

**INMUNIDAD EN PARVOVIROSIS CANINA
I. CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA REACCION
DE INHIBICION-HEMOAGLUTINACION EN LA
PARVOVIROSIS CANINA**

**(IMMUNITY IN CANINE PARVOVIROSIS
I. A CONTRIBUTION TO THE HAEMAGGLUTINATION-
INHIBITION TEST STUDY IN CANINE PARVOVIROSIS)**

*Por J. Rejas López *
F. Rejas García *
P. García Partida *
F. Fernández Alvarez **

Palabras claves: Parvovirus canina, Inhibición-Hemaglutinación.
Key words: Canine parvovirus, Haemagglutination inhibition.

SUMMARY

We have performed a study about the influence on the haemagglutination inhibition (HI) test of several treatments of the sera, from "Mastín Español" dogs with different ages, tending to eliminate antibodies, natural haemagglutinins and nonspecific inhibitors, realizing that with sera treatment by pig red blood cells, to remove natural haemagglutinins, an average percentual fall of 49,15 in HI titers is produced, and with pig erythrocytes and kaolin treatment, for removing natural haemagglutinins and nonspecific inhibitors of HA, a high decrease of HI titers, about 10 times lesser, is observed.

With the analysis of these results, and taking into account the several variants which may influence the HI test, we consider its standardization necessary.

* Dpto. Patología Animal: Medicina Animal. Univ. León.

An. Fac. Vet. León. 1988, 34, 29-39

RESUMEN

Se ha realizado un estudio de la influencia, sobre la reacción de Inhibición-Hemoaglutinación, de diferentes tratamientos de los sueros, procedentes de perros de raza Mastín Español con diversas edades, tendentes a eliminar anticuerpos y hemoaglutininas naturales, e inhibinas inespecíficas, observándose que con el tratamiento de los sueros con glóbulos rojos de cerdo, para la eliminación de hemoaglutininas naturales, se provoca una caída porcentual media del 49,15% en los títulos IHA, y con tratamiento con eritrocitos de cerdo y con caolín, para la eliminación de hemoaglutininas naturales e inhibinas inespecíficas de la hemoaglutinación, se provoca una alta disminución de los títulos IHA, del orden de diez veces.

Tras el análisis de estos resultados, y teniendo en cuenta los diversos factores que pueden influenciar la prueba IHA, se estima la necesidad de estandarizar esta técnica.

INTRODUCCION

La reacción de inhibición de la hemoaglutinación^{3, 4, 13, 15, 23}, por su sencillez y fuerte correlación con la de seroneutralización^{3, 21} se ha convertido en la técnica más frecuentemente utilizada en el diagnóstico serológico de la parvovirus canina y en la determinación del grado de inmunidad contra la misma.

Sin embargo las técnicas de investigación de los anticuerpos hemoaglutinantes empleadas por los diversos autores, a pesar de su fiabilidad, adolecen de defectos de estandarización, lo que hace que se observe una gran variabilidad en los resultados incluso entre valoraciones realizadas sobre los mismos sueros por diferentes laboratorios¹³.

En general, la técnica utilizada es la de microtitulación. Los glóbulos rojos empleados son generalmente de cerdo^{1, 2, 3, 8, 14, 15, 18, 23, 26}, aunque han sido utilizados los de gato^{16, 17}, macaco "crab-eating"¹⁰ y macaco rhesus²⁵.

La concentración de hematíes empleada es muy variable, 1%^{1, 2, 3, 14, 19, 23, 26}, 0,5%²⁵ y 30×10^6 /ml.⁸ para glóbulos rojos de cerdo y, $42,5 \times 10^6$ /ml.¹⁶ y 0,25%¹⁷ para hematíes de gato. Numerosos autores no mencionan en sus trabajos la concentración utilizada a pesar de la gran influencia que tiene, al existir una relación inversa entre la concentración de eritrocitos y el título hemoaglutinante del parvovirus canino, disminuyendo éste a la mitad por cada aumento en un 0,5% de la concentración de glóbulos rojos³.

En las técnicas de lavado de los hematíes se observan también diferencias, utilizándose bien solución salina fisiológica o tampón fosfato salino pH 7,2, con diferentes velocidades de centrifugación^{2, 26}.

El tratamiento por calor, con el objeto de inactivar al máximo los anticuerpos naturales y complemento del suero, supone también otra fuente de variabilidad, ya que a pesar de que la mayoría de los autores realizan la técnica clásica, tratamiento a 56 °C durante 30 minutos, algunos tratan a 56 °C con tiempos de 20 minutos⁵ o de una hora²⁶.

Respecto a la necesidad o interés del tratamiento de los sueros problemas, para la eliminación de isoaglutininas para los eritrocitos de cerdo y de las inhibinas no específicas de la hemoaglutinación, no existe unanimidad entre los diversos autores.

Las isoaglutininas, o hemoaglutininas naturales, provocan hemoaglutinación inespecífica de los hematíes de cerdo. La eliminación de las mismas por adsorción con glóbulos rojos idénticos a los que se utilizarán en la reacción es norma habitual de todos los autores, aunque difieren en las técnicas de tratamiento.

Se trabaja con eritrocitos a diversas concentraciones, al 50%^{2, 3, 14, 25}, o al 10%²⁶, con temperaturas y tiempos de reacción diferentes, 4 °C, 2-3 horas²; temperatura ambiente, dos horas o una noche a 4 °C³; a 4 °C, una hora²⁵; a 25 °C, una hora²⁵; etc.

Por otra parte existen determinadas sustancias en los sueros problema, en mayor o menor concentración, con capacidad de inhibir la hemoaglutinación vírica.

Estas inhibinas, α , β y γ , del grupo de las mucinas, mucoproteínas y lipoproteínas, con diferentes grados de termoestabilidad, detectadas, aparte del suero, en secreciones y otros sustratos biológicos, en líquido corioalantoideo, en albúmina de huevo y en numerosos extractos microbianos, se comportan frente a las hemoaglutininas víricas, como los receptores celulares de los hematíes, impidiendo por competición la adsorción del virus a la superficie de los mismos^{7, 22}.

La eliminación de las inhibinas inespecíficas en los sueros problema, es valorada de forma diferente por diversos autores.

Para algunos, en parvovirus canina, y teniendo en cuenta por una parte que las técnicas aplicadas para la eliminación de las mismas, reducen la especificidad de la prueba sin incrementos de la sensibilidad y con reducción de títulos de 2-4 veces²¹ y, por otra, que la concentración de las inhibinas inespecíficas es pequeña, no superior a 320 u IHA $-2,5 \log_{10}$, y los títulos de anticuerpos IHA específicos son muy altos tanto los de infección como los vacunales³, consideran a estos tratamientos como no esenciales para la fiabilidad de la prueba, recomendando su no utilización.

Otros autores consideran, sin embargo, necesarios estos tratamientos en las pruebas de IHA en otras parvovirus animales, panleucopenia felina²⁷ y parvovirus porcina¹².

La eliminación de las mismas, puede realizarse:

- 1.- Por calentamiento, a 56 °C y treinta minutos, con lo que se eliminan las inhibinas termolábiles, pero no las termoestables.
- 2.- Por congelación a -24 °C, con eliminación de parte de las mismas.
- 3.- Por tratamiento con ácido periódico.
- 4.- Por tratamiento con tripsina.
- 5.- Por tratamiento con la Enzima Destructora de Receptores -RDE-.
- 6.- Por adsorción con caolín lavado.

La técnica más utilizada por su sencillez es esta última, con tratamiento con caolín lavado por ácido, y tras un periodo de adsorción determinado, eliminación del caolín, en el que se encuentran las inhibinas adsorbidas, por centrifugación.

El tratamiento de los sueros con caolín, en el caso de utilizarse, es otra nueva fuente de variabilidad en la reacción. Numerosos autores no especifican la técnica utilizada^{8, 11, 15, 19, 24}; otros utilizan diferentes concentraciones finales de caolín, 25%^{2, 26}, 10%²⁵, a temperatura ambiente durante veinte minutos², o treinta minutos²⁵, o veinte minutos a 25 °C²⁶, con centrifugación a diversas velocidades y tiempos^{2, 25, 26}.

Respecto a la reacción en sí, se observa también una fuerte variabilidad en las técnicas empleadas en la misma.

Las unidades hemoaglutinantes empleadas, varían entre 4-8^{1, 2, 3, 15, 16, 18, 19} y 8-16^{8, 14, 21, 25}. Existe una relación inversa entre el título IHA de un suero y la dosis hemoaglutinante usada, aumentando dos veces el título IHA por cada disminución a la mitad de la dosis hemoaglutinante³.

El pH utilizado en la reacción varía entre 5,8 para glóbulos rojos de macaco rhesus²⁵, 6,8², 7,0²¹ e incluso 7,2¹⁹ para hematíes de cerdo, siendo numerosos los autores que no mencionan el pH con el que han trabajado, a pesar de la fuerte influencia del mismo en los resultados obtenidos.

La relación entre volúmenes de suero problema, virus y hematíes es variable oscilando, en ml., entre 0,025-0,025-0,05^{1, 2, 3, 16}; 0,05-0,05-0,05⁸; y 0,25-0,025-0,25²⁶.

La temperatura y tiempo de la primera fase de la reacción, suero-virus, oscila fuertemente, 4 °C y treinta minutos²⁵; 4 °C y sesenta minutos²⁶; temperatura ambiente y sesenta minutos^{1, 2, 3, 5}; 20 °C y sesenta minutos¹⁹; 22 °C y sesenta minutos^{8, 16}; 37 °C y sesenta minutos¹⁵, siendo numerosos los autores que no lo citan en sus trabajos.

La temperatura y tiempo de la segunda fase, suero-virus-glóbulos rojos, varían entre 2-4 °C con tiempos de una y media, dos, tres, cuatro, doce, dieciocho horas y una noche^{1, 2, 3, 8, 14, 15, 16, 19, 25, 26}. Los glóbulos rojos de cerdo son aglutinados, por el parvovirus canino, a 4 °C^{6, 9, 20}, 22 °C²⁰ y 25 °C⁹ pero no a 37 °C^{9, 20}.

En base a estos antecedentes, y al disponer de un gran número de sueros de perros de la raza Mastín Español, en los que se estaba determinando la cinética de anticuerpos IHA, se decidió estudiar la influencia de la reacción de Inhibición-Hemoaglutinación para la eliminación de los anticuerpos naturales, isoaglutininas e inhibinas inespecíficas, en sueros procedentes de animales de edades diferentes, con títulos muy variables y con anticuerpos de origen maternal o de vacunación.

MATERIAL Y METODOS

El estudio se ha realizado sobre 109 muestras de sangre de cuarenta y dos perros de diversas edades de la raza Mastín Español.

1.- Muestras de suero:

Tras la extracción estéril de sangre sobre tubos de vidrio, coagulación y retracción del coágulo a temperatura de laboratorio durante una noche, el suero extraído se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante diez minutos, congelándose y conservándose, a -20 °C, hasta el momento de su titulación. La descongelación se realizó a temperatura ambiente.

2.- Material y reactivos:

Microdiluidores y pipetas de 0,05 ml.
Tampón fosfato salino pH 7,2 (Biomerieux) a 4 °C.
Tampón BABS pH 8,95 (Biomerieux) a 4 °C.
Caolín al 25% en tampón boratado pH 8,6. (Biomerieux) a 4 °C.
Albúmina bovina en polvo (Biomerieux).
Glóbulos rojos de cerdo al 1 y 50% a 4 °C.
Solución Alsever (Biomerieux).
Microplacas de 96 pocillos con fondo en U.
Solución salina fisiológica al 0,85% de ClNa a 4 °C.

3.- Preparación de los glóbulos rojos de cerdo:

La sangre de cerdo recogida en matadero directamente de la incisión a la entrada del pecho, se vierte inmediatamente, sobre solución Alsever en proporción 1:1, manteniéndola en refrigeración (4 °C) al menos doce horas.

Seguidamente se realizan tres lavados con una solución salina fisiológica de ClNa al 0,85% con centrifugaciones, entre las mismas, a 1.500 r.p.m. durante diez minutos.

Tras la determinación del volumen globular empaquetado, por centrifugación a 11.000 r.p.m. durante cinco minutos, se prepararon suspensiones de eritrocitos al 1% y al 50% [en PBS] con un 0,1% de albúmina sérica bovina, descartándose las suspensiones de hematíes con hemólisis.

Las suspensiones de eritrocitos, conservadas a 4 °C, se utilizan durante un tiempo máximo de cuatro días.

4.- Reacción de hemoaglutinación:

Se realizan diluciones del virus al doble en PBS con un 1% de BABS hasta un máximo de doce diluciones (1:4096) en un volumen de 0,05 ml.

Se añaden a continuación 0,05 ml. de PBS con un 1% de BABS y, posteriormente, 0,05 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 1%.

Se mantiene la placa durante 2-3 horas a 4 °C (hasta que los controles de glóbulos rojos se hayan depositado completamente) y se efectúa la lectura.

Tras efectuar ésta, se realiza la dilución de virus necesaria sobre agua destilada para lograr 4-8 (mínimo de cuatro y máximo inferior a ocho) unidades hemoaglutinantes en 0,05 ml.

5.- Pretratamientos de las muestras de suero:

Se han realizado tres diferentes tratamientos del suero para intentar eliminar los anticuerpos naturales, las isoaglutininas y las inhibinas no específicas.

Inactivación del suero para la eliminación de anticuerpos naturales, denominado en el trabajo como IS (Inactivación Suero).

Inactivación del suero para la eliminación de anticuerpos naturales y, adsorción por glóbulos rojos de cerdo para la eliminación de isoaglutininas, denominado en el trabajo como GRC (Glóbulos Rojos de Cerdo).

Inactivación del suero para la eliminación de anticuerpos naturales, adsorción por glóbulos rojos de cerdo para la eliminación de isoaglutininas y tratamiento por caolín para la eliminación de las inhibinas inespecíficas, denominado en el trabajo como GRK (Glóbulos Rojos y Kaolín).

Técnica IS:

La inactivación del suero problema se realiza tras el tratamiento de 0,05 ml. de la muestra a 56 °C durante treinta minutos en baño maría.

Seguidamente se realiza una dilución del suero tratado con 0,45 ml. de PBS con un 1% de BABS consiguiendo una dilución final del 1/10.

Técnica GRC:

Tras la inactivación de 0,05 ml. de la muestra de suero problema a 56 °C durante treinta minutos y dilución posterior sobre 0,45 ml. de PBS con un 1% de BABS, se añade 0,05 ml. de eritrocitos de cerdo al 50% y se mantiene una noche a 4 °C.

Se centrifuga, seguidamente, a 1.000 r.p.m. durante diez minutos recogiendo el sobrenadante y considerando la muestra diluida al 1/10, no habiéndose tenido en cuenta la dilución creada con el tratamiento con eritrocitos.

Técnica GRK:

Tras la inactivación de 0,05 ml. de la muestra del suero problema de idéntica forma a las técnicas anteriores, se diluye la misma con 0,45 ml. de BABS y 0,50 ml. de caolín al 25% manteniendo la mezcla en contacto durante treinta minutos con agitación frecuente. Seguidamente se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante diez minutos, recogiendo el sobrenadante.

A continuación se añaden 0,05 ml. de eritrocitos de cerdo al 50% sobre 0,5 ml. del sobrenadante y se mantiene la mezcla una noche a 4 °C, centrifugándola seguidamente a 1.000 r.p.m. durante diez minutos.

No teniéndose en cuenta la dilución creada por el tratamiento con eritrocitos, el sobrenadante obtenido se considera como suero diluido al 1/17,5.

6.- Técnica de inhibición de la hemoaglutinación:

Una vez tratadas las muestras de suero se realizan diluciones al doble con PBS con un 1% de BABS en un volumen de 0,05 ml. hasta un máximo de doce diluciones (1:4096).

Se añade, a continuación, 0,05 ml. del virus titulado (4-8 u HA) dejándolo incubar una hora a temperatura ambiente.

Se añade, posteriormente, 0,05 ml. de glóbulos rojos de cerdo al 1% y se incuba a 4 °C durante dos horas hasta que los controles sean negativos.

Se utilizan como controles un suero con título conocido, un control de glóbulos rojos de cerdo y se titula de nuevo el virus utilizado.

7.- Estudios estadísticos:

Se ha realizado la media y el error estándar de los valores estudiados.

Los valores estadísticos se han estudiado sobre el logaritmo de base diez de los valores obtenidos para eliminar la influencia de los valores dobles que se obtiene con este tipo de técnicas.

En todos los casos se expresa el valor medio obtenido, como valor no logarítmico, para facilitar su comprensión.

Los valores se expresan como el producto del inverso de la última dilución positiva por el número de unidades hemoaglutinantes utilizadas o como el logaritmo de base diez de este producto.

En la comparación de los tres pretratamientos realizados se han utilizado diversos métodos no paramétricos:

Análisis de Friedman.

Análisis de Kruskal-Wallis y

Test para dos muestras de Kolmorov-Smirnov.

8.- Observaciones:

Ante la falta de estandarización de la técnica IHA empleada por los diversos autores y con el objeto de facilitar en lo posible los estudios comparativos, todos los títulos IHA que figuran tanto en la Revisión Bibliográfica como en los Estudios Experimentales Realizados, se expresan en unidades totales inhibidoras de la hemoaglutinación, producto del inverso de la última dilución positiva por el número de unidades

hemoaglutinantes empleadas, expresados bien en cifras absolutas o en logaritmo de base 10.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se expresan en las Tablas I y II.

TABLA I
Relación entre las técnicas de pretratamiento de sueros

TECNICAS	Media \pm Error	n	Máx.	Mín.	%
IS : GRC	0,29 \pm 0,05	80	1,20	-0,30	50,87
IS : GRK	0,98 \pm 0,05	80	2,17	0,06	10,38
GRC : GRK	0,69 \pm 0,05	80	1,86	-0,24	20,41

Los cálculos se realizaron sobre los 80 sueros que no dieron negativos, en ninguna de las técnicas, en la primera dilución.

El % representa el porcentaje medio del título de la segunda técnica respecto a la primera -en valor no logarítmico-.

IS.....Tratamiento del suero con calor.

GRC...Tratamiento del suero con calor y eritrocitos de cerdo.

GRK...Tratamiento del suero con calor, eritrocitos de cerdo y caolín.

1.- Diferencias entre las técnicas realizadas:

En el estudio comparativo de los diferentes pretratamientos del suero para la eliminación de anticuerpos naturales, hemoaglutininas naturales e inhibinas inespecíficas de la hemoaglutinación (Técnicas IS, GRC y GRK) se observan fuertes variaciones entre los títulos obtenidos con los mismos (Tabla I).

El título medio de las muestras de suero tratadas con hematíes de cerdo (Técnica GRC), con el fin de eliminar las isoaglutininas, respecto de las no tratadas (Técnica IS) es del 50,87%. Estos valores se mueven entre un 200% y un 6,25% (Tabla I).

Si se hace un tratamiento previo con caolín, al de los glóbulos rojos, (Técnica GRK) con el fin de eliminar inhibinas no específicas de la hemoaglutinación, se produce una disminución aún mayor en estos títulos. Los títulos varían entre un 87,50% y un 0,68 % respecto al título de los sueros inactivados (Técnica IS), con una media de un 10,38% (Tabla I).

Las variaciones encontradas entre las tres técnicas son significativas en base a estudios estadísticos no paramétricos.

La diferencia entre estas técnicas está acentuada en títulos bajos y consecuentemente en edades en que estos títulos son menores (Tabla II).

El título de los sueros tratados con eritrocitos porcinos (Técnica GRC) es menor del 20% respecto de los no tratados, a la edad de 22 y 52 días y con títulos del suero inactivado $\leq 2,8 \log_{10}$; y mayores del 50%, variando hasta cerca del 90%, con títulos $\geq 2,8 \log_{10}$ y tras la primovacunación (Tabla II).

TABLA II
Variación entre las técnicas por edades y títulos

IS-GRC	Media \pm Error	n	(*)	%
Día 22	$\geq 0,77 \pm 0,06$	21	(3)	$\leq 16,82$
Día 52	$\geq 0,68 \pm 0,09$	11	(4)	$\leq 20,69$
Día 73	$0,14 \pm 0,12$	11		72,97
Día 90	$0,15 \pm 0,07$	10		70,71
Día 111	$0,05 \pm 0,07$	11		88,16
IS $\leq 2,8$	$\geq 0,60 \pm 0,06$	28	(9)	$\leq 24,95$
IS $> 2,8$	$0,29 \pm 0,05$	75		50,93
IS-GRK	Media \pm Error	n	(*)	%
Día 22	$\geq 0,90 \pm 0,09$	21	(9)	$\leq 12,98$
Día 52	$\geq 0,63 \pm 0,08$	11	(8)	$\leq 23,30$
Día 73	$0,80 \pm 0,11$	11		15,96
Día 90	$0,96 \pm 0,11$	10		10,94
Día 111	$0,96 \pm 0,08$	11		10,94
IS $\leq 2,8$	$\geq 0,56 \pm 0,05$	28	(22)	$\leq 27,58$
IS $\leq 2,8$	$\geq 1,05 \pm 0,04$	75	(1)	$\leq 8,93$

Las variaciones medias entre las técnicas se han determinado eliminando los valores negativos para la primera dilución del IS y considerando como 1,6 o 1,85 los títulos menores de 1,9 o 2,15 en GRC o GRK respectivamente.

(*) El número de valores entre paréntesis representa los valores $< 1,9$ o $< 2,15$ respectivamente.

En el día 52 se eliminaron los cachorros 67 y 68 por haber contactado con virus salvaje. El % representa el porcentaje medio del título de GRC/GRK respecto al del IS.

IS.....Tratamiento del suero con calor.

GRC...Tratamiento del suero con calor y eritrocitos de cerdo.

GRK...Tratamiento del suero con calor, eritrocitos de cerdo y caolín.

Los sueros inactivados tratados conjuntamente con hematíes de cerdo y caolín (Técnica GRK) dan títulos menores del 30% en todos los casos, rondando generalmente sobre el 10%, respecto al título del suero solamente tratado a 56°C durante treinta minutos (Técnica IS) (Tabla II).

DISCUSION

1.- Influencia de los pretratamientos de los sueros en los títulos IHA

Tras el análisis de los resultados obtenidos; Tabla I, valores medios según las técnicas de tratamiento de las muestras de suero naturales, realizadas para la elimina-

ción de hemoaglutininas naturales e inhibinas inespecíficas; y Tabla II, estos mismos valores en función de la edad del cachorro en el momento de la determinación y de los títulos, se puede observar:

1.1.- Efectos del tratamiento en la eliminación de hemoaglutininas naturales

En el conjunto de todos los resultados, muestras de diversas edades, con diferentes títulos, anticuerpos de origen maternal o de vacunación, sobre ochenta valores analizados de los ciento nueve obtenidos, por la eliminación de los resultados obtenidos por cualquiera de las técnicas con valores negativos a la primera dilución, se observa una caída porcentual media de títulos del 49,13% con la técnica GRC respecto a la IS.

La caída porcentual de títulos es superior en sueros con títulos IS bajos, $\leq 2,8 \log_{10}$, y edades tempranas, veintidós y cincuenta y dos días de vida, que en sueros con títulos IS altos, $\geq 2,8 \log_{10}$, y con mayor edad, setenta y tres, noventa y ciento once días, del orden del 75-80% en el primer caso y menor del 50%, hasta un 12%, en el segundo.

La interpretación de estos resultados no es totalmente clara, quizás por el hecho de no conocer con exactitud la naturaleza y origen de las hemoaglutininas naturales séricas del perro, y a pesar de que, por una parte, parecen existir mayores valores porcentuales en muestras con títulos IHA bajos y a edades en que éstos lo son y, por otra, que el 68,75% de las muestras se mueven dentro de un rango en que los títulos entre ambas técnicas varían un máximo de dos veces, se estima que sería necesario realizar en el futuro estudios más profundos para tratar de aclarar estos hechos.

1.2.- Efecto del tratamiento en la eliminación de inhibinas inespecíficas

El tratamiento de los sueros con caolín provoca una disminución altamente significativa de los títulos, del orden de cinco veces (Tabla I), similar al observado a través de los resultados obtenidos por otros autores^{21, 23}.

Por otra parte se observa que en el 60% de las muestras la disminución del título oscila de 5-10 veces tras el tratamiento con caolín.

En base a estos resultados, y teniendo en cuenta que según diversos autores²¹ esta técnica reduce la especificidad sin aumento de la sensibilidad, se estima que su aplicación puede no estar totalmente justificada, y como en el apartado anterior serían necesarias nuevas investigaciones, para dilucidar el interés de su utilización.

Tras el análisis de los valores obtenidos con las diversas técnicas de pretratamiento de los sueros, al suponer las mismas una fuente importante de variabilidad por las modificaciones provocadas en los títulos, y teniendo en cuenta los innumerables factores que pueden afectar a la reacción IHA, se estima al igual que otros autores^{3, 13}, la necesidad de estandarizar esta técnica tras un estudio profundo de la misma.

BIBLIOGRAFIA

- 1) APPEL, M.J.G.; SCOTT, F.W. y CARMICHAEL, L.E. (1979). Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.*, 105: 156-159.
- 2) AZETAKA, M.; HIRASAWA, T.; KONISHI, S. y OGATA, M. (1981). Studies on canine parvovirus isolation, experimental infection and serologic survey. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43: 243-255.

- 3) CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. y POLLOCK, R.V.H. (1980). Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 784-791.
- 4) CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. y POLLOCK, R.V.H. (1981). A modified live canine parvovirus strain with novel plaque characteristics. I. Viral attenuation and dog response. *Cornell Vet.*, 71: 408-427.
- 5) CARMICHAEL, L.E.; JOUBERT, J.C. y POLLOCK, R.V.H. (1983). A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response. *Cornell Vet.*, 73: 13-29.
- 6) CELER, V. (1984). Prukaz parvoviru psu hemaglutinacnim testem. *Veterinarni Medicina*, 29: 373-378.
- 7) CUNNINGHAM, C.H. (1971). *Virología práctica*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- 8) DAVOUST, B.; MULLER, G. y CHAPPUIS, G. (1985). Parvovirose canine: sondage sérologique. *Rec. Méd. Vét.*, 161: 323-328.
- 9) EUGSTER, A.K. (1980). Studies on canine parvovirus infections: development of an inactivated vaccine. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 2.020-2.024.
- 10) FLORENT, G. (1986). Enzyme-linked immunosorbent assay for single serum diagnosis of canine parvovirus disease. *Vet. Rec.*, 119: 479-480.
- 11) ISHIBASHI, K.; MAEDE, Y.; OHSUGI, T.; ONUMA, M. y MIKAMI, T. (1983). Serotherapy for dogs infected with canine parvovirus. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 45: 59-66.
- 12) JOO, H.S.; DONALDSON-WOOD, C.R. y JOHNSON, R.H. (1976). A standardised haemagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibody. *Australian Vet. J.*, 52: 422-424.
- 13) LUFF, P.R.; WOOD, G.W.; HEBERT, C.N. y THORNTON, D.H. (1987). Canine parvovirus serology: a collaborative assay. *Vet. Rec.*, 120: 270-273.
- 14) MACARTNEY, L.; McCANDLISH, I.A.P.; THOMPSON, H. y CORNWELL, H.J.C. (1984). Canine parvovirus enteritis 2: Pathogenesis. *Vet. Rec.*, 115: 453-460.
- 15) MANSON, C. (1981). Contribution au diagnostic serologique de la parvovirose canine par la technique d'electrosynereze. Thèse. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- 16) MARJOLLET, S. (1982). Contribution a l'étude de la parvovirose canine. Transmission et décroissance des anticorps anti parvovirus chez le chiot. Thèse. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.
- 17) MORAILLON, A.; MORAILLON, R. y MARJOLLET, S. (1982). Sur les échecs de la vaccination du chiot contre la parvovirose en milieu contaminé. *Rec. Méd. Vét.*, 158: 205-214.
- 18) MORAILLON, A.; MORAILLON, R.; PERSON, J.M. y PARODI, A.L. (1980). Parvovirose canine: l'ingestion d'organes de vison atteint d'entérite a virus déclenche chez le chien une maladie identique a la maladie spontanée. *Rec. Méd. Vét.*, 156: 539-548.
- 19) MULVEY, J.J.; BECH-NIELSEN, S.; HASKINS, M.E.; JEZYK, P.F.; TAYLOR, H.W. y EUGSTER, A.K. (1980). Myocarditis induced by parvoviral infection in weanling pups in the United States. *J.A.V.M.A.*, 177: 695-698.
- 20) PARRISH, C.R.; OLIVER, R.E.; JULIAN, A.F.; SMITH, B.F. y KYLE, B.M. (1980). Pathological and virological observations of canine parvoviral enteritis and myocarditis in the Wellington region. *New Zealand Vet. J.*, 28: 238-241.
- 21) POLLOCK, R.V.H. (1981). Canine parvovirus: host-response and immunoprophylaxis. Ph. D. Thesis. Cornell University.
- 22) SCHMIDT, D. (1969). L'hémagglutination par les virus. En *Traité des maladies á virus des animaux*. Vigot Frères Editeurs. Paris.
- 23) SIMARRO, I.; CABALLERO, C.; CASTRO, J.M. y RUIZ GONZALVO, F. (1988). Prevalencia de anticuerpos frente a parvovirus canino y evaluación de diferentes técnicas para el diagnóstico serológico. *Medicina Veterinaria*, 5: 229-235.
- 24) SMITH, J.R. y JOHNSON, R.H. (1986). Observations on the use of an inactivated parvovirus vaccine. *Vet. Rec.*, 118: 385-387.
- 25) TINGPALAPONG, M.; WHITMIRE, R.E.; WATTS, D.M.; BURKE, D.S.; BINN, L.N.; TESAPRATEEP, T.; LAUNGTONGKUM, S. y MARCHWICKI, R.H. (1982). Epizootic of viral enteritis in dogs in Thailand. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1.687-1.690.
- 26) WALKER, S.T.; FEILEN, C.P.; SABINE, M.; LOVE, D.N. y JONES, R.F. (1980). A serological survey of canine parvovirus infection in New South Wales, Australia. *Vet. Rec.*, 106: 324-325.
- 27) WOSU, L.O. (1984). In vitro studies on feline panleucopenia virus. Standardisation of hemagglutination inhibition test for feline panleucopenia virus antibody. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 7: 201-206.