día 0 del ensayo. Partiendo del supuesto que eran animales sin historia de vacunación, el alto porcentaje de inmunización natural contra CPV y CDV al inicio del ensayo, nos permite suponer de una exposición e inmunización natural elevada para ambas enfermedades. Esto concuerda con los resultados encontrados en un estudio previo en Uruguay, donde se analizaron 142 sueros de caninos adultos provenientes de la ciudad de Montevideo y sin antecedentes de vacunación, encontrándose que el 89,4% y un 91% de los animales fueron seropositivos a CPV-2 y CPV-2c respectivamente, con títulos hemaglutinantes promedios de 1/930 y 1/1370 (Eliopoulos et al. 2010). Esto indica un alto nivel de protección, si tenemos en cuenta el nivel 1/80 como mínimo de anticuerpos hemoaglutinantes para estar protegidos contra la

infección natural (Elia et al., 2005). Así mismo, el hecho de encontrar alto porcentaje de anticuerpos contra CPV-2c, demuestra la fuerte inmunización natural existente, ya que hasta la fecha, las vacunas comercializadas en Uruguay no están formuladas con esa variante.

Por lo tanto, en caso de utilizar la cirugía como momento para la primovacuna, sigue siendo necesaria la segunda dosis para lograr un alto nivel de protección contra la rabia. El poder vacunar durante el momento de la cirugía, posibilita realizar vacunación de un gran número de animales en las jornadas de esterilización masivas que ya se realizan en nuestro país. El programa de vacunación debe adaptarse a la epidemiología de las enfermedades inmunoprevenibles y que afecte al animal y al grado de exposición a la infección o riesgo de contagio (De Pedro, 2006). En un estudio realizado por Mojišová et al. (2007), se demostró una asociación entre animales parasitados y una depresión en la respuesta inmune. Cachorros que sufren una inmunosupresión por una parasitosis importante, demostraron un nivel de anticuerpos significativamente menor que los que no en una evaluación a los 28 días post vacunación antirrábica. Por este motivo es que realizamos un tratamiento preventivo antihelmíntico para mejorar la respuesta inmunitaria. El Instituto Nacional de Bienestar Animal logró llegar a 90 mil animales esterilizados en el 2022 y se propone llegar a 120 mil en los próximos años (INBA, Montevideo Portal, 2022). Se demostró que si se realiza un *booster* de dichas vacunas a los 21 días cuando el animal retorne a quitarse a los puntos, quedará con un nivel de protección adecuado, al menos para el virus de la rabia.

CONCLUSIÓN

En conclusión, este trabajo demostró que, se deberá profundizar con ensayos similares para vacunas contra VPC y VDC, para poder concluir que puede ser efectiva la inmunización durante la esterilización quirúrgica contra las principales virosis caninas presentes en nuestro país.

Los resultados para rabia mostraron que todos los animales que fueron inmunizados durante la esterilización quirúrgica, generaron al día 30 y al día 60 títulos de anticuerpos mayor a 0.5UI/ml (nivel mínimo de protección aceptado por la OMS y la OMSA) al igual que el grupo control (sin esterilización).

En cuanto a VPC y VDC no se ven diferencias significativas entre el grupo control y el

Se concluye que la inmunización resulta efectiva durante la esterilización quirúrgica contra la rabia. Sin embargo, para Parvovirus y Distemper canino se deberá profundizar con ensayos similares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha P.N., y Szyfres, B. (2003). *Virosis, Rabia*. En P.N. Acha y B. Szyfres, *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales* (3a ed. Vol.2, pp. 351-374). Washington: Pan American Health Org.

Altman, K. D., Kelman, M., y Ward, M. P. (2017). Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for canine parvovirus vaccine failure?. *Veterinary Microbiology*, 210, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.019>

Angele, M.K., y Faist E. (2002). Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*, 6, 298-305.

Barrat, J., y Aubert, M.F.A. (1995). Diagnostic de la rage animale en France de 1991 à 1993, bilan de CNEVA laboratoire d'études sur la rage et la pathologie des animaux sauvages en France. *Revue de Medecine Veterinaire*, 146, 561-566

Bergmann, M., Holzheu, M., Zablotzki, Y., Speck, S., Truyen, U., Straubinger, R.K., y Hartmann, K. (2021). Comparison of four commercially available point-of-care tests to detect antibodies against canine parvovirus in dogs. *Viruses*, 13(1), 18. <https://doi.org/10.3390/v13010018>

Bernard, S., Shen, D., y Gorham, J. (1982). Antigen requirements and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of canine IgG against canine distemper viral antigens. *American Journal of Veterinary Research*, 43, 2266-2269.

Carmichael, L. E., Joubert, J. C., y Pollock, R. V. (1983). A modified live canine parvovirus vaccine: II. Immune response. *Cornell Veterinarian*, 73, 13-19.

Casabone, V. (2015). *Diagnóstico y caracterización de patógenos virales caninos en Uruguay* (Tesina de grado). Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.

Castilho, J.G., de Souza, D.N., Oliveira, R.N., Carnieli, P.Jr, Batista, H.B.C.R., y Pereira, P.M.C. (2017) The epidemiological importance of bats in the transmission of rabies to dogs and cats in the state of São Paulo, Brazil, between 2005 and 2014. *Zoonoses Public Health*, 64(6), 423-430.

De Pedro Jose (2006) Vacunaciones y desparasitaciones en perros y gatos. Elsevier, Vol. 20. Núm. 3. páginas 58-63.

Elia, G., Cavalli, A., Cirone, F., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, D., y Tempesta, M. (2005). Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 52, 320-322.

Eugster, A. K., Bendele, R. A., y Jones, L. P. (1978). Parvovirus infections in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 173, 1340-1341.

Feijóo Chácharo, G. (2020.). *Distemper canino: seguimiento desde la presentación clínica hasta sus hallazgos histopatológicos e inmunoquímicos* (Tesis de maestría). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.

Flores, E.F. (2007). *Virología Veterinaria*. Santa Maria: UFSM.

Filipov, C., Desario, C., Patouchas, O., Eftimov, P., Gruichev, G., Manov, V., y Decaro, N. (2016). A ten-year molecular survey on parvoviruses infecting carnivores in Bulgaria. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63, 460-464. <https://doi.org/10.1111/tbed.12285>

Fooks, A., Banyard, A., Horton, D., Johnson, N., McElhinney, L., y Jackson, A. (2014). Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet*, 384, 1389-1399. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62707-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62707-5)

Fuques, E., Tomás, G., Grecco, S., Condon, E., Techera, C., Marandino, A., Panzera, Y. (2022). Origin and spreading of canine morbillivirus in South America. *Virus Research*, 319, 198858. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198858

Franco, G., y Puentes, R. (2020). Pautas para la vacunación en caninos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 56(213), e20202135605. <https://doi.org/10.29155/vet.56.213.5>.

Frantchez, V., y Medina, J. (2018). Rabia: 99,9% mortal, 100% prevenible. *Revista Médica del Uruguay*, 34(3), 164-171. doi:10.29193/RMU.34.3.5

Freitas, L., Leme, R., Saporiti, V., Alfieri, A. A., y Alfieri, A. F. (2018). Molecular analysis of the full-length F gene of Brazilian strains of canine distemper virus shows lineage cocirculation and variability between field and vaccine strains. *Virus Research*, 264, 8-15.

Eliopulos, N., Finger, P., Nunes, C., Castro, C., Moreno, J., Hubner, S., y Puentes, R. (2010). Immune Response to canine Parvovirus (CPV): Comparison of antibody to CPV-2 and CPV-2c in unvaccinated dogs. En *XXI Encontro Nacional de Virologia, V Encontro de Virologia do Mercosul*. Gramado, RS, Brasil.

Ernst, S., Martin, R., y Thibaut, J. (1992). Distribución temporal de la parvovirusosis clínica en una población canina hospitalaria de Valdivia, Chile (1981-1990): distribución temporal y determinantes climáticos. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 2, 99-104.

Goddard, A., y Leisewitz, A. L. (2010). Canine parvovirus. *The Veterinary Clinic of North America. Small Animal Practice*, 40(6), 1041-1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>

González, J. C., Briano, D., y Guarino, H. (2009). Primer registro para el Uruguay de rabia en un murciélago no hematófago *Tadarida brasiliensis* (Chiroptera Molossidae). *Veterinaria (Montevideo)*, 45(173-176), 31-32.

Guarino, H., Castilho, J.G., Souto, J., Oliveira, R. de N., Carrieri, M.L., y Kotait I. (2013). Antigenic and genetic characterization of rabies virus isolates from Uruguay. *Virus Research*, 173, 415-420.

Guerrero Bergara, H., y Machin Díaz, F. (2013.). *Encuesta epidemiológica de la situación actual de la parvovirus canina en las clínicas veterinarias de la ciudad de Montevideo* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo.

Grecco, S., Iraola, G., Decaro, N., Alfieri, A., Alfieri, A., Gallo Calderón, M., ... Pérez, R. (2018) Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evolution*, 4(1), vey011.

Green, C.E., y Appel, M. (1998). Canine distemper. En C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 9-22). Philadelphia: WB Saunders.

Green, C.E., y Appel, M.J. (2006). Canine distemper. En C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (3ª ed., pp. 25-41). St Louis: Saunders Elsevier.

Green, C.E., y Dreesen, D.W. (1993). Infecciones virales, rickettsiales y micoplasmicas. Rabia. En E.E. Green, *Enfermedades infecciosas perros y gatos* (2ª ed., pp. 383-402). México: Interamericana McGraw-Hill.

INBA alcanzó cifra inédita de chipeo y castración de perros, y se propone superarla. Montevideo Portal. Recuperado de <https://www.montevideo.com.uy/Noticias/INBA-alcanzo-cifra-inedita-de-chipeo-y-castracion-de-perros-y-se-propone-superarla-uc841425>

Jackson, A.C. (2016). Human rabies: a 2016 update. *Current Infectious Disease Reports*, 18(11), 38.

Johnson, N., Cunningham, A.F., y Fooks, A.R. (2010). The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, 28, 3896-3901.

Krakowka, S., y Koestner, A. (1976). Age-related susceptibility to infection with canine distemper virus in gnotobiotic dogs. *Journal of Infectious Diseases*, 134, 629-632.

Kramer, J. M., Meunier, P. C., y Pollock, R. V. (1980). Canine parvovirus: Up date. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician*, 75, 1541-1555.

Kristen, B., y Vandelerde, M. (1978). Immunofluorescence studies of canine distemper encephalitis on paraffin-embedded tissue. *American Journal of Veterinary Research*, 39, 1017-1021

Lackay, S.N., Kuang, Y., y Fu, Z.F. (2008). Rabies in small animals. *Veterinary Clinician of North America: Small Animal Practice*, 38(4), 851-861.

Lempp, C., Spitzbarth, I., Puff, C., Cana, A., Kegler, K., Techangamsuwan, S., ... Seehusen, F. (2014). New aspects of the pathogenesis of canine distemper leukoencephalitis. *Viruses*, 6, 2571-2601.

López-Bago, A., González Reyes, R.E., Ruíz Santana, J. E., y Rivera Jiménez, J. (2018). Inmunidad e inflamación en el proceso quirúrgico. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 61(4), 7-15. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422018000400007&lng=es&tlng=es.

Martella, V., Blixenkrone-Møller, M., Elia, G., Lucente, M. S., Cirone, F., Decaro, N., ... Buonavoglia, C. (2011). Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rockborn strain. *Vaccine*, 29(6), 1222-1227.

Maya, L., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Iraola, G., Panzera, Y., ... Pérez, R. (2013). Phylodynamic analysis of canine parvovirus in Uruguay: evidence of two successive invasions by different variants. *Archives of Virology*, 158(6), 1133-41.

Ministerio de Salud Pública. (2017). Boletín Epidemiológico, 2. Recuperado de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20Agosto%202017.%2008.17.pdf>

Ministerio de Salud Pública, Uruguay, (2021). Comunicado caso de rabia humana en Argentina. Recuperado de file:///C:/Users/pablo/Downloads/Comunicado%20caso%20de%20rabia%20humana%20en%20Argentina%2024_05_2021.pdf

Ministerio de Salud Pública. (2023) Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/comunicado-murcielago-positivo-virus-rabico-montevideo>

Miyamoto, T., Taura, Y., Une, S., Yoshitake, M., Nakama, S., y Watanabe, S. (1995). Immunological responses after vaccination pre- and post-surgery in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57(1), 29-32. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.29>.

Moreno, J., Burghi, N., Piaggio, J., y Puentes, R. (2012) Respuesta inmune de caninos vacunados contra el virus de la rabia. *Veterinaria (Montevideo)*, 48(186) 19-22.

Nandi, S., Chidri, S., Kuma, M., y Chauhan, R.S. (2010). Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with hemorrhagic enteritis in India. *Research in Veterinary Science*, 99(1), 169-171. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.05.018>

Hurtado, D. (2012). *Nueva perspectiva de la parvovirus canina en el sur del valle de Aburra*. (Tesis de Médico Veterinario). Corporación Universitaria Lasallista, Antioquía.

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). Recuperado de https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES%20.pdf

Organización Panamericana de la Salud. (2005). *Eliminación de la rabia humana transmitida por perros en América Latina: análisis de la situación*. Washington: PAHO.

Organización Panamericana de la Salud. (2015). Alerta epidemiológica: Rabia. Recuperado de http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=46&Itemid=40766&lang=es

Pollock, R. V., y Carmichael, L. E. (1980). Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: Transfer, decline, and interference with vaccination. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 180, 37-42, 1982.

Puentes, R., Calero, D., Caresani, B., Eliopulos, N., Suárez, G., Silva, A.C.R., y Batista, H.B.C.R. (2016). Respuesta a la vacunación contra el virus de la rabia en perros inmunizados durante el acto quirúrgico o bajo efecto de drogas inmunomoduladoras. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(203), 3. Recuperado de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-48092016000300003&lng=es&tlng=es

Puentes, R., Eliopulos, N., Pérez, R., Franco, G., Sosa, K., Bianchi, P., ... Esteves, P.A. (2012). Isolation and characterization of canine parvovirus type 2C (CPV-2C) from symptomatic puppies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1005-1009.

- Reese, M.J., Patterson, E.V., Tucker, S.J., Dubovi, E.J., Davis, R.D., Crawford, P.C., y Levy, J.K. (2008). Effects of anesthesia and surgery on serologic responses to vaccination in kittens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 233, 116-121.
- Romero, R., Aranda, E., Godoy, F., y Watty, A. (2007). Immunohistochemical diagnosis of canine parvovirus-2 (cpv-2) in domestic dogs. *Veterinaria México*, 38(1), 41-53.
- Singh, K., Rupprecht, C.E., y Bleck, T.P. (2015). Rabia (rabdovirus). En J.E. Douglas Bennett, R. Dolin, y M.J. Blaser (Ed.), *Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades infecciosas. Principios y práctica* (8ª ed., 2256-2266). Madrid: Elsevier.
- Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y., y Parrish, C.R. (1994). Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*, 198, 175-184.
- Summers, B.A., y Appel, M.J.G. (1994). Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 20, 525-534.
- Tamimi, N. (2017). Prevalence of diseases in the canine referred to a private practice in Baghdad in 2015-2016. *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences*, 8, 16-23.
- Taura, Y., Ishi, K., Nagami, M., Mikasa, N., Nakaichi, M., y Nakama, S. (1995). Changes in lymphoproliferation and DTH responses after vaccination immediately before surgery in puppies. *Journal of Veterinary Science*, 57(5), 899-904.
- Troutt, H. (1972). Fluid and electrolyte therapy for diarrhea. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 8, 214-223.
- Walsh, F. (2009). Human-animal bonds I: the relational significance of companion animals. *Family Process*, 48(4), 462-480. <https://doi.org/10.1111/j.1545-5300.2009.01296.x>
- Welborn, L., DeVries, J., Ford, R., Franklin, R., Hurley, K., McClure, K., ... Schultz, R. (2011). 2011 AAHA Canine Vaccination Guidelines. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(5), 1-42.
- Woods, C. B., Pollock, R. V., y Carmichael, L. E. (1980). Canine parvoviral enteritis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 16, 171-179.
- World Health Organization. (2022). *Rabies: In rabies information system of the WHO collaboration centre for rabies surveillance and research*. Recuperado de https://www.who.int/health-topics/rabies#tab=tab_2
- Wright, N., Cornwell, A., Thompson, H., y Lauder, I. (1974). Canine distemper: current concepts in laboratory and clinical diagnosis. *Veterinary Record*, 94, 86-92.

