



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

**Producción y titulación de anticuerpos en inmunosuero de llama (*Lama glama*)
contra el virus del distemper y parvovirus canina.**

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Sanidad animal	Inmunología	

3. Duración del proyecto (meses)

Doce meses

4. Tipo de proyecto

Individual	<input checked="" type="radio"/>
Multidisciplinario	<input type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Alberto Ccama Sulca
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	935819938
Correo Electrónico	accama@unap.edu.pe

- I. Título (El proyecto de tesis debe llevar un título que exprese en forma sintética su contenido, haciendo referencia en lo posible, al resultado final que se pretende lograr. Máx. palabras 25)

**Producción y titulación de anticuerpos en inmunosuero de llama (*Lama glama*)
contra el virus del distemper y parvovirus canina.**

- II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

La inmunoterapia es una alternativa para el tratamiento de enfermedades virales, que en la mayoría de los casos conllevan a la muerte del animal al no tener un tratamiento para la eliminación de los virus. El distemper y la parvovirus canina son dos enfermedades virales muy contagiosas que afectan principalmente a los cachorros y causan una alta mortalidad o discapacidad en los animales afectados.



Considerando que los camélidos y en este caso las llamas (*Lama glama*) tienen la capacidad de producir las Inmunoglobulinas convencionales y los nanoanticuerpos o inmunoglobulinas VHH, que actúan contra los patógenos que activaron su producción. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo producir y titular anticuerpos en inmunosuero de llamas (*Lama glama*) contra virus del distemper y parvovirus canina, para lo cual se adquirirá dos llamas clínicamente sanas y negativas a inmunoglobulinas o anticuerpos contra los virus de distemper y parvovirus canina evaluadas mediante un test de diagnóstico. Posteriormente se inyectará a una llama antígenos vacunales contra distemper canino y a la otra llama antígenos vacunales contra la parvovirus canina y después de 21 se les aplicará un refuerzo para inducir una mejor respuesta inmune y obtener inmunoglobulinas. Posterior a los 30 días de aplicación del refuerzo se tomarán muestras de sangre, cuatro veces cada 15 días y de ahí se obtendrá el suero los que serán depositadas en viales de 2 ml de capacidad para mantenerse en refrigeración. Para determinar la antigenicidad que se evaluarán mediante la prueba de ELISA indirecta para después titular la concentración de anticuerpos mediante la técnica de ELISA indirecta e inmunodifusión radial, que serán elaboradas para tal fin. Además, se purificarán los anticuerpos o Inmunoglobulinas mediante la técnica de precipitación con sulfato amónico. La obtención y titulación de Inmunoglobulinas o anticuerpos purificados se utilizarían en la inmunoterapia del distemper y parvovirus canina, previa evaluación de que no produzcan reacciones anafilácticas.

III. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

Anticuerpos, Inmunosuero, llama, distemper, parvovirus canina

IV. Justificación del proyecto (Describa el problema y su relevancia como objeto de investigación. Es importante una clara definición y delimitación del problema que abordará la investigación, ya que temas cuya definición es difusa o amplísima son difíciles de evaluar y desarrollar)

El virus del moquillo canino (VMC) es un virus ARN de cadena negativa envuelta que pertenece al género Morbillivirus, en la familia Paramyxoviridae. El VMC es altamente contagioso y se transmite por aerosol, causando una infección sistémica y a menudo fatal en carnívoros (Da Fontoura et al., 2016); La naturaleza de la enfermedad es variable y su curso depende en gran medida de las complejas interacciones entre las características biológicas del virus (atenuación, tropismo y polimorfismo genético) y el sistema inmune del hospedero (grado de madurez, refuerzo, especificidad y eficiencia) siendo este último uno de los principales factores en determinar el curso, consecuencias y letalidad de la infección (Bonami y col 2007).

La parvovirus canina es la causa más frecuente de enteritis vírica en cachorros. El parvovirus canino se replica activamente en células en división; epitelio intestinal, médula ósea y tejidos linfoides entre otras. La multiplicación del virus en el epitelio germinal de las criptas intestinales conduce a su destrucción, perdiendo la capacidad de absorción y provocando diarrea hemorrágica. Ésta provoca elevadas pérdidas de proteínas, fluidos e iones a través del tracto digestivo, originando una deshidratación severa e incluso shock hipovolémico. La afectación del tejido linfóide y de las células mieloproliferativas de la médula ósea provocan linfopenia e incluso panleucopenia. La lesión de la mucosa conduce a la alteración de la barrera gastrointestinal, permitiendo el paso de bacterias y/o endotoxinas a la circulación sistémica, por lo que en los casos más graves se puede producir un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica.

La inmunoterapia se basa en la activación y modulación del sistema inmune para dirigirlo hacia la respuesta requerida para el control de los germen que están provocando las patologías que queremos resolver. Entre las formas de inmunoterapia están los inmunosueros o sueros hiperinmunes, que contienen grandes cantidades de



inmunoglobulinas específicas contra el patógeno que activó su producción y estos inmunosueros pueden ser homólogos, cuando se producen en animales de la misma especie en el que se va aplicar y los inmunosueros heterólogos que son producidos en animales de diferentes especies; en ambos casos se tiene el riesgo de reacciones anafilácticas cuando se aplican dos o más veces.

Los VHH o nanoanticuerpos son la nueva generación de anticuerpos monoclonales recombinantes, los cuales son derivados de los camélidos. Brevemente, los camélidos poseen un porcentaje de sus inmunoglobulinas IgG carentes de cadena liviana y también del dominio constante CH1, estas inmunoglobulinas se denominan anticuerpos de cadena pesada y su porción variable, la cual reconoce al antígeno, se denomina VHH (Wesolowski J. col 2009)

Los nanocuerpos también son llamados anticuerpos de dominio simple o anticuerpos VHH debido a que consisten únicamente en un dominio variable (VHH) de la cadena pesada de un anticuerpo. Los nanocuerpos son péptidos de aproximadamente 110 aminoácidos de longitud. Los dominios VHH poseen cuatro regiones marco (FR) y tres regiones hipervariables (HV) o regiones determinantes de la complementariedad CDR. Los CDRs o HV poseen una alta proporción de variabilidad de aminoácidos en una posición, y son las regiones que intervienen en la unión al antígeno, ya que entran en contacto con la superficie de éste. Las regiones marco (FR) tienen secuencias de aminoácidos más estables que los HV y forman la estructura del núcleo del dominio variable del anticuerpo, ya que poseen una estructura de lámina beta que se emplea como andamio, manteniendo las regiones de HV en posición de contacto con el antígeno. Los anticuerpos de un solo dominio presentes en el tiburón, poseen un CRD2 vestigial que no contribuye a la unión al antígeno (Harmsen MM, De Haard HJ. 2007).

Considerando que para las enfermedades virales no se tienen medicamentos específicos de tratamiento, es que la inmunoterapia es una opción y considerando la presencia de nanocuerpos o anticuerpos de dominio simple que producen los camélidos, en este caso el de llamas, sería una alternativa que daría mejores resultados en el tratamiento del distemper y la parvovirus canina.

- V. Antecedentes del proyecto (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este trabajo)

DISTEMPER CANINO

Distemper canino es una enfermedad viral sistémica que afecta a los perros de todo el mundo, clínicamente se caracteriza por una elevación de temperatura difásica, leucopenia, catarro gastrointestinal y respiratorio; con frecuencia se presentan complicaciones neumónicas y neurológicas. La enfermedad ocurre en las familias Canidae, Mustelidae, Procyonidae y algunos Viverridae (Ramsey, 2012). Es altamente contagiosa y afecta básicamente a cachorros menores a un año, quienes constituyen el grupo etario de mayor susceptibilidad. Sinonimia Distemper canino, Moquillo canino, Enfermedad de Carre, Fiebre infecciosa Canina (Apple & Summers, 2005).

Agente etiológico

El Distemper canino es una enfermedad producida por un virus del género Morbillivirus de la familia Paramixoviridae, es un virus resistente a temperaturas bajas, pero se inactiva con la luz ultravioleta haciéndolo vulnerable en épocas de verano (Carnero, 2014).

Se estima que del 25 % al 75 % de los perros susceptibles al moquillo canino presentan una infección subclínica y están transmitiendo el virus sin ningún signo clínico de enfermedad, además los perros asintomáticos no son diagnosticados y actúan como un reservorio del virus, un diagnóstico preciso de la enfermedad en una etapa temprana es requerido puesto que permite que estos animales sean aislados y se impida la propagación del virus (Moro, 2010).



Transmisión

La ruta más importante de transmisión es a través de aerosoles se secreciones respiratorias. El período de incubación es de 7 a 10 días pero los signos y la eliminación de virus comienza aproximadamente a los 7 días pos-infección (PI) y se puede diseminar en casos extremos durante 60 y 90 días, aunque generalmente los periodos de eliminación son menores y por ser inestable fuera del huésped, el virus se deteriora rápidamente (Apple & Summers , 2005). La transmisión ocurre directamente por aerosoles o a través de excreciones oculares y nasales, orina y heces. El índice de infecciones es más alto que el de la enfermedad, lo que reflejaría un cierto grado de inmunidad natural o resistencia inducida por vacunación (Navarro C. , 2004). Los perros que se recuperan de la infección del virus de moquillo canino son inmunes de por vida, no permanecen persistentemente, la infección transplacentaria puede ocurrir, hecho que quedó demostrado en cachorros criados en condiciones gnotobióticas, hijos de madres aparentemente sanas, que desarrollaron infección por Virus de Moquillo Canino sin exposición pos natal (Apple & Summers , 2005).

Patogénia

La transmisión ocurre directamente por aerosoles de secreciones respiratorias, o por medio de secreciones oculares, orina y heces, el virus se elimina a los 7 días pos infección y puede diseminarse en casos extremos durante 60 y hasta 90 días, aunque generalmente los periodos de eliminación son menores. La mayoría de las infecciones en perros ocurre entre los tres y los seis meses de edad, cuando baja la inmunidad materna (Mendez, 2015). El virus llega a las mucosas, infecta los linfocitos locales y células mononucleares CD150+ dependiendo esta etapa de la hemaglutinina viral que es una glicoproteína de la envoltura lipídica que se encarga de reconocer y unirse al receptor linfocitario (CD150/SLAM), todo esto nos permite tener una idea más clara sobre el linfotropismo del VMC y de igual forma comprender el papel fundamental que tiene sobre la virulencia y la citopatogenicidad (Pinotti, 2015).

Presentación clínica

El distemper canino varía desde inaparentes hasta una enfermedad severa según la cepa viral. Se puede presentar de varias formas (respiratoria, entérica o gastrointestinal, cutánea y nerviosa (Okita, 2005).

Muchos de los perros con afecciones clínicas satisfacen los siguientes criterios; falta de vacunación, falta de ingestión de calostro de una perra inmune, vacunación inapropiada, inmunosupresión y antecedentes de exposición a perros infectados (Nelson, 2010). Varía según las condiciones ambientales, la edad y el estado inmunitario del animal. Los primeros signos aparecen al mismo tiempo que el primer pico febril. Después de varios días el animal vuelve a la temperatura normal y luego presenta una segunda fase de fiebre. Este segundo pico febril va acompañado de falta de apetito, erizamiento del pelo, inflamación y eritema de las amígdalas e inflamación en las conjuntivas y la mucosa nasal (Von, 2003).

Forma clínica del distemper

La infección por el virus del distemper canino se presenta como una enfermedad multisistémica potencialmente fatal que puede involucrar al SNC. Se piensa que la mayoría de las infecciones de Moquillo canino son subclínicas o subagudas, y no requieren tratamiento y la infección clínica se manifiesta de tres formas: aguda, subaguda y crónica (Cerde, 2012).

Forma aguda

Es la forma más común, el período de incubación (desde la infección hasta la aparición de signos clínicos) normalmente es de 7 a 14 días. Entre los 3 a 7 días, se presenta fiebre y leucopenia que casi siempre pasan inadvertidas. La fiebre disminuye durante algunos días hasta que acontece un segundo pico térmico (39.5 °C a 41°C), que normalmente va acompañada de conjuntivitis, rinitis y anorexia, así también está presente la linfopenia durante la infección temprana. Luego siguen a continuación los signos gastrointestinales y



respiratorios y que van aumentando por infecciones bacterianas donde encontramos (Lorenzana, 2008). El primer signo es una conjuntivitis, que en unos cuantos días va seguida de tos seca que se torna húmeda y productiva, a la auscultación de campos pulmonares se pueden escuchar unos incrementos de ruidos respiratorios inferiores, secreción serosa (que cambia a mucopurulenta) nasal y ocular, depresión y anorexia, se desarrollan una deshidratación por pérdida de líquido y emaciación puede ocurrir tenesmo e intususcepción (Lorenzana, 2013).

Diagnóstico

En el diagnóstico clínico del moquillo canino se tiene que tener en cuenta todas las afecciones respiratorias, gastrointestinales y febriles de los cachorros comprendidos entre los 2 a 6 meses. Se basa en los signos clínicos. Sin embargo existe una batería de pruebas diagnósticas que pueden realizarse para confirmar la presencia del virus (Appel y col, 1999).

Test Rápida del antígeno del virus del distemper canino cdv ag

El Kit del Test Rápido Anigen para CDV Ag es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno del virus de Moquillo en conjuntiva, orina, suero o plasma. El Kit del Test Rápido Anigen para CDV Ag presenta las letras "T" y "C" como la línea del test y como la línea de control en la superficie del dispositivo. Estas dos líneas no se harán visibles en la ventana de resultados antes de aplicar las muestras. La línea de control de usa para control procedimental y deberá aparecer en todo momento si el procedimiento del test se ha realizado correctamente y los reactivos de control del test están funcionando bien. En la ventana de resultado aparecerá la línea del test de color púrpura si existen en las muestras suficientes antígenos del virus de Moquillo Canino (Binote, 2003).

Los anticuerpos del virus de Moquillo Canino especialmente seleccionados se usan en la banda de test tanto como materiales de como materiales detectores. Ello permite al Kit del Test Rápido Antigen para CDV Ag identificar el antígeno del virus de Moquillo canino en conjuntiva, orina, suero o plasma con un alto grado de exactitud (Binote, 2003).

Tratamiento

En la actualidad no existe un medicamento antiviral específico que tenga efecto sobre el virus del Distemper canino. Los perros con infecciones respiratorias superiores deben conservarse en ambientes limpios, calientes y sin corrientes, es necesario limpiar los exudados oculonasales de la cara. La neumonía se complica con frecuencia con infecciones bacterianas secundarias, requiriendo antibioterapia de amplio espectro, expectorante o nebulización y golpes en el tórax con la mano acopada. Las selecciones iniciales de antibióticos adecuados incluyen ampicilina, amoxicilina, cefapirina, enrofloxacin, tetraciclina y cloranfenicol. Cuando existen vómitos severos se debe suspender el alimento, agua y medicamentos orales, se recomienda el uso de kaolina y pectina que recubren la mucosa intestinal ejerciendo un efecto emoliente y absorbente, es importante no usarse en animales deshidratados (Camero, Losurdo, Larocca V., Marthella, & Elia, 2014).

PARVOVIROSIS CANINA

Es una enfermedad viral que según Sharp (citado en Añasco, 2017), afecta a perros domésticos y callejeros, tanto de razas como mestizos, el parvovirus puede atacar a todas las razas sin distinguirlas, sin embargo, las razas más susceptibles son el Doberman y Rottweiler.

Etiología.

Murphy (Citado en Hurtado & Báez, 2012), la parvovirus canina, es una enfermedad viral provocada por el parvovirus canino (CPV), es un virus pequeño, de 20 nanómetros de diámetro, sin envoltura, con cápside icosaédrica, posee un DNA mono catenario, pertenece al Grupo: II (Virus DNA mono catenario) Familia: Parvoviridae Subfamilia: Parvovirinae, Género: Parvovirus, este virus requiere células en división rápida o en mitosis activa para su replicación.



Patogenia y Patología.

Después de la exposición oro nasal, el virus se replica en los tejidos linfoides de la oro faringe y alcanza el torrente sanguíneo. Del primero al quinto día hay marcada viremia plasmática, donde el virus se disemina a los tejidos de rápida división celular (Morais & Costa, 2007). Tras penetrar la célula, el virión pierde sus cubiertas y su genoma compuesto por DNA mono catenario, se convierte en DNA bi catenario; gracias a las DNA polimerasas del núcleo, después de replicarse los nuevos viriones son liberados por ruptura de la célula, la patogenia del parvovirus canino viene determinada por la necesidad de células en división para llevar a cabo la replicación viral, tras la infección de cachorros (1 a 6 meses de vida), el virus puede ser pan trópico, infectando una amplia gama de células de diferentes tejidos y órganos (Greene, 2008). El virus se replica inicialmente en el tejido linfoide de la faringe y las placas de peyer, luego se produce una viremia en los principales tejidos donde las células se replican fácilmente. Después de un periodo de incubación que dura 4 a 6 días, en la fase aguda de la enfermedad se comienza con depresión, vómitos y diarreas, el sitio primario de replicación viral es el tejido linfoide oro faríngeo en el primer día post infección, nódulos linfáticos mesentéricos de 1-2 días post infección y timo de 3-4 días post infección (Ettinger & Feldman, 2007). Sin embargo, el período de incubación es dependiente de otros factores como el grado de viremia y el índice de mitosis de la cripta intestinal (McCandlish, 2001). Posteriormente, el virus se disemina e infecta el epitelio germinal de las criptas del intestino delgado causando destrucción del epitelio, así como de leucocitos y algunas otras células linfoides (en infecciones severas aparece neutropenia y linfopenia), es común observar vellosidades acortadas, fusión de las mismas, necrosis de las criptas y células de regeneración o proclásticas en las criptas, acompañadas de infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y células plasmáticas, en la forma entérica, la manifestación de signos clínicos puede ocurrir a partir del cuarto día post infección, como refieren Jubb, Palmer, & Maxie (Citados en Añasco, 2017). La excreción activa del PVC- 2 comienza el tercer o cuarto día después de la exposición, en general antes de que se manifiesten signos clínicos, el virus se libera ampliamente en la materia fecal por un máximo de 7 a 10 días (Hurtado & Báez, 2012). En la forma miocárdica de la enfermedad, que en la actualidad es rara, los cachorros afectados suelen presentar síntomas de fallo cardiaco agudo antes de las 6 semanas de edad, algunos cachorros pueden sufrir un fallo cardiaco congestivo meses después de la miocárdica (Hoskins, 2009).

Presentación Clínica.

Los signos clínicos pueden ir desde una infección asintomática hasta enfermedad fulminante y muerte súbita. Generalmente los signos más severos se observan en perros menores de doce semanas o en aquellos con baja protección inmune (Crawford & Sellon, 2010). Estos, inician con letargia, anorexia con o sin pirexia; lo cual progresa en 1 a 2 días con vómitos (productivos e improductivos) y diarreas que a menudo son hemorrágicas y con moco, dolor abdominal y deshidratación (Pintos et al, 2011). Las deposiciones pueden partir de color amarillo pálido a gris, posteriormente se oscurecen o manchan con sangre, para luego tornarse hemorrágicas. La muerte puede ocurrir por sepsis asociada a bacterias Gram negativo y/o SCID (McCaw & Hoskins, 2006). Además de lo anterior, la enfermedad progresa, asociada a una pérdida de proteínas plasmáticas por intestino, a una deshidratación severa asociada al vómito y diarrea persistente, lo que mantenido en el tiempo produce entre otros signos: taquicardia, hipotensión, finalmente signos de shock e hipo perfusión. La enteritis y las alteraciones en la motilidad intestinal pueden llevar a una de las consecuencias secundarias más comunes de esta enfermedad, como es la intususcepción (Crawford & Sellon, 2010). Otra presentación de la enfermedad es la miocárdica, producto de la replicación viral en éste tejido, que presenta un alto índice mitótico. El cuadro se desarrolla ante una exposición viral "in útero" o en cachorros contagiados antes de las 8 semanas. Generalmente toda la camada se ve afectada y los cachorros mueren súbitamente o después de un corto episodio de disnea (McCaw & Hoskins, 2006) (Crawford & Sellon, 2010).

Diagnóstico.

La sola presentación del cuadro asociado a los factores epidemiológicos entrega un diagnóstico presuntivo de la enfermedad (Goddard & Leisewitz, 2010). Depende de las pruebas de laboratorio que se realizan para confirmar dicho diagnóstico, dentro de los



exámenes de laboratorio utilizados se encuentran: Microscopía electrónica directa, Prueba de ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay), Prueba de reacción de la polimerasa (PCR), Inmunocromatografía, etc. (Latimer, Mahaffey, & Prasse, 2005).

Tratamiento convencional.

El tratamiento de la infección por CPV puede ser bastante costoso. Por lo tanto, uno de los protocolos de tratamiento es la administración de antisuero homólogo de perros inmunes (Meunier et al., 1985).

Este gira entorno a corregir un volumen circulatorio eficaz, controlar las infecciones bacterianas secundarias y proporcionar descanso al sistema digestivo (Castro et al, 2011). Si el animal sobrevive los primeros 3 o 4 días de la enfermedad, la recuperación por lo general ocurre rápidamente. Sin embargo cuando más joven sea el animal, mayor el porcentaje de mortalidad (Juarez, 2011). Para la severa deshidratación se recomienda el uso de líquido balanceado intravenoso, como por ejemplo, una solución de lactato de Ringer o una solución de cloruro de sodio al 0,9 % con dextrosa y potasio agregados (Hoskins, 2009).

SISTEMA INMUNE

El sistema inmune puede considerarse como un sistema homeostático fisiológico, que dentro de ciertos límites contribuye a la integridad del organismo con neutralización del peligro y preservación de lo propio. La respuesta inmune adecuadamente regulada protege al huésped de patógenos y otros agresores ambientales. Frecuentemente es imposible erradicar a un organismo patógeno sin destruir células infectadas. El mecanismo de apoptosis minimiza el daño a células cercanas, sin embargo la inflamación local es parte importante de una respuesta efectiva. Habitualmente el daño es controlado y tolerado; sin embargo, si la inflamación es intensa o crónica y la respuesta inmune mal regulada, se produce daño tisular y disfunción orgánica. Lo anterior, puede originar enfermedades autoinmunes o por hipersensibilidad como la alergia (Alberts et al. 2002).

Inmunidad activa.

El sistema inmune trabaja activamente para montar y consolidar una respuesta contra un agresor. Esta inmunidad se establece cuando el sistema inmune toma contacto con el antígeno, lo cual puede darse de manera natural, a través de una infección, o artificial, por medio de la administración de vacunas (Villegas, 1999). Las vacunas de virus inactivado proveen inmunidad suficiente frente al serotipo CPV-2. Los perros inmunizados con este tipo de biológico, pueden cursar con una infección subclínica dos semanas después de su aplicación. Estas vacunas han sido reemplazadas por vacunas atenuadas que producen títulos de anticuerpos más elevados (Tizard, 1998). Las vacunas de virus atenuado frente a la ausencia de anticuerpos maternos, comienzan a generar una respuesta inmune tres días después de su aplicación. Asimismo, propician una linfopenia transitoria entre cuatro y seis días posteriores a la vacunación. No obstante, son vacunas seguras ya que no se ha probado que el virus presente en ellas, se vuelva activo, por otra parte, un cachorro que se recupera de la enteritis por PVC-2 es inmune a la reinfección por al menos 20 meses y, posiblemente de por vida. Al exponerse nuevamente el animal sobreviviente al CPV-2, no mostrará incremento en los títulos serológicos ni manifestará signología clínica alguna relacionada con el proceso infeccioso (Tizard, 1998). En general, al establecer un protocolo de inmunización experimental se debe tomar en consideración un conjunto de factores que afectan el tipo y la magnitud de la respuesta humoral del animal inmunizado. Estos factores son los siguientes: la especie del animal utilizado, la constitución genética del animal, el tipo, la dosis y la ruta de administración del inmunógeno, el número de inmunizaciones (refuerzos) y el uso de adyuvantes (Abbas, 2012)

Inmunidad pasiva



Es la transferencia a un individuo de la inmunidad que se desarrolló en otro. Se transfiere de manera natural, cuando los anticuerpos pasan de la madre a la cría a través de la placenta y el calostro, o anticuerpos, células y otros factores por la leche materna. Se transfiere de manera artificial mediante el paso de células a través de una transfusión sanguínea o de anticuerpos preformados contenidos en los llamados “antisueros” o “antitoxinas”. Debido a que el individuo no formó esos anticuerpos a través de su propio sistema inmune, únicamente lo protegerán durante el tiempo en que, de acuerdo a su vida media, estas proteínas desaparezcan al ser metabolizadas (Collado et al. 2008).

TRATAMIENTO ALTERNATIVO

Suero policlonal.

La producción de anticuerpos es la culminación de una serie de interacciones entre los macrófagos, linfocitos T y linfocitos B, los cuales reaccionan frente a la presencia de un antígeno extraño. El producto final de esta respuesta es la producción de gran cantidad de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno, retirándolo inmediatamente de la circulación del animal. Un antisuero policlonal (Anticuerpo policlonal) es el suero producido de manera convencional por un animal inmunizado usualmente conejo, oveja o cabra. Se denominaron así porque contienen una mezcla compleja de anticuerpos dirigidos frente a una gama de determinantes antigénicos localizados sobre un determinado antígeno. La mayor ventaja del suero policlonal radica en su capacidad de formar gran cantidad de inmunocomplejos insolubles con el antígeno. Este tipo de antisueros es excelente cuando se estudia el antígeno como un todo, así como proporcionan una amplia barrera de protección del organismo al formarse una gran variedad de anticuerpos. Sin embargo, como el antisuero contiene especificidades no deseadas, resulta pobre cuando se estudian determinantes antigénicos específicos. Por todo esto, el antisuero animal tiene ciertas limitaciones para su aplicación en inmunoensayos. La principal limitación radica en su escasa especificidad (incluso cuando reaccionan con antígenos pequeños) y su variabilidad entre animales y lotes (Suter, 1992). Los sueros hiperinmune contienen anticuerpos que son productos naturales con toxicidad mínima, siempre que no tengan reactividad con el tejido del huésped (Tizard y Ni 1998). Otros tratamientos alternativos son las Trasfusiones de plasma sanguíneo canino, que pueden incluir anticuerpos contra parvovirus canino, que ayudan a expandir el volumen sanguíneo en el paciente, este plasma es obtenido en perros donantes o bancos de sangre (Schaer, 2006). Dichos tratamientos lo han iniciado con la purificación de la Ig G de perros recién recuperados de la infección por parvovirus. En ensayos clínicos, y tras la administración de esta IgG junto con el tratamiento tradicional (paliativo) se comprobó que los pacientes se recuperaban con mayor rapidez que aquellos que recibieron únicamente el tratamiento convencional. Ninguno de los individuos tratados con IgG necesitó alimentación parenteral ni transfusión sanguínea. Este tratamiento redujo la mortalidad de un 16 a un 10%, el tiempo necesitado para que el perro recuperara el apetito y su estado normal. Todo esto llevó a la reducción de los gastos debidos a hospitalización, tratamiento, cuidados, etc. (Jimenez, 2001).

El uso de Sueros Hiperinmunes es una idea que puede cambiar la historia de la medicina veterinaria. ACTINMUN es suero sanguíneo con niveles adecuados de anticuerpos IgG contra Parvovirus que neutralizan a estos virus promoviendo su fagocitosis de manera que el animal puede recuperarse más rápido que cuando solo se administra tratamiento sintomático. La aplicación del Suero Hiperinmune policlonal junto con el tratamiento sintomático implementado por el Médico Veterinario se convierte en una forma diferente y especial de hacer clínica veterinaria porque es específico, compatible y complementario al tratamiento sintomático que el Médico veterinario aplica a los enfermos (Lopez, 2014).

El uso de sueros hiperinmunes para transferir globulinas específicas en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas aún continúa en debate debido a los riesgos de shock anafiláctico, principalmente en el caso de sueros heterólogos. La transferencia específica e inmediata de inmunidad humoral al animal no es muy duradera debido al catabolismo de los 33 anticuerpos. Se ha utilizado para el tratamiento de infecciones por Parvovirus y VMC en canes (Izquierdo, 1999).

Condori (2017) realizó un estudio aplicando Actinmun, un suero hiperinmune homólogo que contiene IgG específicas, en cachorros infectados por VMC durante tres días consecutivos. Sus resultados arrojaron que los canes tratados mostraron una recuperación más rápida



que con el tratamiento convencional probablemente por la acción de las IgG en la neutralización viral y estimulación de la fagocitosis.

Otro estudio realizado en Trujillo evaluó el efecto de la aplicación de suero hiperinmune Soroglobulin durante los días 10, 11, 12 y 13 post infección a una dosis de 2ml/kg en cachorros infectados experimentalmente. Se evaluó los cambios hematológicos en los canes tratados observando una anemia leve a moderada, el recuento plaquetario estuvo dentro de los valores de referencia a diferencia del grupo control. Dentro de los valores encontrados en la serie blanca se observa una linfopenia leve en el grupo tratado y severa en el grupo control (San Martín, 2018).

VI. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

El inmunosuero producido en llamas, tendrá títulos altos de anticuerpos contra el virus del distemper y parvovirus canina

VII. Objetivo general

Producir y titular anticuerpos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus de distemper y parvovirus canina.

VIII. Objetivos específicos

- Producir anticuerpos en llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
- Evaluar la antigenicidad de los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
- Titular los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
- Purificar los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.

IX. Metodología de investigación (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar)

- 1.- Producción de anticuerpos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
 - Se adquirirán dos llamas machos de 3 a 4 años de edad, clínicamente sanos a los que se les aplicará un test para confirmar que no tengan anticuerpos contra distemper y parvovirus canina.
 - Se les aplicará antígenos vacunales 1ml a cada llama y después de 21 días se aplicará un refuerzo, para después de 30 días se tome muestras de sangre cada 15 días por 4 veces, de los cuales se obtendrá el suero que será depositados en viales de 2 ml para ser almacenados en refrigeración.
- 2.- Evaluación de la antigenicidad de los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
 - En las muestras de suero almacenados en refrigeración, serán evaluadas la antigenicidad de los anticuerpos, para lo cual se prepararán: una prueba de ELISA indirecta y una prueba de inmunodifusión simple con tal fin.
- 3.- Titulación de los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.



- Para la titulación de anticuerpos producidos en inmunosuero de llama, se preparan placas para inmunodifusión radial y ELISA indirecta, utilizando antígenos vacunales del virus de distemper y parvovirus canina
-
- 4.- Purificación de los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.
- Mediante la técnica de sulfato amónico se purificará los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper y parvovirus canina.

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Abbas, A. (2012). Inmunología celular y molecular. 7. Barcelona, España: Elsevier.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts & P. Walter, (2002). Molecular biology of the cell. 4th Ed. Garland Science.
- Añasco, C. (2017). Perfil hematológico en perros a 3,825 metros de altitud con gastroenteritis viral en su fase inicial. Universidad Nacional del Altiplano. Recuperado a partir de <http://tesis.unap.edu.pe/handle/UNAP/4658>
- Apple, J. (1999) Distemper Canino. Obtenido de http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/appel_es/ivis.pdf?iframe=true&width=90%&height=90%
- Apple, M., & B. Summers (2005). distemper canino estado actual. Recent Advances in Canine infectious Diseases. International Veterinary Information Service. NY, Ithaca: internacional veterinary.
- Bonami F, P Rudd, V von Messling. 2007. Disease duration determines canine distemper virus neurovirulence. J Virology 81, 12066-12070
- Camero, M., M. Losurdo, V. Larocca, V. Marthella, & G. Elia (13 de Diciembre de 2014). Virological and serological finding in dogs with naturally occurring distemper. Virol Methods, 30-127. Available.
- Castro, T., E. Costa, J. Leite, N. Labarthe & R. Cubel (2011). Monitoring of canine parvovirus (CPV) strains detected in Brazil, 90(2), 336-340.
- Cerda, L. (2012). Estudios de la actividad inmunogenica del canino frente a vacunas comerciales antidistemper. XV congreso Panamericano de Ciencias Veterinaria. Campo Grande, Brasil.
- Collado, V., R. Porras, M. Teresa & E. Gomez (2008). El sistema inmune innato y sus mecanismos. Revista cmlutense de Ciencias Veterinaria , 2(1):1-16.
- Condori, R. 2017. Tratamiento del distemper canino con inmunosuero y fitoterapia. Tesis. Universidad Nacional del Altiplano. Perú. 83 pp.
- Crawford, C. & R. Sellon (2010). Canine viral diseases. En J. Ettinger & E. Feldman, Textbook of Veterinary Internal Medicine. Missouri - USA: 7th. Ed. Saunders Elsevier. St Louis.
- Da Fontoura, R.; Streck, A.; Nunes, M.; Maboni, F.; Muniz, R.; Wageck, C. 2016. Influence of vaccine strains on the evolution of canine distemper virus. Infection, Genetics and Evolution 41, 262–269.



Ettinger, J., & C. Feldman (2007). Tratado de medicina Interna veterinaria; enfermedades del perro y del gato. España: Elsevier.

Greene, C. E. (2008). Enfermedades infecciosas del perro y del gato. (Intermedica V. 2, Ed.). Buenos Aires.

Harmsen MM, De Haard HJ. (2007). [«Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.»](#). *Applied Microbiology and Biotechnology* **77** (1): 13-22. [PMC 2039825](#)

Hurtado, D.-H., & P. Báez (2012). Nueva perspectiva del Parvovirus Canino.(Tesis pregrado) Journal of Agriculture and Animal Sciences, 1(2). Recuperado a partir de: <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/1022/1/181.pdf>

Hoskins, J. D. (2009). Canine Parvovirus an update on variants. The Newsmagazine of Veterinary Medicine, 40.

Izquierdo, N. 1999. Suero hiperinmune para la protección y terapia de los caninos frente a la parvovirus. Rev. prod. anim. Vol. 11, 49-50

Jimenez, C. A. (junio de 2001). Anticuerpos Monoclonales Especificos de Inmunoglobulina G canina: Caracterizacion y Aplicacion de Inmunoensayos. Cordoba. Obtenido de: <http://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/305/13076334.pdf?sequence=1>

Juares, A. (2011). Cambios hematológicos en perros positivos a parvovirus canino. Tesis de pregrado - Universidad de microacan de San Nicolas de Hidalgo. Guatemala.

Latimer, K., E. Mahaffey , & K. Prasse (2005). Patología Clínica Veterinaria. España, España: Multimedica Ed. Vet.

Lopez, R.H. (2014). ACTINUM - Hospital de mascotas. mexico. Obtenido de <http://www.hidalgohospitaldemascotas.com/suerohmh.html>.

Lorenzana, C. (2013). Actualizacion terapeutica del Moquillo canino. Obtenido de: <http://www.webveterinaria.com/virbac/news13/pequenas.pdf>. Lorenzana, C. (2008). ACTINUM - Hospital de mascotas. mexico. Obtenido de: <http://www.hidalgohospitaldemascotas.com/suerohmh.html>.

Meunier , P., B. Cooper & M. Appel (1985). Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: sequential virus distribution and passive immunization studies. Vet Path.

McCaw, D. & J. Hoskins (2006). Canine viral enteritis. En C. Greene, Infectious Diseases of dog and cat (págs. 46 - 73). Missouri - USA: 3a Ed. Elsevier St. Louis

Mendez, A. (16 de Junio de 2015). Problemas dificiles en procesos respiratorios. Resolviendo casos. Mexico: Virbac

Morais, M. & P. Costa (2007). Parvoviridae. En E. Flores, Virología Veterinaria (págs. 388-392). Santa María: da UFSM.

Moro, L. (2010). Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. Pesqui Veterinaria, 132-8.

Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. Trends Biochem Sci. 2001 Apr;26(4):230-5.

Nelson, R. (2010). Medicina Interna. 4. Elsevier



Okita, M. (2005). histopathological feature of canine distemper recently Observed in Japan. Phatol, 403-408. Japon.

Pinotti, M. (2009). Evaluacion de dos alternativas terapeuticas y caracterizacion de aspectos clinicos-epidemiologicos. Distemper Canino, 29-45. Santa Fe, Colombia. Obtenido de <http://www.readbag.com/bibliotecavirtual-unlar-publicaciones-bitstream-1-2680-1-fave-vet-v8-n2-pag-29-45>

Pinotti, M. (2012). Aspectos clinicos y epidemiologicos de Distemper canino Estudio de casos diagnosticados en la ciudad de Santa fe.

Pinotti, M. (2015). 29-45pp. Santa Fe, Colombia. Obtenido de <http://www.readbag.com/bibliotecavirtual-unl-ar-publicaciones-bitstream1-2680-1-fave-vet-v8-n2-pag-29-45>

Ramsey, I. K. (2012). Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales. Barcelona, España: S.

San Martín, I. 2018. Cambios hematológicos en Canis familiaris con distemper canino experimental, tratados con suero hiperinmune en el distrito de Trujillo – Perú. Tesis. Universidad Privada Antenor Orrego. Perú. 55 pp.

Schaer, M. (2006). Medicina Clinica del perro y el Gato. Barcelona: Masson.

Suter, M. (1992). The potential of monoclonal antibodies derived from outbred veterinary animals. Veterinary Immunology and Immunopathology, 33, 285- 300. NY, EE.UU

Tizard, I. R. (2009). Introducción a la inmunología veterinaria. Elsevier Health Sciences Spain.

Tizard, I. & Y. Ni (1998). Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. J Am Vet Med Assoc.

Villegas, P. (1999). Enfermedades del Virus. Seminario Internacional de Patologia. Giorgia, USA.

Von, V. (2003). Rapid and sensitive detection of immunoglobulin IgM and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapside proteina-based. Clin. Microbiology, 1049-1056. EE.UU.

Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauherff A, et al. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. Med Microbiol Immunol. 2009 Aug;198(3):157-74.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Los anticuerpos producidos en inmunosuero de llama (*Lama glama*) contra el virus del distemper canino y parvovirus canina, serán utilizado en su tratamiento.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

La producción de inmunosueros es una alternativa de inmunoterapia de enfermedades virales.



ii. Impactos económicos

Los costos de tratamiento de enfermedades virales serán menores y efectivos.

iii. Impactos sociales

El tratamiento del distemper y parvovirus canina con inmunoseros evitarán la muerte de mascotas que influyen en el estado anímico de los miembros de la familia.

iv. Impactos ambientales

La inmunoterapia no generará contaminación ambiental con residuos de medicamentos

XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

- Infraestructura: se utilizarán los ambientes del Centro de Investigación Carolina para la crianza de las llamas y para los trabajos de laboratorio se utilizarán los ambientes del Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Universidad Nacional del Altiplano.
- Equipos: Los equipos a utilizar serán los que se encuentran en el Laboratorio de Microbiología Veterinaria: Autoclave, Microscopio, Incubadora, Refrigeradora, congeladora, cámara de seguridad, baño María, lector de ELISA, equipos de manejo animal.
- Materiales de vidrio: Placas petry, tubos de ensayo, Vasos de precipitación, Erlenmeyer, láminas porta y cubre objetos y placas de micropozos,
- Reactivos: Agar agar, reactivos para elaborar test de ELISA indirecta, reactivos para inmunodifusión radial.
-

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El trabajo de investigación se realizará en el distrito, provincia y región de Puno. La ciudad de Puno, capital de distrito, provincia y del departamento de Puno, está ubicada a orillas del Lago Titicaca a 3827 m.s.n.m., lago navegable más alto del Mundo. Se encuentra en la región de la sierra a los 15° 50' 26" de latitud sur, 70° 01' 28" de longitud Oeste del meridiano de Greenwich.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres 2021												
	1	2	3	4									
Adquisición y evaluación clínica de llamas	X												
Aplicación de antígenos vacunales a llamas	X												
Obtención de inmunoseros con anticuerpos	X												
Preparación de test ELISA e inmunodifusión radial		X											
Determinación de antigenicidad y titulación de Ac.		X											
Titulación y purificación de anticuerpos			X										
Análisis de datos y elaboración del informe final				X									

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
-------------	------------------	----------------------	----------	-------------------



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN



Llamas	Unidades	350.00	2	700.00
Reactivos	Kits	200.00	10	2000.00
Material de vidrio	Kits	120.00	10	1200.00
Material de lab.	Kits	60.00	10	600.00
Capacitación		1000.00	1	1000.00
Imprevistos				500.00
Total				6000.00