

**ANALISIS GENOMICO DEL PARVOVIRUS CANINO POR PCR-FINGERPRINTS
A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CASOS CLINICOS TOMADOS A
CONVENIENCIA EN BOGOTA - COLOMBIA.
-ESTUDIO PRELIMINAR -**

CASTILLO RODRIGUEZ ANGELA CONSUELO

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
Para optar el título de**

MICROBIÓLOGO AGRICOLA Y VETERINARIO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
BOGOTA. D.C.
MAYO 2001**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No.13 de Julio de 1946:

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus tesis de grado”.


ANALISIS GENOMICO DEL PARVOVIRUS CANINO POR PCR-FINGERPRINTS
A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE CASOS CLINICOS TOMADOS A
CONVENIENCIA EN BOGOTA - COLOMBIA.
-ESTUDIO PRELIMINAR-

CASTILLO RODRIGUEZ ANGELA CONSUELO


Dr. ORLANDO TORRES G.
Director


Dra. LOIS BREN JERABEK
Codirectora


Dr. JORGE ALMANSA
Asesor


Dr. HUGO DIEZ
Jurado


Dra. JANETH ARIAS
Jurado


Dr. CARLOS CORREDOR
Decano Académico


Dra. AURA ROSA MANASCERO
Directora de Carrera

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MICROBIOLOGIA AGRICOLA Y VETERINARIA
BOGOTA. D.C.

Las metas se logran gracias a la fé
en Dios, el apoyo de los tuyos, y por
supuesto con la
confianza en uno mismo, por eso...
Con todo mi corazón a mi Padre (Q.E.P.D.),
mi Madre,
Hermanos y demás familia, porque
hicieron de mi sueño una realidad; también
a mis amigos que me extendieron sus brazos
en esos
momentos de vacío existencial, y a todos
los que se han convertido en "semillas
pacientes, esperando su tiempo y su
lugar"...

ANGELA

AGRADECIMIENTOS

- Al Grupo de Investigación de Parvovirus Canina de la Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria dirigido por un gran amigo y colaborador el Dr. Orlando Torres.
- Dr. Jaime Castellanos, coordinador del laboratorio de neurociencias del Instituto Nacional de la Salud, por su apoyo incondicional y gran colaboración.
- Dr. Jorge Almansa y la Dra. Lois Jerabeck por su colaboración incondicional y asesoría.
- Dra. Aura Rosa Manscero, por la colaboración de reactivos.
- Dr. Hugo Diez, Dra. María Concepción Puertas, y Dra. Adriana Matiz por permitir utilizar sus equipos de laboratorio y su valiosa colaboración cuando lo necesitamos.
- A todos los profesionales de diferentes clínicas veterinarias y laboratorios de diagnóstico veterinario que ayudaron a recolectar las muestras para llevar a cabo el estudio.

- Inmunolab de Colombia, por la donación del kit de extracción de DNA GFX Genomic de farmacia.
- Dr. Edison Luiz Durigon, Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo - Brasil, por su respaldo para seguir con la continuación de este proyecto
- A todo el personal que me colaboró directa o indirectamente.
- A mis compañeros de trabajo de Outsourcing Ltda., por su paciencia y comprensión.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

<i>INTRODUCCIÓN</i>	1
<i>1. MARCO TEORICO</i>	4
<i>1.1. Historia</i>	14
<i>1.2. Evolución del Parvovirus Canino (CPV)</i>	17
<i>1.3. Propiedades de los Parvovirus</i>	24
<i>1.3.1. Etiología</i>	24
<i>1.3.2. Replicación viral</i>	27
<i>1.4. Epidemiología</i>	28
<i>1.4.1. Huesped</i>	28
<i>1.4.2. Transmisión</i>	32
<i>1.5. Patogenia</i>	34
<i>1.6. Inmunidad al Parvovirus</i>	40
<i>1.7. Infecciones por CPV</i>	43
<i>1.7.1. Signos clínicos</i>	43
<i>1.7.1.1. Síndrome neonatal</i>	45
<i>1.7.1.2. Enteritis</i>	45
<i>1.7.1.3. Miocarditis Canina</i>	46

1.8. Diagnóstico	47
1.9. Prevención, control y tratamiento	52
2. Introducción a la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	55
2.1. Principio de la técnica PCR	56
2.2. Concentración de la enzima	59
2.3. Deoxinucleotidos Trifosfatos	60
2.4. Concentración de Magnesio	61
2.5. Otros componentes	61
2.6. Anillamiento del Primer	62
2.7. Extensión del Primer	63
2.8. Tiempo de denaturación y temperatura	64
2.9. Número de ciclos	64
2.10. Primers	65
2.11. Efecto Plateau	67
3. Principio de Fingerprints	68
4. Planteamiento del problema	69
5. Justificación	70
6. Objetivos	72
6.1. Objetivo general	72
6.2. Objetivos específicos	72
7. Materiales	73
7.1. Equipos	73

8. Metodología	74
8.1. Hipótesis	74
8.2. Toma de muestras	74
8.2.1. Muestra sanguínea	75
8.2.2. Muestra de materia fecal	75
8.3. Procesamiento de muestras	76
8.3.1. Técnica de extracción DNA viral en muestras de sangre	76
8.3.1.1. Fenol cloroformo isoamílico y precipitación etanólica	77
8.3.1.2. Salting out	77
8.3.1.3. Kit GFXÒ	78
8.3.2. Técnica extracción de virus en materia fecal	79
8.3.3. Técnica de extracción DNA viral en materia fecal	79
8.3.3.1. Fenol cloroformo isoamílico y precipitación etanólica	79
8.3.3.2. Kit GFXÒ	79
8.4. Estandarización técnica PCR	80
8.4.1. Descripción técnica PCR	80
8.5. Descripción técnica Fingerprints (huella genómica)	81
8.6. Procesamiento y análisis estadístico	82
9. Resultados	83
9.1. Datos estadísticos de la muestras	83
9.1.1. Raza	83
9.1.2. Edad	84

9.1.3. <i>Esquema de vacunación</i>	84
9.1.4. <i>Muestras confirmadas</i>	85
9.2. <i>PCR</i>	85
9.2.1. <i>Esquemas Vacunales vs PCR</i>	86
9.2.2. <i>Muestras confirmadas vs PCR</i>	87
9.3. <i>Huella Genómica</i>	87
10. <i>DISCUSIÓN</i>	90
10.1. <i>Toma de muestras</i>	90
10.2. <i>Análisis estadístico de variables</i>	92
10.3. <i>Metodología</i>	93
10.3.1. <i>Extracción DNA</i>	93
10.3.2. <i>PCR</i>	95
10.3.3. <i>Endonucleasa RsaI</i>	100
<i>CONCLUSIONES</i>	101
<i>RECOMENDACIONES</i>	103
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	105
<i>ANEXOS</i>	125

TABLAS

<i>Tabla No.1 : Variación de secuencias de nucleótidos entre los diferentes genotipos de CPV-2.</i>	<i>22</i>
<i>Tabla No.2 : Enfermedades producidas por Parvovirus</i>	<i>29</i>
<i>Tabla No.3 : Relación entre edad y presencia de algunos síndromes</i>	<i>44</i>
<i>Tabla No.4 : Frecuencia de razas</i>	<i>83</i>
<i>Tabla No.5 : Esquema de vacunas</i>	<i>84</i>
<i>Tabla No.6 : Muestra con etiología confirmada</i>	<i>85</i>
<i>Tabla No.7 : Comparación de pacientes vacunados vs. PCR</i>	<i>86</i>
<i>Tabla No.8 : Comparación muestras confirmadas vs. PCR</i>	<i>87</i>

INDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA No.1 : Esquema de los vellos y una cripta seleccionado para apreciar la organización histológica de la mucosa del Intestino Delgado (ID)</i>	5
<i>FIGURA No2 : Localizaciones preferentes de replicación de los virus enteropatógenos en las vellosidades intestinales y efectos sobre las mismas</i>	11
<i>FIGURA No.3 : Replicación de DNA viral</i>	28
<i>FIGURA No.4 : Patogenia de CPV</i>	36
<i>FIGURA No.5: Lesiones del Intestino Delgado</i>	40
<i>FIGURA No.6 : Representación esquemática de la PCR</i>	59
<i>FIGURA No.7 : Amplificado CPV con PCR</i>	86
<i>FIGURA No.8 : Patrones de restricción enzima RsaI</i>	88

ANEXOS

<i>ANEXO No.1 : Clínicas Veterinarias visitadas</i>	125
<i>ANEXO No.2 : Formato de Recolección de muestra.</i>	128

RESUMEN

El Parvovirus Canino (CPV) causante de diarrea hemorrágica fue originalmente llamado CPV-2. Este emergió en 1978 en Estados Unidos, y a partir de esta fecha ha presentado cambios en su variabilidad genética dando lugar a nuevos genotipos como lo son CPV-2a y CPV-2b. En sur América sólo se conoce una publicación de trabajos concernientes al tipo antigénico que predomina (Pereira y colaboradores, 2000). En Colombia se identificó que el CPV provocó una epidemia que afectó la población canina del país a partir de agosto de 1980 (Mogollón y colaboradores, 1981), pero no se conoce aún la clase de genotipos que circulan. Se analizaron por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) 56 muestras tomadas a conveniencia entre los años 2000 y 2001 de pacientes menores de un año con diagnóstico presuntivo a CPV en Bogotá (Colombia), y por medio de restricción con la endonucleasa RsaI se identificó el tipo de genotipo de CPV en 4 muestras con diagnóstico positivo (frangmento DNA 2.2 Kpb). Se reporta la presencia de CPV-2 y CPV-2b en las muestras tomadas a conveniencia en la ciudad.

INTRODUCCION

La población canina juega un papel preponderante en los hogares colombianos, de acuerdo con estimativos de la Secretaría de la Salud Pública del Distrito existiría un perro por cada siete personas en el área urbana de Bogotá D.C.. Esta situación plantea una serie de exigencias en cuanto a normatividad, desechos, alimentación y, por supuesto de salud, implementación de técnicas de diagnóstico, control de zoonosis y precauciones en general para proteger a las mascotas de las enfermedades más frecuentes y de mayor riesgo para su vida.

Dentro de las patologías más importantes y de mayor impacto para la salud de los caninos, aquellas que cursan con signos clínicos de diarrea ocupan un renglón relevante. Tal manifestación suele ser de origen multifactorial y las interacciones de agentes infecciosos con factores genéticos, ambientales, nutricionales, e inmunológicos, pueden estar implicados en su intensidad. Trabajos realizados en otros países señalan como las causas principales de diarreas víricas en los animales domésticos a agentes pertenecientes a las familias Reoviridae, Coronaviridae, y Parvoviridae; los cuales infectan de modo característico diferentes zonas de las vellosidades intestinales, determinando una reducción de la superficie de absorción que da lugar a acúmulo de fluidos y a diarrea.

El parvovirus canino (CPV), a diferencia de otras etiologías que causan diarreas, induce cuadros clínicos severos con pocas esperanzas de recuperación, debido a que ataca las células de las criptas intestinales, origen de las células epiteliales; mientras a diferencia de que los Rotavirus y Coronavirus que infectan las células ubicadas en los extremos distales de las vellosidades intestinales, los hacen inductores de patologías autolimitantes que en la mayoría de los casos preceden una pronta recuperación.

El CPV, es un virus muy pequeño (20nm de diámetro), desnudo, de simetría icosaédrica con un genoma de DNA; requiere para su replicación de células de rápida división celular, por esto el tropismo por las células de la cripta intestinal y las células del miocardio.

Desde su descubrimiento el CPV-2 (1978), distinto al CPV-1 (Bin y colaboradores, 1970) el virus ha presentado modificaciones en su genoma y variación antigénica, determinando que las patologías se manifiesten de diferente forma. Los aislamientos efectuados entre 1979 y 1981 reportan una nueva "cepa" CPV-2a y a mediados de los 80's se comprobó la emergencia de un tercer subtipo, CPV-2b en Estados Unidos (Parrish, 1990).

El presente trabajo pretende establecer si existe variabilidad genómica en aislados de CPV de casos clínicos tomados a conveniencia, a partir de pacientes con diagnóstico presuntivo de Parvovirus Canina, atendidos en

distintas clínicas veterinarias de Bogotá, D.C.-Colombia. Para ello se realizará la estandarización de la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), y Huella Digital Genómica (fingerprints), logrando de ésta forma una genotipificación del virus circunlante en la Ciudad.

Los resultados reportados darán una idea de las variaciones genéticas y antigénicas del CPV lo que tendría un impacto en el conocimiento epidemiológico de la enfermedad y podría tener implicaciones en los planes inmunoprolácticos y en los métodos de diagnóstico.

Siendo tan graves las consecuencias de la infección por el CPV para la salud del canino, y tan importantes los gastos generados en el tratamiento de los animales afectados, todo conocimiento nuevo aportado alrededor de esta temática, será valioso para el progreso diagnóstico, preventivo y terapéutico; es de añadir que, la certeza diagnóstica es indispensable en estos casos para que los estudios epidemiológicos de las diarreas caninas tengan una mayor utilidad.

Por último, como consecuencia de este trabajo, se complementará el conocimiento de la historia natural de la enfermedad y la estandarización de la técnica permitirá realizar un diagnóstico de forma más temprana, lo cual tendrá obvias repercusiones en el éxito del tratamiento.

1. MARCO TEORICO

El Intestino Delgado (ID) cuenta con dos capas de músculo liso las cuales realizan dos funciones básicas: mezcla y retarda el pasaje de los contenidos a través del tubo, con lo cual asegura el punto final de la digestión y absorción. También moviliza los contenidos en forma continua hacia la dirección aboral (Melville, J., y colaboradores 1975).

El intestino constitutivamente es similar al esófago y estómago y poseen mucosa, submucosa, y capas musculares. La mucosa, con funciones secretorias y de absorción, conforma una barrera entre el ambiente exterior y el interior del cuerpo. La submucosa, interpuesta entre la mucosa y capas musculares, aporta el sostén y contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. La capa muscular externa se encarga de mover los contenidos intestinales a un ritmo lento en dirección aboral (Madara, y Trier, 1987).

La **mucosa intestinal** consiste en un estrato simple de células que descansan sobre una capa de tejido conectivo laxo, vasos y nervios. Las estructuras por debajo de las células de superficie forman la lámina propia. Las células mucosas de superficie son primariamente de tipo epitelial, con

un número de células caliciformes secretoras de moco. En la parte basal del epitelio se encuentran células argentafines o enterocromafines (secretoras de hormonas) ocasionales (Creamer, B., 1974).

Las *células epiteliales* de la mucosa entérica poseen básicamente igual estructura que las células epiteliales transportadoras de los túbulos renales, conductos salivales y vesícula biliar. La superficie luminal está conformada por un ribete en cepillo constituido por numerosos microvellos (FIG No.1) (Madara, y Trier, 1987).

Los microvellos aumentan el área de la mucosa disponible para la digestión y absorción. Las membranas de los microvellos poseen mecanismos especiales para el transporte de monosacáridos y aminoácidos. También son capaces de absorber material por pinocitosis (Creamer, B., 1974).

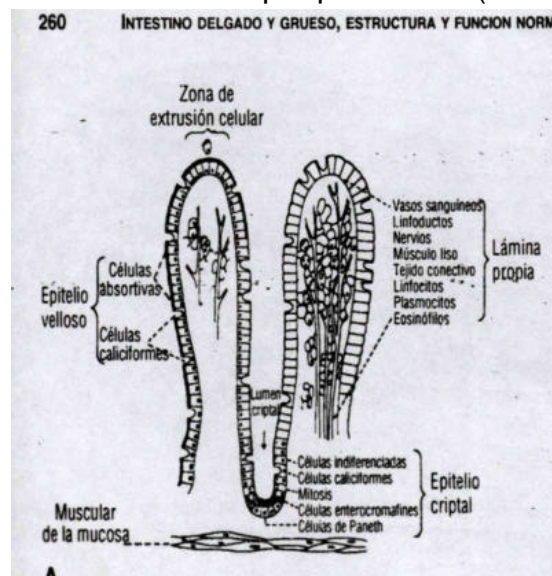


FIG. No.1. Esquema de dos vellos y una cripta seleccionados para apreciar la organización histológica de la mucosa del intestino delgado.

Las *células* mucosas de superficie que secretan moco se llaman *caliciformes*. Se interponen entre las células epiteliales, con aumento en su concentración relativa en los sectores intestinales distales. El borde luminal de las células caliciformes contiene pocos microvellos (Madara, y Trier, 1987).

Las células epiteliales sobre los vellos difieren de las que se localizan en las **criptas** de Lieberkuhn. Las primeras están totalmente diferenciadas porque sintetizan y secretan enzimas y realizan funciones absortivas. Las células vellosas maduras se desarrollan a partir de las inmaduras criptales mediante un movimiento migratorio hasta la punta. Durante la migración, las células maduran y adquieren la función específica de la célula vellosa. Las células están totalmente maduras cuando la migración se ha completado en un tercio a la mitad de su recorrido. Las células criptales son morfológicamente inmaduras. Sus ribetes en cepillo están subdesarrollados y el aspecto intracelular semeja el de las células secretorias más que absortivas. La secreción de líquido intestinal puede ser una función normal de las células criptales. La función primaria de las células criptales es la sustitución de los enterocitos vellosos maduros (Creamer, B., 1974).

Las *células productoras de hormonas peptídicas* residen en la superficie de la mucosa entremezcladas con las células epiteliales. Hasta 15 tipos de

células endocrinas-paracrinas fueron identificadas en el canal alimentario (Solcia, E., y colaboradores, 1987).

Las células epiteliales de la mucosa normalmente se descaman desde las puntas de los vellos y son sustituidas por otras que migran a partir de las criptas. El número de células en cualquier vello está determinado por el nivel de producción de nuevas células y el grado de pérdida de células maduras. La velocidad de la división celular está controlada por factores humorales (Barrowman, J., 1975 y Hughes, y Dowling, 1978).

Una serie de factores promueven el aumento del recambio celular y pueden llevar a la atrofia de la mucosa. El trauma físico o químico incrementa la pérdida de células; la microflora normal reduce el promedio de vida celular a la mitad del que tendría que ser si no hubiera microorganismos. El aumento de la densidad poblacional bacteriana ocasiona atrofia en los vellos (Eastwood, G., 1977). Las protozoosis incrementan el recambio celular epitelial (MacDonal y Ferguson, 1978). Las modificaciones dietéticas y los cambios en la composición de la microflora pueden acelerar la pérdida de las células mucosas. Las drogas que interfieren con la división celular o las funciones metabólicas bloquean la renovación normal, con el resultado de una atrofia en la mucosa (Eastwood, G., 1977).

El equilibrio entre la renovación y la pérdida determina el tamaño del vello. El crecimiento que supera a las pérdidas causa hipertrofia vellosa, y viceversa. El tiempo de migración de las células criptales es mucho más corto cuando los vellos están atrofiados, lo cual sugiere que las células vellosas no están completamente maduras (Johnson, L., 1975).

La **submucosa** está separada de la mucosa por la capa muscular de la mucosa. Contiene vasos sanguíneos, linfoductos y nervios distribuidos en un retículo laxo de tejido conectivo. También contiene glándulas aunque en los animales pequeños éstas se limitan a los primeros centímetros del duodeno. Las glándulas de Brunner se caracterizan por ácidos de células secretoras de moco cuboides que producen un líquido acuoso alcalino (Madara, y Trier, 1987).

Estrato muscular. La pared intestinal posee una delgada capa externa de músculo liso longitudinal y una capa interna más gruesa de músculo circular. El músculo liso intestinal es similar al que se encuentra en otras partes del cuerpo (Gabella, G., 1987).

El control **neural** de la función entérica está mediado por nervios que hacen sinapsis en una serie de diferentes ganglios en la pared del intestino (Gabella, G., 1987).

Y por último la superficie de la mucosa **colónica** es plana y no contiene vellos. Las glándulas tubulares rectas se extienden desde la superficie a través de todo el espesor de la mucosa, alcanzando la muscular de la mucosa. Estas glándulas, llamadas criptas de Lieberkuhn, poseen células mucosas y epiteliales próximas a la superficie y principalmente células mucosas en los lugares más profundos de la glándula. La superficie esta revestida en su mayor parte por células epiteliales. Las células criptales se multiplican y diferencian a medida que migran hacia las paredes glandulares para reemplazar el epitelio de superficie. Las glándulas tubulares se distribuyen en formaciones cerradas dejando un mínimo espacio para la lámina propia. El resto de la pared colónica tiene semejanzas histológicas con la del ID (Creamer, B., 1974). En ocasiones dichas células presentan una clase de fisiopatologías como la diarrea (enterorrea), una de las manifestaciones de enfermedad intestinal más constantes; que es definida como un cambio en la frecuencia, consistencia o volumen de las deposiciones (Madara, y Trier, 1987).

La acumulación de partículas con actividad osmótica dentro del canal intestinal, las fracturas en la permeabilidad de barrera entérica, la estimulación de los mecanismos secretorios del intestino y la alteración de la motilidad intestinal pueden inducir enterorrea. De estos patomecanismos, las enfermedades diarréicas osmóticas y la diarrea resultante de desordenes en la permeabilidad serían los motivos más corrientes de enterorrea canina y

felina. Es importante destacar que más de un proceso fisiopatológico puede operar de manera simultánea en muchos pacientes con diarrea (Ooms, L., y Degryse, A., 1986).

Las diarreas de los animales son generalmente multifactoriales (parasitos, bacterias, protozoos y virus) y las interacciones de agentes infecciosos con factores inmunológicos, ambientales y nutricionales pueden exacerbar la enfermedad. Los virus considerados como causas principales de diarreas en los animales domésticos pertenecen a la familia Reoviridae, los Coronaviridae, otras familias implicadas son los Caliciviridae, Astroviridae y Parvoviridae. La infección tiene lugar por ingestión de los virus, excepto en el caso de infección sistémica. Los periodos de incubación son muy breves (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Los distintos virus infectan de modo característico diferentes zonas de las vellosidades intestinales. Los Rotavirus y los Coronavirus infectan las células de los extremos de las vellosidades y los Parvovirus las de las criptas. Todos originan un marcado acortamiento y en ocasiones una fusión de las vellosidades adyacentes, determinando una reducción de la superficie de absorción del intestino que da lugar a acúmulo de fluidos y diarrea (FIG. No.2). La infección comienza generalmente en la porción proximal del intestino delgado y se extiende progresivamente hacia el yeyuno y el íleon y, en ocasiones, hasta el colon. La extensión de esta diseminación depende de

la dosis inicial, de la virulencia del patógeno y del estado inmunológico del hospedador. En presencia de anticuerpos de origen materno puede producirse la infección, pero el paso de replicación está limitado y la diarrea es leve e incluso casi inexistente (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

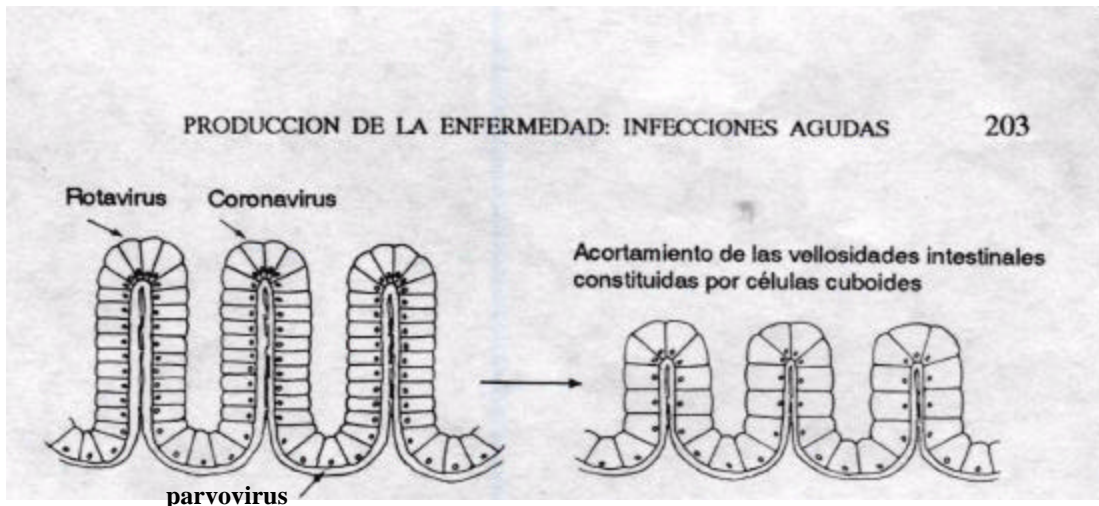


FIG.No.2. Localizaciones preferentes de replicación de los virus enteropatógenos en las vellosidades intestinales y efectos sobre las mismas. Los coronavirus y rotavirus se replican en las células de la punta y los parvovirus en las células en multiplicación de las criptas (Fenner y colaboradores, 1992).

En el caso de los Rotavirus y Coronavirus que infectan las células de los extremos de las vellosidades, las células absortivas son reemplazadas, a medida que progresa la infección, por células epiteliales cuboidales con mucha menos capacidad de absorción y actividad enzimática. Estas células son relativamente resistentes a la infección vírica, por lo que la enfermedad suele ser autolimitante si la deshidratación no es tan grave como para causarle la muerte. La recuperación es rápida, ya que las células de las criptas no están lesionadas. En contraposición, la recuperación de las

infecciones por Parvovirus, que infectan las células de las criptas, es lenta (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

El mecanismo de pérdida de fluidos en las infecciones víricas es diferente al de las infecciones bacterianas, pero la pérdida neta puede ser de la misma magnitud. En las infecciones víricas la pérdida de fluidos corresponde principalmente al líquido extracelular, debido a la mala absorción, y a las pérdidas osmóticas debidas primariamente a la presencia de lactosa no digerida en el lumen (en animales lactantes) más que a una secreción activa. A medida que los virus destruyen las células absortivas se pierden las enzimas responsables de la digestión de disacáridos y con la destrucción de células diferenciadas disminuyen las actividades de transportador de sodio, glucosa, ATPasa Na^+ , K^+ . Esto da lugar a una pérdida de sodio, potasio, cloro, bicarbonato y agua, que conduce a la aparición de acidosis. Otra causa de acidosis es el aumento de la actividad microbiana asociada a la fermentación de la leche no digerida. La acidosis puede originar un intercambio de K^+ a través de la membrana celular que afecta a las funciones celulares que mantienen las concentraciones de potasio normales. La hipoglucemia resultante de la disminución de la absorción intestinal de la glucosa, de la inhibición de la gluconeogénesis y del aumento de la glucólisis completa el complejo de cambios fisiopatológicos, que si no se corrigen rápidamente conducen a la muerte del animal.

El tratamiento eficaz de las diarreas víricas en animales jóvenes exige una rápida acción encaminada a evitar la pérdida continua de fluidos y electrolitos. Esto se consigue fácilmente en las granjas eliminando la leche de la dieta. Con ello se disminuye la cantidad de lactosa no digerida en la luz intestinal, la pérdida de líquidos y el desarrollo de la acidosis. La terapia incluye también administración parenteral de soluciones equilibradas de electrolitos. La utilización de sueros vía endovenosa y el minucioso control del estado de deshidratación pueden salvar un alto porcentaje de los animales más gravemente afectados, pero en muchos casos no resulta práctico.

En ocasiones las diarreas de los animales son causadas por más de un virus. Cuando los virus presentan distintos puntos de replicación, el efecto combinado de ambos puede ser muy grave. Además, muchas infecciones bacterianas, por ejemplo por *E. Coli* enterotóxico, son más graves si se afectan en combinación con infecciones víricas (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Las diarreas víricas son básicamente enfermedades de las primeras semanas, la susceptibilidad disminuye rápidamente con la edad. Para evitar las infecciones de los animales recién nacidos los anticuerpos maternos deben estar presentes continuamente en la luz intestinal. Sin embargo, estos no perduran más de siete días, a menos que la hembra haya sido

hiperinmunizada frente a los agentes etiológicos comunes (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

1.1. HISTORIA

La enteritis viral se diagnóstico por primera vez en 1947 en Canadá y luego en los Estados Unidos, desde 1958 se difundió en Europa (Mogollon, J., 1981).

Los primeros parvovirus autónomos (CPV-1) “virus diminuto canino” fueron aislados en 1967 de las heces de perros normales. Hasta hoy su patogenicidad no ha sido establecida, pero se considera que puede ser causante de diarreas pasajeras no fatales en cachorros (Carmichael, L., 1991; Fenner,F., 1992; Macartney, L. Thompson, H., 1984; y Mogollon, J., 1981).

En 1970, en la República Federal de Alemania, Binn y colaboradores aislaron el virus diminuto de los caninos el cual fue designado como CPV-1, sin embargo este no tiene relación alguna con la hoy conocida enfermedad de la Parvovirosis Canina.

Posteriormente en 1978 se demuestra por primera vez el virus de la Parvovirosis Canina (CPV-2, o tipo II) en una camada de cachorros de nueve

meses de edad, los cuales presentaban una enteritis contagiosa que se observó casi simultáneamente en todo el mundo (Fields y colaboradores 1990).

De 1981 a 1982 hubo una reaparición de casos clínicos de enteritis canina revelada como una variante nueva del parvovirus canino tipo II que causa una alta morbilidad (pero baja mortalidad) entre perros infectados. Esta nueva variante fue identificada como parvovirus canino tipo 2a. Este tipo primariamente infecta el tracto gastrointestinal, se replica en el intestino delgado a una velocidad mayor que el parvovirus tipo II, en perros y otros caninos salvajes (Brooks, 1993 y Macintire, M.,1997).

Después se desarrolló otro variante (CPV-2b) ocurridos en 1987 o antes. Más del 80% de los aislamientos en los Estados Unidos son ahora de CPV-2b. En Europa, sin embargo los subtipos (2a y 2b) ocurren igualmente (Abood, S., 1995). Los subtipos CPV-2a y CPV-2b pueden ser distinguidos por su restricción de modelos de endonucleasas y reactividad con anticuerpos monoclonales (Macintire, M., 1997).

Las variantes genómicas de los subtipos mencionados se explican más detenidamente en la evolución del parvovirus canino.

Los sueros más antiguos de CPV-positivos, o reporte más temprano, fueron colectados en Grecia durante 1974, de 28 perros examinados; el diagnóstico de tres muestras fueron confirmadas un año después por ensayos de neutralización del virus. Bélgica y Holanda también posee sueros colectados entre 1976 y 1977. Durante 1978, el virus se difundió por todo el mundo, encontrando casos positivos a CPV, en Australia en Mayo, en Estados Unidos durante Junio; Dinamarca, entre Febrero y Junio; en Nueva Zelanda, entre Julio y Octubre; Japón en Julio de 1978. (Koptopoulos, 1986; y Parrish, C., 1990)

En Colombia, Mogollón J. y colaboradores (1981) describieron los aspectos clínicos y morfológicos de la enfermedad en el momento de su aparición en el país a finales de 1980 y posteriormente en 1984 los mismos autores reportan estudios de diagnóstico serológico para la identificación de la entidad.

La distribución del virus en el mundo, es consecuencia de los altos títulos de éste en la heces de los perros infectados y la resistencia del parvovirus a la inactivación, el cuál pudo ser transportado, probablemente en objetos inanimados hacia otros países con estricta cuarentena para perros procedentes de áreas endémicas (Parrish, C. 1990).

Estudios desarrollados en los Estados Unidos, Italia, Inglaterra y Japón, han demostrado que la Parvovirus canina ha sufrido varios cambios genómicos en un periodo relativamente corto desde su descubrimiento, hasta hoy. Se cree que estos cambios le confieren al virus mayor adaptabilidad y resistencia al medio ambiente (Sagazio, P. y colaboradores, 1998).

Los mapas genéticos, elaborados por medio de endonucleasas de restricción, del virus de la enteritis del visón y del virus de la panleucopenia felina son virtualmente idénticos, y se ha sugerido que el parvovirus felino se introdujo en la población de los visones de Ontario (Canadá) cerca de 1946. El origen del parvovirus canino es más intrigante y menos claro, en parte debido a que aparentemente apareció de forma simultánea en los cinco continentes en 1978. Los mapas genéticos revelan que las cepas de parvovirus canino aisladas en 1978 en todo el mundo son idénticas, pero difieren en cerca del 15% de los puntos de restricción de las cepas salvajes y de la mayoría de las vacunales del parvovirus felino. Sin embargo, esta cepa vacunal felina presenta una similitud mayor con el parvovirus canino. Dado que la enfermedad apareció en los perros en Australia en 1978 y que en dicho país existe un periodo de cuarentena de 6 meses previo a la entrada de perros en el mismo, el virus felino mutante llegó probablemente en un viajero internacional, quizá como contaminante en los zapatos o en otros fómites (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

1.2. EVOLUCION DEL PARVOVIRUS CANINO

Se considera el origen de la parvovirus canina como un problema de especulación.

La enfermedad fue caracterizada por la muerte con síntomas previos de miocarditis crónica en cachorros de 3 a 16 semanas de edad o pirexia acompañada por vómito y/o diarrea en otros animales (Parrish, C., 1990).

La infección por el virus presenta una alta morbimortalidad y un especial tropismo por células de la mucosa intestinal y del músculo cardíaco. Clínicamente se evidencia por enteritis hemorrágica, miocarditis y severa panleucopenia. El cuadro clínico y patológico de la enfermedad se ve estrechamente relacionado con la panleucopenia felina (FPV) y la enteritis del mink (MEV). (Appel, J.J.G., Scott, F.W. and Carmichael, L.E. (1979), Mc Candlish, I.A.P., Thompson, H.J.C., Cornwell, H., Laird, N.G. and Wright, N.G. (1980)).

La enteritis y signos observados fueron similares a los de la FPV en gatos o MEV en el mink, con necrosis en el epitelio de las criptas intestinales, acortamiento de las vellosidades del intestino, necrosis y deplesi3n de los linfocitos en varios tejidos linfoides (Parrish, C., 1990)

Sueros colectados antes de 1978 y examinados por inhibición de la hemaglutinación y sero neutralización, probaron que la enfermedad no fue endémica en perros antes de 1978. (Carmichael, L.E., Joubert, J.C., and Pollock, R.V.H. (1980)). Esto permitió hipotetizar que “ el virus de la panleucopenia felina (FPV) fue adaptado a células caninas deliberadamente durante la producción de la vacuna viva atenuada de la FPV ó que accidentalmente por contaminación de cultivos celulares caninos con el FPV en el laboratorio, y que después de mutar esta cepa vacunal de FPV es virulenta para perros, de tal forma se diseminó por el mundo a través de las vacunas.” Como otra alternativa, Sugiere McMaster y su grupo (1981) que “ el CVP se desarrolló a partir del virus de la enteritis del mink, pues se asume que el virus del mink está estrechamente relacionado o que incluso es idéntico al FPV y frecuentemente se le refiere como una de las más nuevas cepas del FPV.(Truyen, 1996; Revie,D. 1979; Bonnard,G.D. 1976 y Currier,T.C. 1976).

El genoma del parvovirus canino y el virus de la enteritis del Mink fueron comparados por Mc Master, Gary y colaboradores en 1981 usando análisis enzimático de restricción de la forma replicativa del DNA. De 79 sitios mapeados, 68 (86% del genoma), fueron encontrados como comunes entre los dos virus. Sin embargo, si ellos evolucionaron de un precursor común o si el CPV es derivado del virus de la enteritis del Mink, no se ha podido todavía establecer.(Mcmaster,G.K. 1981).

El conocimiento de la evolución de los virus es importante para el entendimiento de las vías por las cuales ellos se adaptan a sus huéspedes. Parrish y colaboradores, reportan en 1985 variaciones de un nuevamente reconocido parvovirus durante los primeros siete años después de que este emergiera en perros. Examinando aislados de CPV obtenidos después de 1978, determinó el límite al cual el virus evolucionó genética y antigénicamente durante este tiempo, mostrando que el virus original CPV2 fue reemplazado entre 1979 y 1981 por un nuevo virus designado como CPV2a.

Entonces, se conocen dos tipos que derivan del Parvovirus Canino: El virus diminuto de Caninos (MVC) (CPV-1), y el Parvovirus Canino II (CPV-2) (Valencia, M., 1997; Solon, 1977 y Paradiso, 1981).

Las propiedades genómicas y antigénicas del MVC son distintas a las de otras especies. El perro es el único huésped conocido (Carmichael, L., 1991). El Parvovirus Canino II, es el más común referido a la parvovirus y es el responsable de la miocarditis y enteritis parvoviral canina (Madsen, M., 1994).

Muchas explicaciones se han propuesto para justificar el cambio del CPV-2. Primero un giro antigénico pudo haber ocurrido en respuesta a la presión inmune. La población canina de los Estados Unidos, la cual fue inmunológicamente ingenua para el CPV en 1977, fue lo contrario para 1980 y un tipo antigénico alterado del virus pudo tener una ventaja selectiva. Sin embargo hay reactividad cruzada entre las cepas viejas y nuevas del virus, observándose que muchas vacunas de uso corriente contra el CPV que son derivadas de las cepas viejas, aun parecen mostrar eficacia (Parrish,C.R. y colaboradores 1984). Por esta razón se ve improbable que los cambios fueran solamente favorecidos por la selección inmune.

Una segunda explicación, puede ser, que las nuevas cepas emergieran de una vacuna y que esta sea la razón de su amplia diseminación, sin embargo los estudios realizados en vacunas vivas modificadas en Europa no apoyan esta posibilidad (Parrish,1991).

Una tercera posibilidad sugiere que los virus nuevos se adaptan mejor para replicarse en perros y así se dispersaron más eficientemente. Es posible que el CPV original fuera el primer virus en infectar perros y que el virus haya evolucionado a una mejor forma en este nuevo huésped. La pérdida de un epítotope común entre el CPV - FPV del primer aislado y la adquisición de un nuevo epítotope específico para el CPV nuevo sugiere que este pudo

evolucionar aparte del FPV en una forma mejor adaptada en perros.(Parrish,C.R. y colaboradores 1985).

Sin embargo no se descarta la posibilidad sugerida por la cercana relación antigénica y genética, incluyendo una gran mayoría de homología en la secuencia que existe entre CPV-2, FPV y el MEV (Truyen y colaboradores 1994), el CPV-2 pudo haberse originado por una mutación genética en un huésped silvestre receptivo a uno de los parvovirus ligados al FPV que infectan carnívoros (Truyen y colaboradores 1995).

Si esta teoría es verdadera, Colombia posee una amplia y variada población tropical de vida silvestre y con grandes posibilidades de mutación y selección viral.

Posteriormente en 1991 Parrish y su grupo, mostraron que muchos de los virus aislados de perros después de 1986 en muchas partes de los Estados Unidos, difirieron antigénicamente de los virus aislados antes de esta fecha (CPV2 y CPV2a). El nuevo tipo antigénico designado como CPV 2b, fue remplazando ampliamente a los tipos antigénicos previos. Esto representa la segunda ocurrencia de un nuevo tipo antigénico de este virus DNA desde 1978. La secuencia comparativa del DNA mostró que los dos tipos 2b y 2a difieren por dos sustituciones de nucleótidos no sinónimos en los genes VP1 y VP2 de la proteína de la capsida (Tabla No.1).

GENO-TIPO	SECUENCIA 3025 - 3045	SECUENCIA 3685 - 3706	SECUENCIA 4043 - 4062	SECUENCIA 4449 - 4470
CPV-2	GAAGAGTGGTTGTAAATAATA	CTACTAACTTTGGTGATATAGG	CTTTAACCTTCCTGTAACAA	GTAGATAACCAATTTAACTATG
CPV-2a	GAAGAGTGGTTGTAAATAAT <u>I</u>	<u>G</u> TACTAACTTTGGT <u>I</u> TATATAGG	CTTTAACCTTCCTGTAACAA	<u>A</u> TAGATAACCAATTTAACTATG
CPV-2b	GAAGAGTGGTTGTAAATAAT <u>I</u>	<u>G</u> TACTAACTTTGGT <u>I</u> TATATAGG	CTTTAACCTTCCTGTAAC <u>A</u> G	GTAGATAACCAATTTAACTATG

TABLA No.1. Variación de secuencia de nucleótidos entre los diferentes genotipos de CPV-2.

FUENTE : Pereira, C., 2000.

C. Parrish y colaboradores en 1991, uso en su investigación anticuerpos monoclonales y análisis de enzimas de restricción para demostrar que el original tipo antigénico (CPV-2) fue desplazado entre 1979 y 1981 por una variante antigénica (CPV-2a) que es diferente en el gen que codifica por la proteína de capsido. Una segunda variante antigénica (CPV-2b) aparece alrededor de 1984, y esta difiere del CPV-2a solo por la sustitución de un (1) aminoácido (Asn→ Asp).

El análisis filogenético mostró una evolución progresiva distinta de la del tipo CPV original; este patrón de evolución viral es quizá más similar al que se ve en algunos virus de la influenza tipo A (Parrish, C. Y colaboradores, 1991).

En 1995 Greenwood y colaboradores, aíslan CPV de casos clínicos de enteritis en el Reino Unido, Alemania y Estados Unidos, y los diferencian por enzimas de restricción, en tres grupos, los tipos CPV2, CPV2a y CPV2b.

Los tres grupos fueron rápidamente identificados por su perfil de restricción a la enzima HphI. El CPV2 no fue prevalente como causante de enfermedad canina después de 1986. Solamente dos cepas de CPV2 se encontraron dentro de 110 cepas aisladas después de 1980. En Europa la frecuencia de aislamiento del CPV2a y CPV2b fueron similares, mientras que en los Estados Unidos la cepa predominante fue la CPV2b. Perros inoculados con una cepa vacunal, fueron resistentes a la infección después de la descarga con cepas CPV2a CPV2b aisladas en el Reino Unido.

En Colombia no se han publicado trabajos concernientes a la identificación del genotipo viral existente en el país.

1.3. PROPIEDADES DE LOS PARVOVIRUS

1.3.1. ETIOLOGIA

Existen tres géneros de la familia *Parvoviridae*: **Parvovirus**, cuyos miembros infectan a los vertebrados, se replican de forma autónoma y es el tipo al cual pertenece el parvovirus canino; **Dependovirus**, que son defectivos y dependen de un virus cooperador para su replicación, normalmente un adenovirus; y **Densovirus**, todos los cuales infectan a insectos (Fenner, F. y

colaboradores, 1992). Por lo tanto, el parvovirus canino (CPV) se clasifica como:

- Familia *Parvoviridae*,
- Género *Parvovirus*;
- Especie, *Parvovirus Canino*

El parvovirus es un virus desnudo, de replicación autónoma, posee un virión pequeño de simetría icosaédrica y un pequeño genoma no segmentado formado por ADN lineal de cadena sencilla (Appel, J. y colaboradores 1979, Carmichael, L. y colaboradores 1980).

El virión de los parvovirus tiene 20 nm de diámetro aproximadamente, su cápside icosaédrica, probablemente esta formada con 32 capsómeros, que encierran el genoma DNA de cadena sencilla y de sentido (-), de 5,2 kb de tamaño. Los parvovirus de cualquier género pueden contener una cadena de sentido (-) o bien de sentido (+). En la actualidad se conoce la secuencia completa de nucleótidos de diversos parvovirus (Chapman, 1993; Fenner, F., 1992; Tsao, 1991).

La cápside está formada por tres proteínas estructurales VP1, VP2, y VP3; derivadas todas ellas de una secuencia común que se lee en el mismo molde. La VP1 y VP2 son productos del mismo gen unidos en diferente

forma. La proteína VP3 representa un grupo proteolítico, formado por remoción de una porción aminoterminal del VP2, pero el sitio exacto desdoblado in vitro aún no ha sido establecido (Fenner, y colaboradores, 1992; Langeveld, J., 1994).

Jun Tsao y colaboradores (1991), determinaron que los viriones del CPV contienen 60 subunidades proteicas que son predominantemente VP-2.

Los Parvovirus carecen del gen encargado de codificar la enzima DNA-polimerasa requerido para su replicación. Como consecuencia solo puede replicarse en células en que exista la DNA polimersa, es decir, que se hallen en la fase S (síntesis de DNA) del ciclo de la mitosis, fase que solo dura unas pocas horas. Esto explica el evidente tropismo por las criptas del epitelio intestinal, médula ósea, y células linfoides (Chandler, H. Y colaboradores, 1986; Hill, M., 1994; Jones, B., 1989; Valencia, M., 1997).

El genoma entero, incluyendo los extremos, es de 5,323 nucleótidos de longitud. El extremo 3' del genoma, guarda características estructurales similares pero homología limitada con el parvovirus de los roedores; mientras la organización genómica del CPV es muy similar a la del virus de la panleucopenia felina (FPV), en donde el rango de especificidad de huésped y la antigenicidad entre los FPV y CPV se diferencian por el cambio de algunos nucleótidos (Reed,A.P. y colaboradores 1988; Solon, 1985; Parrish, 1983).

Los parvovirus son notablemente resistentes a las condiciones ambientales (valores extremos de temperatura y pH), por lo que la desinfección de las instalaciones resulta difícil (Fenner, F. y colaboradores, 1992), sin embargo se ha demostrado que el hipoclorito de sodio funciona (Zee, y colaboradores, 1990).

1.3.2. REPLICACION VIRAL

Los miembros del género *Parvovirus* se replican en el núcleo de las células en constante división (Levy, J., 1994); tienen tropismo por las células del miocardio o células intestinales (Fenner, F. y colaboradores, 1992). Precisan de algunas funciones celulares que se generan tan sólo al final de la fase S o al principio de la fase G2 del ciclo mitótico (Levy, J., 1994) (FIG.No.3). Debido a su pequeño tamaño, los parvovirus han sido objeto de numerosos estudios dirigidos a comprender la replicación del ADN y la expresión genética. Se han identificado dos unidades principales de transcripción, a partir de los cuales se transcriben tres ARNm principales. Los ARNm tienen un extremo 3' común, son poliadenilados y están empalmados (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

El ARNm más abundante codifica proteínas estructurales que aparecen al final de la infección y su información más importante se localiza en la mitad

derecha del genoma, mientras que la información para la proteína no estructural que interviene en la replicación del ADN se localiza en la mitad izquierda del genoma, NS1 y NS2 (Levy, J., 1994; Strassheim, 1994; y Vasudevacharya, 1992).

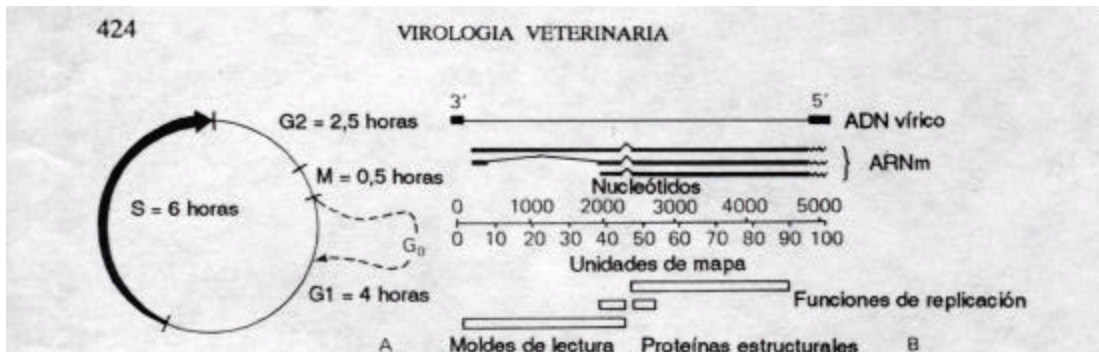


FIG.No.3. La replicación del ADN se produce a través de una forma replicativa de doble cadena, iniciada mediante un mecanismo auto-iniciador por la secuencia palindrómica 3'-terminal. Tras la replicación del ADN se ensamblan las cápsides víricas dentro de las cuales se localiza el ADN de cadena sencilla de la progenie. Los parvovirus producen grandes cuerpos de inclusión intracelulares (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

La transactivación se asemeja a la observada en otros virus DNA y en retrovirus humanos (Levy, J., 1994).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

1.4.1. HUESPED

El Parvovirus, se replica de forma selectiva en células en división y originan enfermedades importantes en cerdos, gatos, perros, visones y gansos (Fenner, F. y colaboradores, 1992) Tabla No. 2.

VIRUS	SIGNOS
Parvovirus porcino	Mortinatalidad, aborto, muerte fetal, momificación e infertilidad.
Virus de la panleucopenia felina	Hipoplasia cerebral, panleucopenia, enteritis
Parvovirus canino	Enfermedad neonatal generalizada, enteritis, miocarditis, panleucopenia
Virus de la enteritis del visón	Panleucopenia, enteritis
Virus de la enfermedad aleutiana del visón	Enfermedad crónica por complejos inmunes, encefalopatía
Parvovirus del ganso	Hepatitis

TABLA No.2. Enfermedades de los animales domésticos producidas por parvovirus

FUENTE: Fenner, F. y colaboradores, 1992.

Este virus también ha sido aislado de vacas y roedores de laboratorio, pero no se ha demostrado que en condiciones naturales sea causa de enfermedad en esas especies.

Los parvovirus de los roedores se utilizan como modelo en los estudios sobre la patogenia de algunas anomalías fetales y son contaminantes habituales

de los tumores y cultivos celulares de origen murino (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Durante septiembre de 1979 en el zoológico del Departamento de Conservación de Front Royal, un perro salvaje, un lobo de manada y un zorro desarrollaron la enfermedad caracterizada por anorexia, letargia, vómito y diarrea hemorrágica (Margni, R., 1977).

Por las evidencias serológicas de la infección en zorro azul y lobos grises, quizás la mayoría de los cánidos sino todos, son susceptibles. A pesar de los últimos reportes los mapaches, no parecen ser sensibles a la infección por Parvovirus; tal vez exista un virus del mapache distinto que comparten una reactividad cruzada, tanto con CPV-2 como con el de Panleucopenia Felina. Sin embargo, los resultados no son concluyentes (Green, C., 1993).

Cuando en 1978 se describió por primera vez la presencia de la parvovirus canina, toda la población canina del mundo era completamente susceptible. El proceso neonatal generalizado era entonces infrecuente para la miocarditis y la panleucopenia y enteritis eran muy comunes. Al igual que la hipoplasia cerebelar en los gatos producida por el parvovirus felino, la miocarditis es rara en la actualidad. Tan sólo con algunas excepciones, los anticuerpos transmitidos pasivamente por la madre protegen a los cachorros más allá de las 2 semanas y 8 semanas, periodos que parecen ser la edad

límite para el desarrollo del proceso neonatal generalizado y la miocarditis, respectivamente. En la actualidad, la parvovirus canina, predominante en su forma de panleucopenia-enteritis, es una enfermedad enzootica en todo el mundo, siendo su epidemiología similar a la de la panleucopenia felina (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

El B19 es el único Parvovirus conocido como patógeno para los humanos y se ha introducido en el curriculum médico como un agente causante de enfermedad humana. No hay estudios que proporcionen evidencia de infección en humanos, sin embargo, se ha reportado el incremento en la incidencia de diarrea en humanos durante un brote parvoviral (Brooks, 1993).

En 1975 un parvovirus humano (B19) fue descubierto en suero de un donador de sangre normal, subsecuentemente fue identificado como agente de (a) una transitoria aplasia o crisis de enfermedad hemolítica; (b) la quinta enfermedad o el llamado eritema infeccioso temido en la niñez (Fenner, F. y colaboradores, 1992); y (c) normal en adultos, síndrome polyartralgico. Los síntomas asociados con la infección del virus B19 son característicos de la rubeola también son de riesgo para los fetos (Levy, J. y colaboradores, 1994).

Hasta 1981 no se había comprobado que el Parvovirus fuera patógeno para el hombre, pero este puede ser portador primario por períodos prolongados (Mogollon, J., 1981).

Estudios realizados por Agbandje, M., y colaboradores (1994), donde analizan la estructura del parvovirus humano B19 a resolución 8 Å reporta que su superficie es significativamente diferente a la de otros parvovirus conocidos.

1.4.2. TRANSMISION

Ciertas razas de perros parecen tener más riesgo para la infección por parvovirus y son más susceptibles a la forma más intensa de la enfermedad. Estas incluyen Rottweilers, Doberman Pinscher y posiblemente Pit Bull Terrier y Labrador Retriever. Las bases biológicas para la susceptibilidad de estas razas se desconocen (Abood, S., 1995; Birchard, S., 1994; Brooks, 1993; Glickman, L., 1985; Green, C., 1993; Houston, D., 1996 y Nelson, R., 1995) . La mayor incidencia de la enfermedad, se presenta en noviembre, diciembre y enero en Alemania y tiene un mínimo en junio, julio y septiembre en Canadá (Houston, D., 1996 y Macintire, D., 1997).

La transmisión directa es por ruta oro-fecal. Los perros infectados excretan enormes cantidades de virus durante la fase aguda de la enfermedad (hasta

10 a la 12 viriones/gr de heces) (Thomas, B., 1995). También puede ocurrir la transmisión indirecta por fómites debido a que el virus es demasiado resistente y puede durar por periodos largos de tiempo en artículos contaminados (Jones, B., 1995; Bosch, 1999)

Muchos casos de miocarditis resultan por la ingestión del virus en el período inmediatamente después del nacimiento; pero es conocido que los parvovirus atraviesan la placenta y puede resultar una infección en útero durante el último tercio de la gestación (McCandlish, I., 1981).

La forma miocárdica de la infección ocurre en cachorros de perras las cuales no tienen anticuerpos contra CPV durante la preñez o el nacimiento. Estos cachorros no están protegidos en el útero y no adquieren anticuerpos protectivos vía calostrales. De 2 a 12 semanas los cachorros se enferman y mueren como consecuencia de la miocarditis aguda (McCandlish, I., 1980 y 1981; Thomas, B., 1995).

Se demostró que el virus diminuto de caninos CPV-1, causa infecciones trasplacentarias con resorción embrionaria, especialmente en hembras con inoculación parental anterior al día 30 de gestación (Carmichael, L., 1991).

La incidencia de la enfermedad es similar para ambos sexos (Macintire, D. 1997).

1.5. PATOGENIA

La patogenia de los parvovirus viene determinada por la necesidad de células en división para llevar a cabo la replicación viral. Tras la infección del feto (cerdo, perro o gato) o del recién nacido (perro o gato), el virus puede ser pantrópico, infectando a una amplia gama de células de diversos tejidos y órganos. En los animales de más edad, tan sólo afectan a una limitada gama de células; probablemente, los factores más importantes que determinan la susceptibilidad son el grado de división celular en un determinado órgano o tejido y la presencia de los receptores víricos adecuados sobre las células.

Ambos están determinados por la edad del animal. Así, el cerebelo es destruido selectivamente en los fetos felinos o en los gatos recién nacidos infectados durante el periodo perinatal y el miocardio resulta altamente susceptible en los cachorros de 3-8 semanas de vida y en los gansos de 0-2 semanas. La continua división de las células del tejido linfóide y del epitelio intestinal a cualquier edad hace que ambos sean muy susceptibles, por lo que la panleucopenia, la inmunosupresión concomitante y la enteritis son de presentación frecuente Figura No. 4 (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Según Parrish, C., (1990) los signos de la severa afección de los pacientes es consecuencia de la destrucción extensiva de las células del epitelio intestinal, que conlleva a deshidratación y shock endotóxico.

La patogenia de la infección por parvovirus canino en el perro es similar a la de la infección por parvovirus felino en el gato, pero la ausencia de hipoplasia cerebelar y la presencia de miocarditis es bastante sorprendente, al igual que la hipoplasia cerebelar del gato, la miocarditis del perro es, posiblemente, el resultado de la infección generalizada (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Para iniciar una infección viable, se determinó que el CPV requiere una exposición a pH bajo en un compartimento endosomal. Así mismo se ha visto por southern blotting y por hibridización *in situ* que el virus tiene un importante blanco sobre las células de los nódulos linfáticos mesentéricos y células del intestino delgado. (Truyen,U. y colaboradores 1992. Basak, S. y colaboradores 1992).

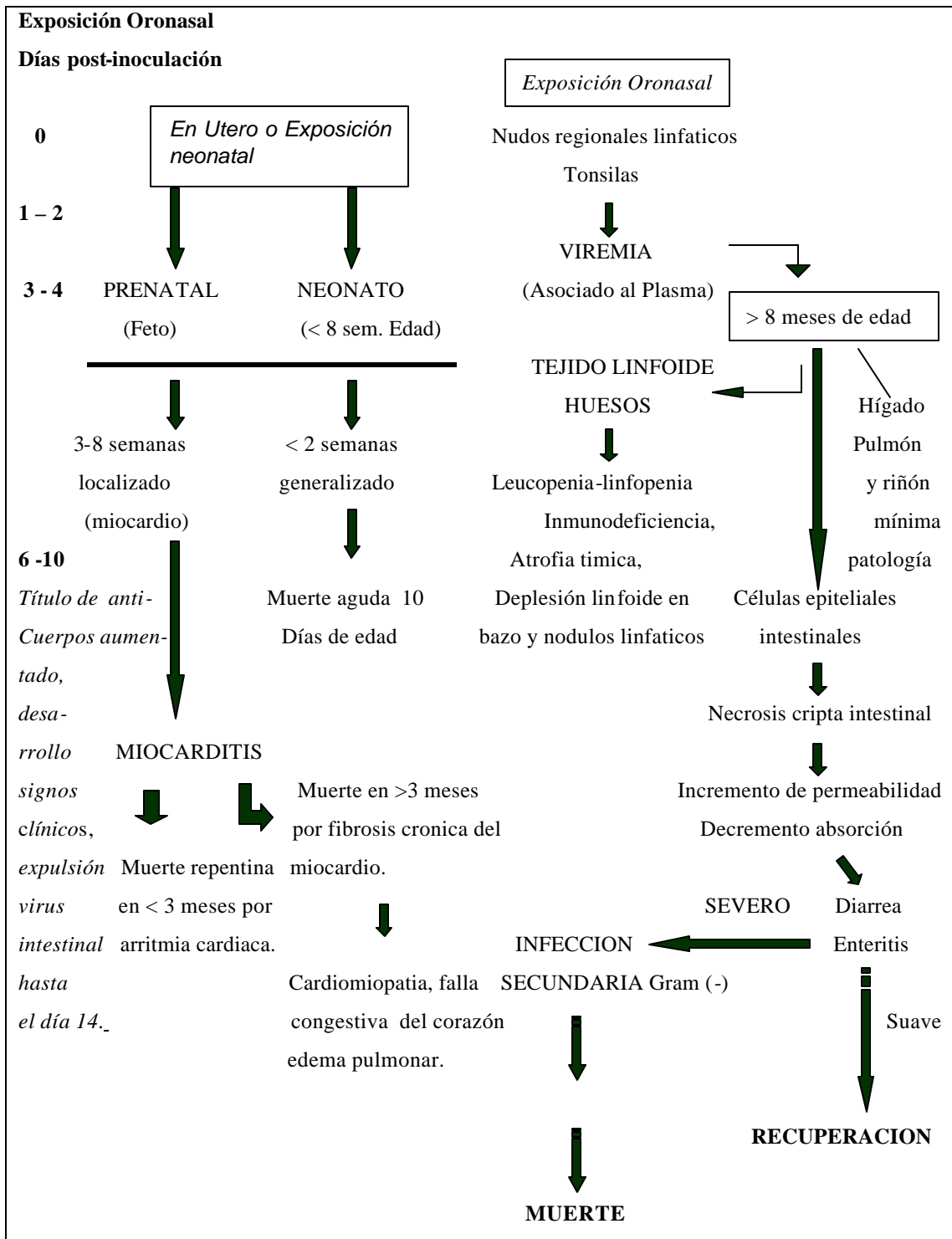


FIG. No. 4 .Patogenesis, secuencia de la infección de CPV-2.

FUENTE Hoskins, J., 1998.

La infección natural más frecuente es por la ruta oronasal, aunque los animales pueden ser infectados por ruta parental (madre-hijo) (Parrish, C., 1990).

La replicación viral del CPV-2 después de la infección comienza en tejidos linfoides del a orofaringe, nodulos linfáticos mesentéricos y timo, y es diseminado a las criptas intestinales por viremia, observada de 1 a 5 días post-infección. Subsecuentemente, el CPV-2 se localiza predominantemente en el epitelio gastro-intestinal (GI), mucosa oral y del esófago, intestino delgado y tejidos linfoides, nodulos linfáticos, y hueso (Hoskins, J., 1998).

El hueso puede ser afectado severamente, con una marcada disminución en las líneas celulares, mieloide, eritroide y células megacariocitas (Parrish, C., 1990).

También puede aislarse de pulmón, bazo, hígado, riñón y miocardio.

Normalmente madura en las células epiteliales de las criptas del intestino, y luego migra al epitelio germinal de las criptas intestinales, cuya característica es tener la capacidad de absorber y asimilar los nutrientes. (Hoskins, J., 1998)

El virus se generaliza de los sitios iniciales de replicación por vía sanguínea. Se detecta viremia primaria plasmática uno o dos días después de la inoculación. La replicación en los sitios infectados de forma secundaria, favorece la viremia marcada de la fase plasmática al tercer o cuarto día post-inoculación (Green, C., 1993). La viremia finaliza con el aumento del título sérico de anticuerpos neutralizantes que en principio surgen 5 a 6 días post-infección (Strombeck, D., 1995 y Studdert, M., 1983).

La replicación viral en el sistema linfopoyético y médula ósea (provocando aplasia medular), redundan en linfopenia y neutropenia respectivamente (Green, C., 1993 y Nelson, R., 1995).

La infección de las células epiteliales del intestino es observada aproximadamente a los 5 días después de la inoculación del virus (Chandler, E., 1986). La multiplicación del CPV en el intestino delgado mata las células epiteliales germinales de las criptas intestinales. Esto resulta en la incapacidad para la renovación normal del epitelio intestinal. Las vellosidades intestinales se acortan, fusionan y presentan epitelio cuboidal inmaduro; ocasionando necrosis epitelial, enterorrea hemorrágica y aplasia de las criptas (Hughes, 1978; Macintire, D., 1997; McCandlish, I., 1981 y Strombeck, D., 1995).

El Parvovirus infecta el epitelio germinal de las criptas intestinales causando destrucción y colapso en el epitelio. Como resultado, las células son perjudicadas (usualmente entre 1 y 3 días, en el intestino delgado), y las vellosidades comienzan a acortarse. La agresiva infección por CPV-2 es el resultado de una neutropenia y linfopenia. Las infecciones secundarias con bacteria Gram negativas y microflora anaerobia causa complicaciones adicionales relacionadas con el daño intestinal, como la bacteremia y endotoxemia (FIG. No.5).

La activa excreción del CPV-2 comienza al tercer o cuarto día después de la exposición; generalmente los signos clínicos aparecen más tarde. El CPV-2 es expulsado en cantidades altas en las heces por un máximo de 7 a 10 días. La producción de anticuerpos locales-intestinales son probablemente el factor más importante para que termine la excreción fecal del Parvovirus. Los títulos de anticuerpos en suero pueden ser detectados desde el 3 o 4 día después de la infección y permanecer constantes hasta por 1 año (Hoskins, J., 1998).

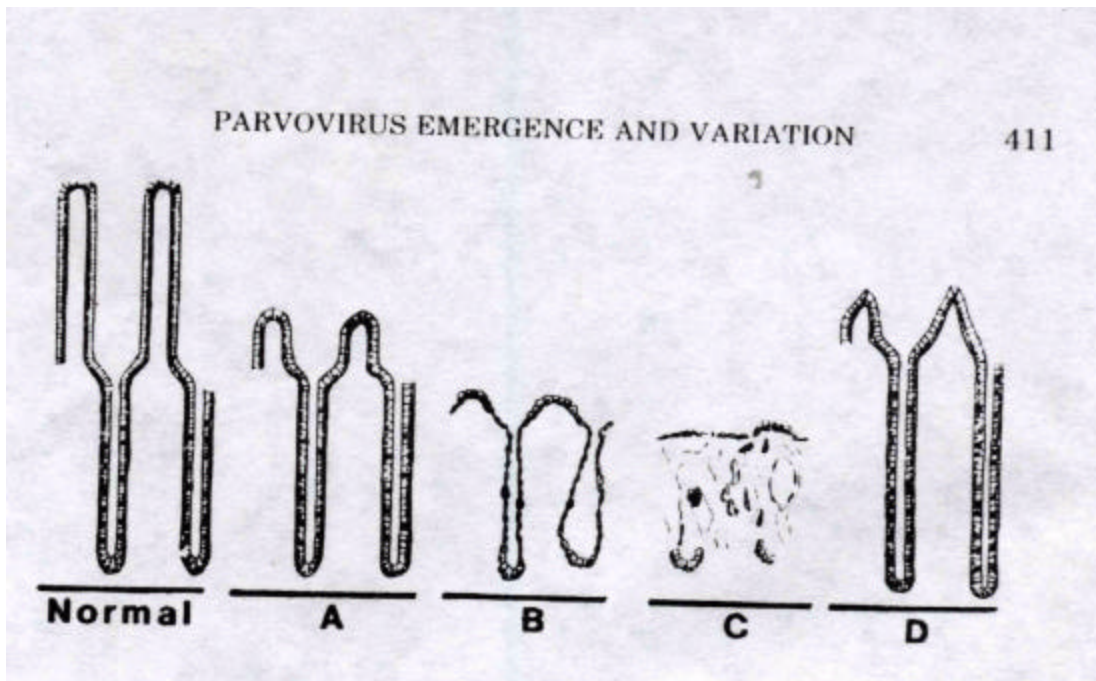


FIG.No.5. Lesiones del intestino delgado de un perro después de la inoculación con CPV. (A) se observa un tipo de lesión intestinal. (B) Mucosa duodenal con lesiones. Los vellos son acortados y ocasionalmente desaparecen. Las criptas son extendidas y lineadas con células epiteliales atenuadas. Los neutrófilos están presentes en la mucosa afectada. (C) La mucosa yeyunal con lesiones D) vellos regenerativos. El vello es corto y cubierto con epitelio cuboidal, las criptas se elongan y lineadas con epitelio de células cuboidales. FUENTE Parrish, C., 1990.

1.6. INMUNIDAD AL PARVOVIRUS

Tras la infección natural se produce una rápida respuesta inmune. En la neutralización y en la inhibición de la hemaglutinación parecen intervenir diferentes determinantes antigénicos. Los anticuerpos neutralizantes pueden detectarse a los 3-5 días de iniciada la infección y pueden alcanzar títulos muy elevados antes de que se produzca la recuperación clínica. La presencia de un título alto de anticuerpos está correlacionada con la

protección y parece que la inmunidad resultante de la infección natural dura toda la vida del animal. En los gatos y perros puede tener lugar la transferencia de algunos anticuerpos maternos a través de la placenta pero la mayor parte son vehiculados en el calostro. El título de anticuerpos transferido pasivamente a los cachorros de gatos y perros está relacionado con el título de anticuerpos de la madre, por lo que resulta variable y tiene un efecto protector tan solo de algunas semanas o bien de hasta 22 semanas (Ahmed, 1999; Fenner, F., 1992; Russell, 1992).

Las respuestas inmunes frente a la infección por parvovirus incluyen tanto un componente humoral del sistema linfoide como un componente secretor de la mucosa intestinal. A los tres días de haberse iniciado la infección, ya se detectan elevadas concentraciones de IgA en las heces y el suero, alcanzando su concentración máxima a los 7 días. Los anticuerpos séricos frente al parvovirus canino de tipo II pueden durar incluso 24 meses (Zee, Y., 1990).

Es fundamental resaltar que los anticuerpos parecen tener valor protector sólo en fases tempranas de la infección viral, cuando el microorganismo no ha alcanzado las células blanco, en donde se introduce quedando a salvo de la actividad biológica de las moléculas (Almansa, J., y colaboradores, 1996).

En el desarrollo de la resistencia frente a la enteritis debida al parvovirus canino, probablemente la inmunidad local del intestino sea más importante que la inmunidad humoral (Zee, Y., 1990).

Los anticuerpos constituyen el primer paso del mecanismo de destrucción de las células infectadas, no sólo por la citolisis en la que participa el complemento, sino además por el mecanismo conocido como citotoxicidad mediada por anticuerpos, en la que la principal célula involucrada parece ser la asesina natural (NK), pero en el que también otras células con receptores para la fracción Fc de las IgGs, (receptor CD16), como el macrófago, y el neutrófilo, participan. Las células NK pueden ser activadas para incrementar su capacidad de lisar células blanco por tratamiento con interferon I, interferon γ , factor de necrosis tumoral o IL2. La muerte de las células blanco las realiza la NK a través de mecanismos similares a los observados en los CTLs (Almansa, J. Y colaboradores, 1996).

Tras la infección o la vacunación se genera una respuesta mediada por células T citotóxicas (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

Zonas distintas de los antígenos virales son reconocidas por las células T y B, aún cuando pueden presentarse sobreposiciones. Las respuestas B se dan a regiones externas de las moléculas en áreas que están más sujetas a

variación molecular entre las cepas, mientras que los linfocitos T reconocen determinantes lineales distribuidos a través de la molécula, lo cuál también depende del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los determinantes reconocidos por la células T, no varían generalmente, entre cepas (Almansa, J. Y colaboradores, 1996)

1.7. INFECCIONES POR PARVOVIROSIS CANINA

La parvovirus canina, producida por el parvovirus canino 2, fue descrita por primera vez en 1978, cuando originó una panzootia mundial. Posteriormente se ha convertido en enzoótia en los perros de todo el mundo. El parvovirus canino 1 (también llamado virus diminuto canino) fue identificado en heces de perro en 1967, pero no se ha confirmado su papel como causa importante de enfermedad, aunque puede producir ligeras diarreas. Difiere bastante, tanto antigénica como genéticamente, del virus que en 1978 apareció como causante de una nueva enfermedad (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

1.7.1. SIGNOS CLINICOS

Se han descrito en los perros tres síndromes distintos relacionados con la edad. 1)El proceso neonatal generalizado es infrecuente. 2)Los síndromes panleucopenia-enteritis se asemejan con gran exactitud a los mismos

síndromes del gato, pero la hipoplasia cerebelar que se observa en los gatos no se ha descrito en los perros. 3)Y la miocarditis producida por la infección por parvovirus canino Tabla No.3. (Fenner, F. y colaboradores, 1992; Hoskins, 1997).

SINDROME	ESPECIE ANIMAL	EDAD
Proceso neonatal generalizado	Gato y perro	2-12 días
Enteritis Panleucopenia-enteritis Enteritis	Gato y perro	2-4 meses 4-12 meses
Hipoplasia del cerebelo	Gato	2 semanas antes del nacimiento – 4 semanas
Miocarditis Aguda Crónica	Perro	3-8 semanas 8 semanas

TABLA. No.3. Relación entre la edad del hospedador y la presencia de diversos síndromes tras la infección por el virus de la panleucopenia felina o por el parvovirus canino.

FUENTE Fenner, F. y colaboradores, 1992.

Todavía no se define si el Parvovirus II tiene efectos sobre la reproducción, no hay diferencia importante, en los parámetros de concepción de las hembras, número de cachorros nacidos, promedio de peso, y de cachorros destetados después que se establece el virus en la perrera. Sin embargo

otros investigadores encuentran disminución en la eficacia reproductiva que coincide con la llegada del Parvovirus II (Green, C., 1993).

1.7.1.1. SINDROME NEONATAL

Ocasionalmente las infecciones neonatales son generalizadas, se observan lesiones en diferentes tejidos. Las infecciones *In útero* en gatos, o zorros del Artico por FPV o Parvovirus de zorros azules (BFPV), respectivamente; pueden resultar como muerte fetal y reabsorción, aborto o muerte neonatal (Parrish, C., 1990).

1.7.1.2. ENTERITIS

Los signos clínicos de la infección parvoviral canina pueden ser variables, el paciente puede mostrar letargia y anorexia seguidas por vómito y diarrea (Jones, B., 1995; Neil V. y colaboradores, 1980). El vómito aparece dentro de las 24 a 48 horas de iniciados los signos clínicos, por lo regular es escaso, incoercible, transparente, teñido con bilis o sangre. La emesis voluminosas son inusuales y hacen sospechar la presencia de intususcepción o cuerpo extraño intestinal (Macintire, D., 1997). Las diarreas generalmente aparecen entre las 6 y 24 horas después de los vómitos. En los casos leves la diarrea es blanda o acuosa. En los casos graves la enterorrea es hemorrágica y fétida (Chandler, E., 1986; Hill, B., 1994).

Los pacientes están deprimidos, deshidratados (es progresiva rápidamente), con pulso acelerado y débil, dolor abdominal, ganglios linfáticos superficiales especialmente en la cabeza y cuello y tonsilas aumentadas de tamaño, fiebre alta (hasta 41°C) en el comienzo (periodo de viremia) , luego normotemia (Aboods , S., 1995; Madsen, M., 1994; McCandlish, I., 1981; Strombeck, D., 1995; Valencia, M., 1997), puede desarrollarse hipotermia, ictericia o diátesis hemorrágica (coagulación intravascular diseminada) en forma terminal en aquellos con sepsis bacteriana o endotoxemia (Birchard, S., 1995) .

La muerte se le atribuye a la deshidratación, desequilibrios electrolíticos, shock endotóxico o sepsis bacteriana fulminante relacionada con leucopenia (Birchard, S., 1995).

1.7.1.3. MIOCARDITIS CANINA

La miocarditis canina es común en cachorros de 3 a 8 semanas de edad, aunque se ha detectado en animales de más de 16 semanas. La mortalidad tiene un amplio rango del 20 al 100%, su patogenía ocurre de forma muy rápida provocando falla del corazón caracterizada por arritmia cardiaca, edema pulmonar y disnea (Parrish, C., 1990; Yates, 1998).

También puede ser caracterizada por dolor respiratorio, llantos, depresión y cianosis generalizadas, asociado con insuficiencia cardiaca aguda (Broocks, 1993; Chandler, E. Y colaboradores, 1986; Hill, B.,1992).

Suele presentarse como un proceso agudo de los cachorros caracterizado por muerte repentina, generalmente sin ningún signo clínico. Sin embargo, aunque las lesiones son extensas, el cachorro puede sobrevivir con un miocardio atigrado (necrosis de fibras de tejido conectivo entre las fibras del músculo cardiaco). Aunque no necesariamente produce alteraciones en el electrocardiograma, podría suponerse que tal proceso puede limitar la capacidad del animal en cuanto a su actividad y pronóstico en cuanto a su tiempo de vida (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

El electrocardiograma revela la presencia de contracciones ectópicas multifocales, hay modificaciones histológicas que indican miocarditis; desarrollan signos de insuficiencia cardiaca congestiva (intolerancia al ejercicio, tos y disnea), meses o años después en apariencia de fibrosis miocárdica secundaria (Green, C., 1993).

1.8. DIAGNOSTICO

El diagnóstico diferencial de la CPV, puede ser difícil en razón de la similitud clínica entre los signos presentados por: las enteritis virales (Paramixovirus, Rotavirus, Adenovirus y Coronavirus), enteritis parasitarias (Coccidiosis, Ancilostomiasis), enteritis bacterianas (Colibacilosis, Salmonellosis, Clostridiosis, Leptospirosis), enterocolitis hemorrágica aguda, obstrucción intestinal, enteritis exotóxicas (Organofosforados, Dicumarol), enteritis endotóxicas (Insuficiencia renal crónica), gastroenteritis alimentaria que cursa en forma benigna y apirética (Aboods, S., Sep/Dec, 1995; Cancino y Castro, 1998; Mogollon, J., 1981; Sodikoff, Ch., 1996; Strombeck, D., 1995; Valencia, M., 1997).

Para el diagnóstico presuntivo de la parvovirus canina, son de utilidad los síntomas clínicos, los antecedentes, la radiografía de contraste y los exámenes histopatológicos (Zee, Y., 1990).

Cuando se sospecha de la infección de parvovirus canino, la biometría hemática completa (BHC) es particularmente útil debido a que la mayor parte de los perros con enteritis por parvovirus desarrollan leucopenia intensa (80% de los perros) por linfopenia y granulocitopenia (más severa de 5 a 8 días post-infección), usualmente con 500 a 2000 glóbulos blancos mm^3 algunas veces, con desviación a la izquierda muy marcada de la forma leucocitaria (Birchard, S., 1995; Ettinger, S., 1995; Madse, M., 1994; Mogollón, J., 1981 y Strombeck, D., 1995).

El hematocrito es variable; a menudo es normal, pero puede disminuir hasta un 10% en algunos perros debido a la hemorragia intestinal (en especial notoria después de la rehidratación, en tanto que en otros perros el hematocrito puede estar elevado debido a la deshidratación) (Birchard, S., 1995)

Las anomalías de la química sanguínea son variables e inespecíficas, la hipoalbuminemia, trastornos electrolíticos como hipokalemia, hiponatremia, hipocalcemia, e hipocloremia se presentan en el 25 a 33 % de los casos, hiperazotemia prerrenal incremento de la GTP, FAS, y ALT (en casi el 25% de los perros), bilirrubinemia, y bilirrubinuria (Birchard, S., 1995; y Strombeck, D., 1995).

La distensión del tracto gastrointestinal con gas y líquidos debida al íleo, son datos radiográficos frecuentes en la enteritis por parvovirus. La radiografía con contraste de bario a menudo revelan irregularidades en la mucosa y tiempo de tránsito prolongado (Birchard, S., 1995).

Las técnicas de laboratorio que se utilizan para confirmar el diagnóstico son :
1) aislamiento en cultivos de células sensibles del parvovirus canino de tipo II a partir de las heces de animales infectados; 2) descubrimiento del antígeno del parvovirus en cortes histológicos de la mucosa o en frotis de heces

mediante la técnica de los anticuerpos fluorescentes; 3) demostración del parvovirus en las heces o en tejidos infectados mediante microscopía; 4) identificación del parvovirus en las heces utilizando hematíes de cerdo y la inhibición específica de la hemoaglutinación por antisuero frente al parvovirus canino; 5) descubrimiento del parvovirus en las heces mediante prueba de la inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) utilizando anticuerpos monoclonales frente a la proteína hemoaglutinante del parvovirus canino tipo II; 6) demostración del anticuerpo frente al parvovirus canino en el suero mediante pruebas serológicas tales como la inhibición de la hemoaglutinación, la neutralización vírica, o la prueba de ELISA; 7) identificación del ácido nucleico del parvovirus canino en los tejidos infectados mediante hibridación del DNA (Zee, Y., 1990).

De todos los anteriormente mencionado el método más sencillo para llevar a cabo el diagnóstico del laboratorio de la infección por parvovirus canino, es la hemaglutinación de eritrocitos de cerdo o mono rhesus (pH 6,5; 4°C) con extractos fecales, titulados simultáneamente en presencia de suero de perro inmune y normal. Las muestras de heces de perros con enteritis aguda pueden contener hasta 20.000 unidades hemaglutinantes por mililitro, lo que equivale a cerca de 10^9 viriones por gramo de heces (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

La prueba de ELISA y la Fijación del Complemento son las pruebas más sensibles y más específicas para diagnosticar la infección. En la actualidad existen en el comercio dispositivos a disposición de los veterinarios dedicados a la clínica para detectar el parvovirus en las heces o los anticuerpos en el suero (Zee, Y., 1990).

El cultivo celular también tiene un buen grado de sensibilidad; mucho mejor que la hemoaglutinación; por tanto hay un grado de confiabilidad ya que tiene la capacidad de captar cargas virales pequeñas (Quiroga, G., 2000)

La selectividad de los virus con los cultivos celulares se debe a los receptores específicos de membrana; Basak y colaboradores (1994) realizaron un estudio con dot-blot para identificar en diferentes tipos de células: A72 (línea celular de tumor canino), ST (Testículo de cerdo), MDBK (Célula de riñón bovino Madin-darby), MDCK (Célula de riñón canino), y CRFK (Línea celular de riñón felino) el crecimiento de CPV, encontrando que en MDBK no hay receptor celular para CPV, ya que no se encontró infección del virus.

La PCR, es una nueva herramienta que promete mucha más sensibilidad y especificidad que la misma prueba de ELISA; encuentra una <<aguja>> genética en un pajar. La secuencia de un único gen puede ser localizada entre una abundancia de otras secuencias de DNA, incluso en lisados

crudos, y será amplificada de una forma exponencial hasta rendir una cantidad analizable (Sambrook, 1989; Walker, J.M., 1997). en Colombia éste método diagnóstico no ha sido utilizado en Parvovirus Canina; y la estandarización de dicha técnica es una consecuencia de la investigación del presente trabajo.

1.9. PREVENCIÓN, CONTROL Y TRATAMIENTO

En las colonias de reproducción de gran tamaño de población, en las que es difícil implantar y mantener una higiene adecuada; existen grandes problemas para controlar la enfermedad. Las infecciones subclínicas son frecuentes, particularmente en los cachorros no vacunados mantenidos en buenas condiciones, lo que pone de manifiesto la importancia de la higiene y del buen estado sanitario para limitar la presentación de la enfermedad clínica (Fenner, F. y colaboradores, 1992).

La prevención se centra en la inmunización activa con vacunas de alta o baja atenuación (Honskins, J, 1998; O'brien, 1994).

El éxito de la vacunación profiláctica con virus atenuados o inactivos se ha relacionado durante mucho tiempo con la capacidad de estas vacunas para estimular respuestas específicas de anticuerpos (Almansa, J. Y colaboradores, 1996).

El alto título de las vacunas de CPV proveen de un buen agente inmunizante en inmunidad pasiva en cachorros, existe un 90% de seroconversión después de tres dosis, en respecto, las vacunas con altos títulos de CPV responden mejor en comparación con dos vacunas convencionales con CPV vivo modificado, ya que tienden a fallar por la presencia de anticuerpos maternos (Larson Laurie y colaboradores, 1996; Shultz, R., 1998).

Langeveld Jan y colaboradores (1994); y Tattersall y colaboradores, 1976, opinan que la protección puede ser obtenida también con material inactivo si se administra altas dosis de antígeno. Las vacunas de péptidos sintéticos son más seguras porque no tienen problemas de contaminación microbial y no sufren mutaciones en cultivos *in vitro* o antígenos virales, al igual que su efecto no interfiere con los residuos de anticuerpos maternos. Los vacuna de peptidos sintéticos de este grupo de investigación determina una colección de peptidos sintéticos de sitios antigénicos previamente mapeados en CPV-2, donde directamente inducen a neutralización de anticuerpos en animales experimentales. La observación de inmunogenicidad y la duradera presencia de títulos de anticuerpos producidos por los peptidos lo definen como un atractivo candidato para proteger.

Aunque la utilización de vacunas atenuadas o inactivas es eficaz, existen considerables problemas para establecer programas de vacunación eficaces

debido a los distintos niveles de anticuerpos maternos transferidos (Churchill, 1987; Fenner, F., 1992; Hoskins, J., 1999).

Según Mockett y colaboradores (1995) las vacunas de CPV pueden variar la habilidad para inducir respuesta inmune en la presencia de anticuerpos pasivos de CPV. La significativa diferencia entre la respuesta inmune dentro de las vacunas comerciales exige que se ajusten protocolos de vacunación para cada producto.

También como prevención, es importante el uso de suero inmune o hiperinmune, donde se establece un mecanismo de inmunización pasiva (McCandlish, I., 1981 y CENPALAB, 1997).

Los anticuerpos producidos por medio de inmunización activa, se presentan en forma más retardada y dura mucho más tiempo, mientras que la inmunización pasiva consigue una resistencia temporal y suministra una protección inmediata, pero puesto que son destruidos progresivamente, la protección va desapareciendo y el animal receptor termina siendo sensible de nuevo a la infección (Thompson, H., 1984).

El tratamiento se basa en la reposición de la pérdida de líquidos orgánicos y en la corrección del desequilibrio electrolítico y de la acidosis (Zee, Y., 1990).

Según Veloza, S., y Rodríguez, A. (1998), al analizar la evolución de un grupo de 20 pacientes positivos a CPV-2, pudieron concluir que la administración de Gamma Globulina Hiperinmune contra Parvovirus Canino combinada con una adecuada terapia de líquidos más antibiótico, fue altamente efectivo en los animales tratados, especialmente en aquellos pacientes que manifestaron un cuadro agudo.

2. INTRODUCCION A LA TECNICA PCR:

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una ingeniosa nueva herramienta para la biología molecular que ha sido en efecto una investigación similar a los descubrimientos de enzimas de restricción y el Southern blot (Innis, M., y colaboradores 1990).

La idea de amplificar repetidamente el DNA fue en principio publicada en 1971 pero no fue explotada hasta algunos años más tarde por científicos de la Corporación Cetus después de que Karis Mullis independientemente ideara un método de amplificación con suficiente potencial (Walker J.M. y colaborador, 1997).

PCR es tan sensitivo que una simple molecula de DNA ha sido amplificada, y la copia de este gen es rutinariamente extraído de muestras complejas de secuencias genómicas y visualizados como bandas en geles de agarosa. Los mejoramientos, tal como el uso de DNA polymerasas termoestables y automatización del método, ha alimentado el desarrollo de numerosas y diversas aplicaciones de PCR utilizados en la comunidad. Incuestionablemente, el protocolo no ha sido aplicable para todas las situaciones. Consecuentemente cada nueva aplicación de la técnica de PCR es probable que requiera optimización. Algunos de los problemas que suelen ocurrir son: no detectar el producto o un bajo rendimiento del producto deseado; la presencia en último termino de bandas no específicos debido a la mala impresión o mala extensión de los primers; la formación de "primers-dimeros" que compiten con el producto deseado, y mutaciones o heterogenicidad debido a la mala incorporación (Innis, M., y colaboradores 1990).

Su aplicación es demasiada numerosa, pero en resumen las más aplicadas son: (a) obtener suficiente DNA molde para su secuenciación; (b) manipulación genética y estudios de expresión; (c) estudios de biología evolutiva –animales extintos- y estudios de mapeo –árboles filogenéticos-; y (d) como diagnóstico, ya que su velocidad y sensibilidad le han hecho la técnica ideal para el diagnóstico prenatal de enfermedades hereditarias y de

patógenos que son difíciles de detectar debido a que no crecen satisfactoriamente en cultivos (Walker J.M. y colaborador, 1997).

2.1. PRINCIPIO DE LA TECNICA PCR

La Figura No.6 muestra una representación esquemática de la PCR. Los oligonucleótidos específicos son sintetizados químicamente, de modo que estos cebadores son complementarios a las secuencias de DNA que flanquean la secuencia de interés. Uno de los cebadores es diseñado para alinearse a la hebra con sentido y el otro a la hebra sin sentido, con sus extremos 3' apuntándose el uno al otro. Los cebadores son mezclados con una solución tamponada que contiene DNA molde, los dNTPs, magnesio y una enzima polimerasa termoestable. La mezcla se cubre con una capa de aceite mineral para prevenir la evaporación (o bien se cubre con tubos de reacción con un plato termorregulable) y se colocan en el interior de un bloque de calor programable. El DNA molde de doble hebra es entonces desnaturalizado por calor a una temperatura por encima de su punto de fusión. A continuación se descende la temperatura lo suficientemente para que ocurra la hibridación entre los cebadores y el DNA molde, pero que aún sea lo suficientemente alta para prevenir la hibridación errónea de los cebadores con otras secuencias de gran similitud que se encuentren en otras partes del genoma. El uso de altas concentraciones de cebadores favorecen que esta reacción transcurra con mayor eficiencia que la de re-alineamiento

de las hebras del DNA-molde. A veces, la temperatura es nuevamente incrementada para favorecer la actividad catalítica de la polimerasa, la cual se ha unido al extremo del duplex molde-cebador. La síntesis comienza a partir de los extremos 3' hasta que la reacción es parada mediante un aumento de la temperatura hasta el punto de fusión por segunda vez. El producto de esta reacción es de longitud indefinida y se conoce como <<producto largo>>. Así se completa el primer ciclo de la PCR. El segundo ciclo comienza con el paso de fusión, seguido del alineamiento del cebador. Esta vez sin embargo, los cebadores no solo hibridan con el DNA original sino también con la hebras que han sido sintetizadas en la primera reacción. Estas hebras poseerán la secuencia del cebador que hizo posible la síntesis en el ciclo previo y se extenderán más allá del sitio de unión del otro cebador. El segundo ciclo repite el primero con respecto al DNA original, pero la síntesis sobre las nuevas hebras ocurrirá sólo hasta el final de la molécula, lo cual se corresponde con el extremo 5' del cebador opuesto. Después de un tercer ciclo de PCR, es fácil ver la síntesis dirigida por los productos de los primeros dos ciclos terminarán en los extremos definidos de ambos cebadores y este tipo de producto se acumulará exponencialmente con subsiguientes ciclos. El <<producto largo>> continuará incrementándose en forma lineal. Por consiguiente, el producto mayoritario de una PCR será de una longitud definida, consistiendo en la secuencia entre los cebadores y la propia secuencia de cebadores (Walker, J.M., y Gingold, E.B., 1997).

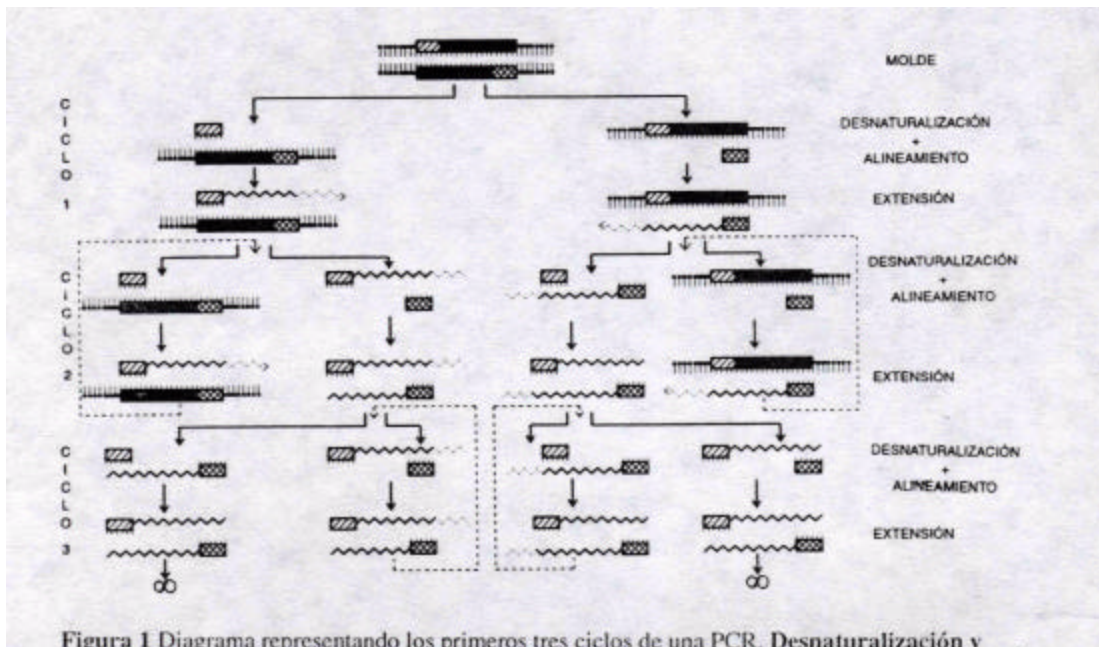


FIGURA No.6. Diagrama representando los primeros tres ciclos de una PCR.
Desnaturalización y alineamiento: Refleja la separación de la doble hélice en dos hebras y el subsiguiente alineamiento de un cebador oligonucleótido a cada hebra. **Extensión:** Refleja la síntesis enzimática de una hebra complementaria comenzando con el extremo 3' del cebador unido. Las flechas de puntos indican la repetición de los procesos que implican <<productos largos>> en ciclos subsiguientes, mientras que los <<productos cortos>> se acumulan exponencialmente.

FUENTE. (Walker, J.M., y Gingold, E.B., 1997).

2.2. CONCENTRACION DE LA ENZIMA

El rango de concentración recomendado para la Taq DNA polymerasa (Perkin Elmer Cetus) es entre 1 y 2,5 unidades (SA = 20 unidades/pmol) por 100 μ L de reacción cuando otros parámetros son óptimos. Sin embargo, los requerimientos de la enzima pueden variar con respecto al temple individual o primers. Cuando optimizamos un PCR, fue recomendado testiar la

concentración de la enzima en un rango desde 0,5 a 5 unidades/100 μL y ensayar los resultados por gel de electroforesis. Si la concentración de la enzima es muy alta, puede acumular productos en fondo no específicos, y si es muy baja, existe un monto insuficiente del producto deseado (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.3. DEOXINUCLEOTIDOS TRIFOSFATOS

La solución stock de dNTP puede ser neutralizada a pH 7.0 y otras concentraciones pueden ser determinadas por espectrofotometría. Los stock primarios son diluidos a 10 μM , alicuotado, guardado a -20°C . Un stock de trabajo contiene 1 μM de cada dNTP. La concentración de Deoxinucleotidos es desde 10 a 200 μM , el óptimo balance de cada resultado mira el rendimiento, especificidad, y fidelidad. Los cuatro dNTPs pueden ser usados en equivalentes concentraciones para minimizar errores en las malas incorporaciones. La especificidad y fidelidad de PCR son incrementadas por el uso bajo de concentraciones de dNTP, aproximadamente 1,5 μM de cada uno. La baja concentración de dNTP minimiza la mala impresión o sitios no blancos y reduce la posible cubierta de nucleotidos extendidos mal incorporados. Uno puede decidir si la baja concentración de dNTP es apropiada por la longitud y composición de la secuencia blanco; 20 μM de cada dNTP en 100 μL de reacción es teóricamente suficiente para sintetizar

2,6 µg de DNA o 10pmol de una secuencia de 400pb. Recientemente, el uso de baja cantidad, uniforma la concentración de dNTP habilitando alta sensibilidad, amplificación de alelos específicos y puntos de mutación ras (Ehlen y Dubeau, 1989).

2.4. CONCENTRACION DE MAGNESIO

Es muy benéfico optimizar la concentración del ión de Magnesio (Mg). La concentración de Mg puede afectar los siguientes aspectos: el anillamiento del primers, disociación de la temperatura extrema de ambos temples y producto de PCR, producto específico, formación de artefactos primers-dímeros, y actividad de la enzima y fidelidad. La Taq DNA polimerasa requiere estar libre de Mg en un pico que esta ligado al temple del DNA, primers y dNTPs. La PCR puede tener concentraciones de Mg desde 0,5 a 2,5 mM sobre el total de la concentración de dNTP (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.5. OTRAS REACCIONES COMPONENTES

Un buffer recomendado para PCR es Tris-HCl de 10 a 50mM (pH: 8,3 a 8,8). El Tris es un buffer iónico dipolar que tiene un pKa de 8,3 a 20°C, y una Δ pKa de $-0,021/^\circ\text{C}$, así, el verdadero pH del Tris 20mM (pH8,3) a 20°C

varía entre 7,8 y 6,8 durante las condiciones térmicas de los ciclos. Sobre 50mM KCl puede ser incluido en la mezcla de la reacción para facilitar el anillamiento del primers. NaCl a 50mM, o KCl cerca de 50mM, inhibe la actividad de la Taq DNA polymerasa. El uso de DMSO no es recomendado para estas aplicaciones (Innis y colaboradores, 1988).

La gelatina o suero de albúmina bovina (100µg/mL) y detergentes no iónicos tal como Tween 20 o Laureth 12, son incluidos para estabilizar la enzima, aunque muchos protocolos trabajaron sin proteínas (Innis, M., y colaboradores 1990)

2.6. ANILLAMIENTO DEL PRIMER

La temperatura y la longitud de tiempo requerido para el anillamiento del primer depende de la base de su composición, longitud, y concentración de la amplificación de los primers. Una temperatura aplicable para anillamiento es de 5°C una T_m verdadera para la amplificación de los primers. Porque la Taq DNA polymerasa es activada en un amplio rango de temperaturas, incluyendo el paso del anillamiento (Innis y colaboradores, 1988).

El rango de la actividad de la enzima varía por dos ordenes de magnitud entre 20 y 85°C. Las temperaturas de anillamiento van de 55 a 72°C generalmente encontrados en los mejores resultados. La concentración de un primer típico (2µM), requiere de pocos segundos para su anillamiento. La Taq DNA polimerasa puede ser agregada después del primer paso de la denaturación durante el anillamiento del primer. PCR puede usar primers amplios y únicamente dos temperaturas; 55 a 72°C para el anillamiento y extensión, y 94 a 97°C para la denaturación y separación de las cadenas (Kin y Smithies, 1988).

2.7. EXTENSION DEL PRIMER

El tiempo depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer son tradicionalmente performados a 72°C porque esta temperatura es muy cercana a la optima para extender los primer M13 basados como modelo de temple. Los índices estimados para la incorporación de de nucleotidos a 72°C fue de 35 a 100 nucleotidos, dependiendo del buffer, pH, concentración de sales, y la naturaleza del temple de DNA (Innis y colaboradores, 1998 y Saiki y Gelfand , 1989).

Un tiempo de extensión de un minuto a 72°C es considerado suficiente para producir una longitud de 2kb. Sin embargo, los tiempos de longitud de

extensión pueden ser útiles en ciclos tempranos si la concentración del sustrato es muy baja, y en ciclos tardíos cuando la concentración del producto excede la concentración de enzima (aproximadamente 1 nM) (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.8. TIEMPO DE DENATURACION Y TEMPERATURA

La causa más probable para que falle el PCR es una denaturación incompleta del temple blanco y/o del producto de PCR. Las condiciones más frecuentes de denaturación son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos, sin embargo, las altas temperaturas pueden ser apropiadas, especialmente para blancos ricos de G + C. La denaturación del DNA toma pocos segundos, la temperatura separa las cadenas. El paso de la denaturación no necesariamente disminuye la actividad de la enzima Taq DNA polimerasa. La vida media de la actividad de ésta enzima es > a 2 horas, 40 minutos, y 5 minutos a 92,5; 95; y 97,5°C respectivamente (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.9. NUMEROS DE CICLOS

El número óptimo de ciclos depende mucho de la concentración de DNA blanco cuando otros parámetros son estandarizados. Un error común es la ejecución de muchos ciclos, porque incrementa la posibilidad de ser menos

específicos en el producto deseado. Por supuesto, que un bajo número de ciclos también puede dar un producto bajo en rendimiento. A continuación se demuestra una guía de números de ciclos versus concentración del blanco:

<i>Número de moléculas Blanco</i>	<i>Número ciclos</i>
3×10^5	25 a 30
$1,5 \times 10^4$	30 a 35
1×10^3	35 a 40
50	40 a 45

FUENTE: (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.10. PRIMERS

La concentración de primers es entre 0,1 y 0,5 μM . La alta concentración de primers puede promover una mala impresión y acumulación de producto no específico y puede incrementar la probabilidad de generar un temple-independiente o un primer-dímero. El producto no específico y el primer-dímero son los mismos sustratos para PCR y tiene que ver con el producto deseado por la enzima, dNTPs, y primers, resultando un bajo rendimiento de producto deseado (Innis, M., y colaboradores 1990).

Los primers típicos tienen de 18 a 28 nucleótidos y en su longitud tienen composición del 50 al 60% de G+C. El cálculo T_m para dar un par al primer puede ser balanceado. Para este propósito, uno puede calcular 2°C para A o T, y 4°C para G o C (Thein y Wallaced, 1986).

Dependiendo de la aplicación, T_m está entre 55°C y 80°C . Uno puede complementar las parejas del extremo 3' del primer como promotor de la formación del primer-dímero y reducir el rendimiento del producto deseado. También la ruta (tres, o más) de C's o G's en el extremo 3' del primer puede promover una mala impresión en secuencias ricas en G + C y pueden ser evitadas, como en las secuencias palindrómicas dentro del primer. Si esto falla, usualmente es apoyado con ensayos de diferentes pares de primers. Los primers pueden fallar también por la presencia de estructura secundarias en el temple de DNA. En este caso, la sustitución de 7-deaza-2'-deoxyGTP por dGTP puede ser muy satisfactoria. Brevemente, los primers pueden contener extensiones 5' o malas uniones por la incorporación de la enzima en los sitios de restricción, en comienzo en codon ATG, o promotor de secuencias entra en la secuencia blanco. Las bases mal unidad pueden ser puestas internamente por mutagénesis. Los primers degenerados pueden ser usados para aislar los genes novel en las bases con similaridad y/o secuencia de aminoácidos. Algunos autores han sugerido usar inosina en primers en lugar de usar primers degenerados. Cuando se usan dichos primers degenerados, esto ayuda a evitar degeneración del extremo 3',

porque las bases mal unidas son ineficientemente extendidas (Innis, M., y colaboradores 1990).

2.11. EFECTO PLATEAU

Parámetro muy importante en la estandarización ya que elimina todo aquello que no es el producto deseado.

Dependiendo de la condiciones de reacción y la termociclada, uno o más de los siguientes pueden influir en el efecto Plateau: (1) Utilización de substratos (dNTPs o primers); (2) estabilidad de los reactivos (dNTPs o enzima); (3) inhibición del producto final (pyrofosfato, DNA duplex); (4) competición de reactivos por no específicos o primers-dímeros; (5) reanillamiento de productos específicos a concentraciones superior a 10^{-8} M (puede disminuir la rata de extensión o actividad de la Taq DNA polymerasa o causar un brazo de migración de productos extremos y desplazar los primers); y (6) denaturación incompleta/ separación de extremos del producto y alta concentración del producto. Una importante consecuencia del aumento de Plateau es que en inicio la baja concentración de productos no específicos resulta desde malas impresiones y puede continuar con eventos amplificación preferiblemente. Optimizando el número de ciclos de PCR es el mejor camino evitar amplificación de productos no deseados (Knoth, 1988 e Innis, M., y colaboradores 1990).

3. PRINCIPIO DE FINGERPRINTS

La “Huella Genómica” es el producto de la digestión del DNA efectuado por enzimas de restricción; se evidencia en gel donde, no se presenta inicialmente bandas discretas, sino que aparece una mancha continua (Walker J.M. y colaborador, 1997).

Las endonucleasas de restricción bacterianas que reconocen y rompen secuencias específicas de nucleótidos son una de las partes integrantes en los procesos de clonaje. También se han utilizado extensamente en el diagnóstico molecular, ya que pueden reconocer mutaciones que ocurren en la secuencia conocida por ellas.

La ventaja de este método es que es muy sencillo de realizar. No requiere radiactividad u otro tipo de marcaje de sonda, y se pueden analizar bastantes muestras en aproximadamente 6 horas. Su limitación es que muchas mutaciones no suceden justamente en los sitios de restricción de las enzimas hoy conocidas (Walker J.M. y colaborador, 1997).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios desarrollados en los Estados Unidos, Italia, Inglaterra , Japón, y Brasil, han demostrado que la Parvovirus canina ha sufrido cambios genómicos en un periodo relativamente corto desde su descubrimiento en 1978 hasta hoy. Se cree que estos cambios le confieren al virus mayor adaptabilidad y resistencia al medio ambiente así como mayor virulencia (Sagazio, P. Y colaboradores, 1998).

En Colombia el virus aparece en 1980 tres años después de su hallazgo en los Estados Unidos de Norte de América y desde entonces esta enfermedad es una de las causantes de morbimortalidad en cachorros y jóvenes de la especie canina del país, pese a que se hace un diagnóstico de esta etiología, aún se desconoce(n) el genotipo(s) de este virus en Colombia. Por tanto, ¿Qué genotipo(s) del parvovirus canino se presenta(n) en las muestras analizadas de la población canina de Bogotá-Colombia?

5. JUSTIFICACION

El proyecto se justifica desde los siguientes aspectos:

1. Científico: El conocimiento generado resultaría de gran importancia para un mejor entendimiento del proceso diarreico canino en nuestro medio, permitiría el desarrollo de métodos de diagnóstico y prevención más ajustados a esa realidad e iniciaría la clarificación del papel de los distintos agentes virales en la enfermedad diarreica en Bogotá-Colombia.
2. Epidemiológico: Los análisis epidemiológicos moleculares no sólo constituyen una herramienta cuantificatoria de la manera como se distribuye una enfermedad infecciosa dentro de una población determinada, sino que, además, ofrece una valiosa información sobre la evolución de esos agentes, que es base para un correcto diagnóstico y un adecuado manejo inmunoproláctico.
3. De modelo: El trabajo brinda la posibilidad de estudiar otros parvovirus como es el Parvovirus B19, llamado también quinta enfermedad y causante en humanos de varias condiciones como el eritema infeccioso (puede ser fácilmente confundido con el sarampión), artritis, hidrops fetalis, aborto espontáneo y en individuos inmunocomprometidos genéticamente o adquirida la infección se hace

persistente causando anemia crónica severa. Sin embargo, se puede hablar que, en Colombia esta etiología no se considera o se desconoce.

6. OBJETIVOS

6.1. General

Realizar el análisis genómico del Parvovirus Canino (CPV) por PCR-fingerprint a partir de aislamientos de DNA viral de casos clínicos tomados a conveniencia en Bogotá-Colombia.

6.2. Específicos

- Estandarizar una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
- Estandarizar la técnica de huella genómica (fingerprints) para genotipificar el CPV.
- Detectar por el análisis de fingerprints posibles variaciones en los aislamientos de parvovirus canina encontrados en las muestras tomadas a conveniencia en Bogotá, D.C.

7. MATERIALES

7.1. Equipos:

- Centrifuga refrigerada KUBOTA KR/702, capacidad 16 tubos.
- Centrifuga refrigerada para eppendorf TOMY MR/150, capacidad 24 eppendorf.
- Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, capacidad 24 muestras.
- Cámara de electroforesis Minicell® EC 370M, fuente de poder Power Sopply CPS 600.
- Baño de Maria Memmert, hasta 100°C.
- Plancha y mezclador magnético, Mag-Mixer, YAMATO MUMH-81.
- Micropipetas de 0,5 – 5 – 10 – 100 y 1000 μ L, marca Pipetman y eppendorf.
- Cámara polaroid CU-5.
- White light transillumination 100V

8. METODOLOGIA

8.1. Hipotesis:

Existe por lo menos en Colombia una variación antigénica del virus que lo hace potencialmente capaz de cambiar su conducta patogénica.

Con el propósito de determinar el genotipo circundante de el CPV en Bogotá, Colombia, se realizó un estudio descriptivo y prospectivo de 56 muestras (Mx), de pacientes menores de un año con diagnóstico clínico o de laboratorio presuntivo para parvovirus entre los años 2000 y 2001 en Bogotá.

El tamaño de la muestra se tomó de 25 centros veterinarios del Distrito Capital (ver anexo No.1). Se visitaron 103 clínicas veterinarias ubicadas en diferentes puntos cardinales de la ciudad, las cuales no todas proporcionaron muestras.

Los criterios de diagnóstico se basaron en la evaluación clínica interdisciplinaria del médico veterinario y en algunos casos los resultados de laboratorio ayudaron a un diagnóstico presuntivo de la enfermedad.

8.2. TOMA DE MUESTRAS

La técnica para toma de muestra sanguínea y materia fecal (Embert, H., y Coles, D, 1989) para aislamiento del genoma del virus se realizó de la siguiente forma:

8.2.1. MUESTRA SANGUINEA

1. Asepsia en la zona de punción.
2. Sitio: Vena cefálica y en casos donde el paciente presenta deshidratación extrema vena yugular.
3. La toma de sangre se hizo con jeringas de 5 ml y se vertió en tubos de vacuntainer con anticoagulante EDTA, para obtener sangre total, en un volumen promedio de 3 ml por paciente.
4. Se mezcla anticoagulante/muestra de forma lenta, y se rotula la muestra.
5. El transporte al laboratorio se hizo por medio de neveras portátiles con una temperatura aproximada de 4°C.

8.2.2. MUESTRA DE MATERIA FECAL

En los centros veterinarios que autorizaron dicha muestra, se realizó:

1. Toma de muestra fecal, directamente del recto, con asa o hisopo (copo de algodón), estériles.
2. La muestra se introdujo en un recipiente de materia fecal nuevo – estéril, sin preservantes químicos.

3. Después de rotulada la muestra se refrigeró o congeló para preservar la misma.

8.3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El aislamiento de ácido nucleico viral se realizó con diferentes métodos de extracción; en sangre se utilizó el método fenol : cloroformo : isoamílico y precipitación etanólica; el método de salting out; y el kit GFX Genomic® . En materia fecal también se utilizó método de extracción por fenol : cloroformo : isoamílico y precipitación etanólica; y se utilizó el kit GFX Genomic®.

La escogencia de que método usar para el aislamiento o extracción de DNA depende de la cantidad y calidad de DNA que se necesita para un propósito en particular. Para análisis de restricción de DNA geonómico, como el caso de este estudio, es importante que el genoma este entero (Freifelder, D., 1979).

8.3.1. TECNICA DE EXTRACCION DE DNA VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE SANGRE

8.3.1.1. FENOL CLOROFORMO ISOAMILICO Y PRECIPITACION

ETANOLICA según Innis y colaboradores (1995)

1. A la muestra de sangre se le agrega H₂O destilada, cuya función es lisar los glóbulos rojos, se centrifuga a 2000 rpm por 5 min. Se desecha el sobrenadante hasta cuando no existan eritrocitos visibles.
2. Se le agregan 2 mL de buffer de lisis de glóbulos blancos (10 mM Tris-HCl, 400mM NaCl y 2 mM Na₂ EDTA, pH 8,2) con 30 µL de proteinasa K (1mg de proteinasa K en 1% SDS y 2mM Na₂ EDTA) cuya función es proteasa a 56°C por 24 horas.
3. Se adiciona 1 mL de fenol cloroformo isoamílico, para extracción de proteínas; se resuspende la mezcla y centrifuga a 2500 rpm por 5 min.
4. Tomo el sobrenadante en un tubo nuevo y agrego 3mL de etanol absoluto a -20°C y centrifugo para precipitar.
5. Tomo el pellet y resuspendo en H₂O grado I (desionizada, bidestilada)

8.3.1.2. SALTING OUT según Miller y colaboradores (1988)

1. A la muestra de sangre se le agrega H₂O destilada, se centrifuga a 2000 rpm por 5 min. Se desecha el sobrenadante hasta cuando no existan eritrocitos visibles.

2. Se le agregan 2 mL de buffer de lisis de glóbulos blancos con 30 μ L de proteinasa K a 56°C por 24 horas.
3. Se adiciona 1 mL de NaCl 5 M, tampón de extracción; se resuspende la mezcla y centrifuga a 2500 rpm por 10 min.
4. Tomo el sobrenadante en un tubo nuevo y agrego 5mL de etanol absoluto, se deja toda la noche a -20°C .
5. Centrifugo a 10000 rpm por 15 min. para precipitar, descarto sobrenadante, y,
6. Resuspendo el pellet con H₂O grado I (desionizada, bidestilada)

8.3.1.3. KIT GFX GENOMICÒ amershamPharmacia:

A la muestra de sangre se le agrega H₂O destilada, se centrifuga a 2000 rpm por 5 min. Se desecha el sobrenadante hasta cuando no existan eritrocitos visibles.

1. El pellet de células blancas se mezclan con 500 μ L de buffer de extracción.
2. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min.
3. Se agrega 500 μ L de solución de lavado y centrifugar por 6 min. A 10000 rpm.
4. Adicionar 100 μ L de H₂O grado I (desionizada, bidestilada) a 70°C, reposo 1 min., y se centrifuga a 10000 rpm por 1 min.

8.3.2. TECNICA DE EXTRACCION DE VIRUS A PARTIR DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL, según Mathys, R. y colaboradores, 1983:

1. Diluir la heces 1:10 v/v en buffer Tris EDTA (0.05 M Tris-HCl, 1mM EDTA, 0.15 M NaCl, pH 7.2), por muestra. Tomar con un palito estéril 0.1 g de muestra, en tubo ependorf de 1.5 mL , y adicionar a la muestra 0.9 mL de Buffer. Llevar al vortex para homogenizar por 1-2 minutos.
2. Centrifugar por 10 minutos a 10.000 rpm y tomar el sobrenadante. Este sobrenadante se transfiere a un tubo de ependorf nuevo ya que es quien teóricamente tiene las partículas virales.

8.3.3. TECNICA DE EXTRACCION DEL DNA VIRAL A PARTIR DE MUESTRAS DE MATERIA FECAL

8.3.3.1. METODO FENOL CLOROFORMO

Igual como se describe éste método en la extracción de DNA en sangre, calculando 3 gramos materia fecal directa.

8.3.3.2. KIT GFX GENOMICÒ amershampharmacia biotech:

1. Del sobrenadante que resulta del método de extracción viral se procede a realizar la extracción del genoma viral; se toma 120 µL de sobrenadante y se realiza el procedimiento normal de mezcla, como en la extracción con sangre.

Para realizar este trabajo, se utilizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y cortes de enzimas de restricción del fragmento genómico viral amplificado (PCR-fingerprints).

8.4. ESTANDARIZACION DE LA TECNICA PCR.

Para llegar a la descripción de la técnica para el presente estudio fue necesario estandarizar con ensayos basados en las concentraciones citadas en el marco teórico.

8.4.1. DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA PCR:

PCR para el amplificado del gen VP1/VP2 que codifica para la proteína de la capsida : Los virus del presente estudio se amplificaron por PCR con el cebador A comprendido entre los nucleótidos 2284 - 2303 (GAT GGC ACC TCC GGC AAA GA) y el cebador B complementario a los nucleótidos comprendidos entre la región 4512 – 4530 (TTT CTA GGT GCT AGT TGA G) de acuerdo a la secuencia publicada por Reed y colaboradores (1988).

El volumen total por muestra tiene concentraciones de: Buffer al 1X, dNTPs al 0,2mM, Primer A a 1 μ M, Primer B a 1 μ M, MgCl₂ a 1,5mM, Taq DNA polimerasa a 0,20 U y agua desionizada y bidestilada.

Para esto se aplicó el siguiente protocolo de amplificación: separación de las cadenas a 94°C por 5 minutos; la denaturación se ejecutó a 94°C por 30 segundos, el anillamiento a 55°C por 2 minutos y la extensión a 72°C por 2 minutos, en un proceso de 35 ciclos; la extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos.

El control positivo fue el DNA de una vacuna comercial con características de virus de Parvovirus Canina vivo modificado.

Posteriormente los productos de la PCR fueron corridos electroforéticamente en gel de agarosa a una concentración del 1% y teñidos con bromuro de etidium para su visualización con transiluminador UV.

La estandarización de la técnica de PCR, según protocolo propuesto por Mochizuki y colaboradores (1993).

8.5. DESCRIPCION DE LA TECNICA FINGERPRINTS :

10µL del amplificado purificado para Parvovirus canina fueron digeridos con la enzima de restricción Rsa I (GTAC) por 1 hora, con el objeto de tener fragmentos de restricción (fingerprints) .

El volumen total por muestra contiene concentraciones de: Buffer 1x, enzima RsaI 1,5 U y agua desionizada bidestilada.

El control positivo fue el amplificado del DNA vacunal , para corroborar el tamaño del fragmento amplificado así como el tamaño de los fragmentos de restricción en pares de bases (pb) se utilizo el marcador de peso molecular 50 base pair ladder de amershan farmacia biotech ref. 27-4005.

Se corrió electroforesis en agarosa al 1% con bromuro de etidium y se visualizó en transiluminador UV.

8.6. PROCESAMIENTO Y ANALISIS ESTADISTICO DEL ESTUDIO

El análisis estadístico se realizó con el programa Epi Info 6,1 con un nivel de confianza del 95% y un margen de error del 5%.

Variables, se tomaron como *Independientes*: edad, raza, fecha de colección, sexo, tipo de muestra colectada, dosis vacunal aplicadas, vermifugaciones, y confirmación del diagnóstico presuntivo. *Dependientes*: localización geográfica.

9. RESULTADOS

Las 56 muestras fueron tomadas de pacientes menores o iguales a un año que visitaron clínicas veterinarias por cuadros gastroentéricos con presuntivo a Parvovirus; las muestras se registraron con números consecutivos según su adquisición del número 1 al 56.

9.1. DATOS ESTADÍSTICOS DE LAS MUESTRAS

9.1.1. RAZA

RAZA	FRECUENCIA	%
SIBERIANO	3	5,3
AKITA	2	3,6
LABRADOR	6	10,7
CRIOLLO	2	3,6
BOXER	4	7,1
F. POODLE	18	32,2
ROTWEILLER	3	5,3
P. ALEMAN	4	7,1
PITBULL	4	7,1
SNAUZER	2	3,6
OTROS*	8	14,4

*Otras razas con un representante de cada uno (Doberman, Setter Irlandes, etc.)

Tabla No.4 Frecuencia de razas

Como muestra la tabla No. 4 predominan los perros de las razas French Poodle (32,2%), y Labrador con (10,7%).

9.1.2. EDAD

El mayor porcentaje de edad en consulta para este cuadro patológico está entre los 2 y 3 meses (60,7%).

9.1.3. ESQUEMA DE VACUNACION

ESQUEMA DE VACUNACION	FRECUENCIA	PORCENTAJE
NINGUNA	9	16,1%
CPV	2	3,6%
CPV + OTRA	6	10,7%
2CPV	1	1,8%
ESQUEMA COMPLETO	4	7,1%
NS	34	60,7%

Tabla No.5 Esquema de vacunación

9.1.4. MUESTRAS CON ETIOLOGÍA CONFIRMADA

TECNICA	SIN CONFIRMAR	ELISA	HISTOPATOLOGIA	IH
FRECUENCIA	52	1	1	2
%	92,8	1,8	1,8	3,6

Tabla No.6 Muestras con etiología confirmada

9.2. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se amplificaron las muestras con los primers A y B, diseñados para la amplificación del gen que codifica por la proteína de la cápside (VP1/VP2) según el protocolo mencionado anteriormente, el producto amplificado se visualizó por corrido electrofóretico al 1% (p/v) con bromuro de etidium observándose un producto amplificado de 2.2.Kb aprox., como muestra la Figura No.7.

De las 56 muestras procesadas, 4 amplificaron por PCR, las muestras amplificadas fueron las Nos.45, 46, 54 y 56 de materia fecal y se tomaron como controles dos cepas de vacunas comerciales con genotipo conocido para CPV-2.

No se obtuvieron amplificadores para CPV de ninguna de las muestras de sangre.

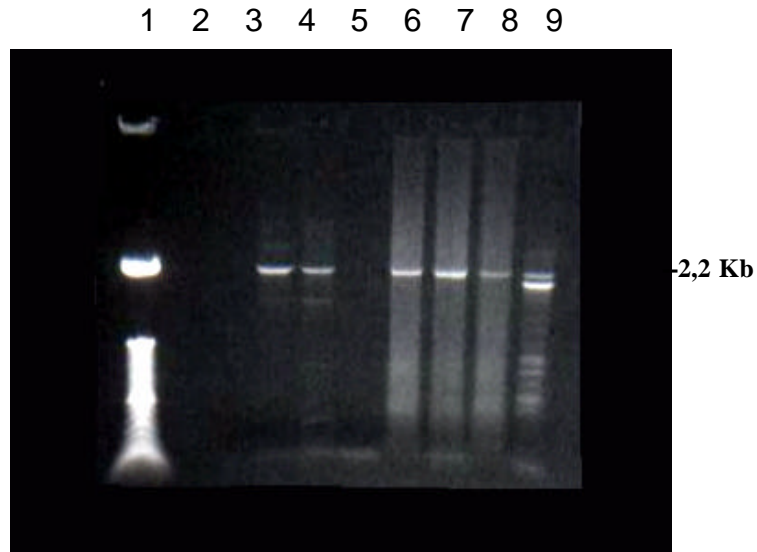


FIGURA No. 7 Electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción de bromuro de etidium de productos de PCR, (aprox. 2.2 Kb). De izquierda a derecha: línea 1: Peso molecular (de arriba para abajo: 2000, 800, 350, 50 pb); línea 2: Muestra No.45 aislamiento del virus sin extracción de DNA viral; línea 3: Muestra No.45-con extracción de DNA viral; línea 4: Muestra No.46-con extracción de DNA viral; línea 5: Muestra No.53-con extracción de DNA viral, negativo a PCR; línea 6, línea 7 y línea 8: extracción DNA viral de tres vacunas comerciales GFX; y línea 9: Muestra No.56 con extracción de DNA viral.

9.2.1. VACUNAS vs PCR

Las cuatro muestras positivas tenían el siguiente plan de vacunación:

VACUNAS PCR	NINGUNA	CPV (1 DOSIS)	CPV (2 DOSIS)	CPV + OTRA	OTRAS - CPV	NO SE SABE
POSITIVO	2	0	1	0	0	1

TABLA No. 7 Comparación de pacientes vacunados Vs. diagnóstico PCR
Donde NINGUNA significa que no se ha aplicado esquema de vacunación; CPV (1 dosis), CPV(2 dosis), CPV más otra vacuna, otra vacuna menos CPV y no se sabe, corresponde a falta de información.

9.2.2.MX CONFIRMADAS Vs. PCR

Todas las muestras sin diagnóstico confirmado por laboratorio dieron NEGATIVAS por la PCR (92,8%); las muestras confirmadas por la prueba de ELISA e Histopatología coinciden con el diagnóstico hecho por la técnica de PCR compartiendo un 1,8%; al igual que las dos muestras confirmadas por HI (3,6%). Tabla 8.

PCR \ PRUEBA	PRUEBA			
	NO CONFIRMADA	ELISA	HISTOPATOLOGIA	HI
POSITIVO	0	1	1	2
NEGATIVO	52	0	0	0

TABLA No. 8 Comparación muestras confirmadas Vs. diagnóstico PCR

9.3. RESULTADOS DE LA HUELLA GENOMICA PARA EL CPV (Rsal)

A la digestión con la endonucleasa Rsal de las muestras positivas a PCR se obtuvieron dos patrones de restricción diferentes, uno fue para el genotipo del virus CPV-2 y el otro obtenido para el genotipo CPV-2b.

De las 4 muestras amplificadas dos mostraron el patrón CPV-2 (muestra No.54 y 56) y las dos restantes presentaron el patrón para el genotipo CPV-2b (Muestras No.45 y 46). Figura 8.

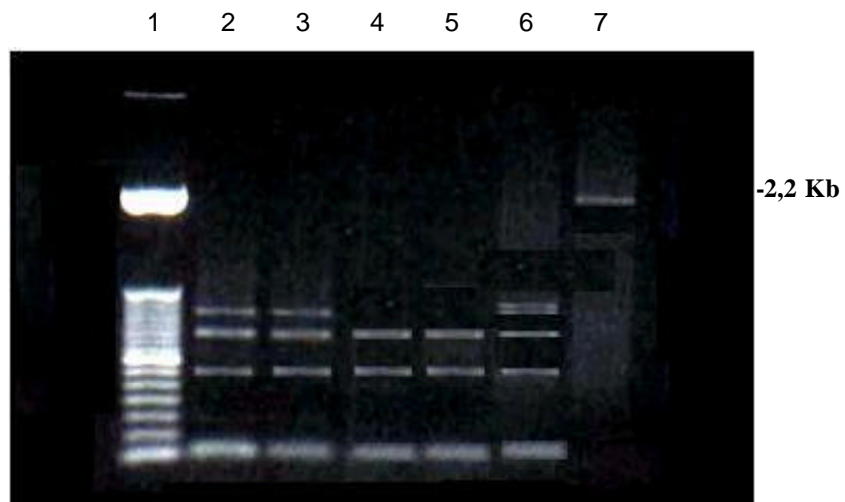


FIGURA No.8 Patrones de reacción de la enzima RsaI en productos de PCR. Línea 1) Marcador de peso molecular (de arriba para abajo: 2000, 800, 350, 50 pb), línea 2) Muestra No.54, línea, patrón CPV-2; 3) Muestra No.56, patrón CPV-2; línea 4) Muestra No.45, patrón CPV-2b; línea 5) Muestra No.46, patrón CPV-2b; línea 6) Vacuna, patrón CPV-2; y línea 7) Amplificado 2,2 Kb con método de extracción Fenol:Cloroformo: Isoamílico que no obtuvo restricción.

Los corridos de las líneas 2 y 3 muestran el patrón para el genotipo CPV-2, y la línea 4, nos muestra un patrón de restricción para el genotipo CPV-2b, los resultados obtenidos son coincidentes con lo reportado por Sagazio y colaboradores (1998).

De las 56 muestras tomadas a conveniencia en la ciudad de Bogotá, en pacientes menores de un año, cuatro dieron positivas para CPV por PCR, no hubo amplificación en muestras de sangre y los genotipos evidenciados son : CPV-2 y CPV2b; las cuatro muestras positivas por PCR se encontraban confirmadas por técnicas de diagnóstico como IH , ELISA e histopatología.

10. DISCUSION

10.1. TOMA DE MUESTRAS

De acuerdo con el criterio del médico veterinario y en algunos casos con el soporte de laboratorio, se lograron recolectar 56 muestras de pacientes menores de un año con signos clínicos compatibles con Parvovirus Canina en la ciudad de Bogotá-Colombia durante los años 2000 y 2001.

Se colectaron tres muestras de pacientes adultos con signos gastroentericos ya que la literatura reporta que aunque no es común el CPV a ésta edad puede presentarse de forma aguda o subaguda (Smith-Carr, S., 1997). El análisis de estas tres muestras no fue estadísticamente tomado en cuenta ni representativo en los resultados del objetivo de éste estudio.

En el año de 1999 se solicitó colaboración a diferentes clínicas veterinarias con el objeto de tomar muestras, recolectando información adicional para completar el formato de registro (ver anexo No. 2).

De algunos pacientes no se logró la toma de una de las dos muestras (heces y/o sangre), por diferentes circunstancias, como la no obtención de materia fecal o sangre por parte del clínico.

El objeto de recolectar sangre fue el de observar si se podía utilizar ésta muestra para la detección del virus en pacientes, puesto que la literatura reporta que el CPV presenta tres períodos de viremia cortos después de la infección (Strombeck, D, 1995 y Studdert M., 1983). Sin embargo, no se logró un aislamiento a partir de ésta muestra, seguramente porque el paciente ya había pasado estas fases de viremia y es muy difícil detectarlas durante el curso de la infección, por lo tanto la muestra de elección sigue siendo la de materia fecal.

Las muestras sanguíneas tenían reporte de cuadro hemático con leucopenia marcada, linfocitosis y granulocitopenia, características generales para virosis (Birchard, S. 1995).

Muy probablemente en los pacientes cuya única muestra era de sangre se pudieron haber perdido casos positivos a CPV.

De las 56 muestras, dos fueron confirmadas por IH, otra fue confirmada por ELISA y la última, por histopatología; las demás muestras no fueron

confirmadas por ninguna de éstas técnicas pero resultaron ser negativas por PCR.

Esto significa que no todos los casos con cuadro de gastroenteritis hemorrágica corresponden a la patología de CPV, prestándose a falsos diagnósticos etiológicos, puesto que muchos otros agentes pueden ocasionar cuadros similares como ocurre en infecciones virales (Coronavirus, Rotavirus, Paramixovirus, Adenovirus tipo 1); infecciones bacterianas (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *E. Coli*, *Clostridium*, *Rickettsias*, etc.); infecciones micóticas (*Histoplasma capsulatum*); Nematodos (*Ancylostoma*, *U. stenocephala*) y Protozoarios (*Giardia*, *Coccidios*); sin mencionar otros procesos idiopáticos, tóxicos, o metabólicos.(Strombeck, D., 1995).

El motivo del reporte confirmatorio de CPV y cuadro hemático de algunas muestras estuvo sujeto a las posibilidades económicas del dueño del paciente.

10.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS VARIABLES

A partir de este estudio preliminar no se puede realizar inferencias de tipo estadístico, puesto que el mismo no es poblacional sino de muestras tomadas a conveniencia.

Las frecuencias por raza más representativas resultó ser la French Poodle y en segundo término Labrador. En cuanto a la edad la mayor frecuencia se observó entre 2 y 3 meses. Como se reporta en la literatura nuestros resultados coinciden pues la protección de anticuerpos conferidos por la madre decrece dentro de éstos períodos (Hoskins, J., 1998) y el cachorro se convierte en huésped ideal para procesos infecciosos de prácticamente cualquier etiología. Luego se nota un descenso en la tasa de pacientes mayores de cuatro meses, edad promedio en que se inicia y completan los esquemas de vacunación. Sin embargo, pese a que algunos tenían cuadros completos o incompletos de vacunación presentaron la enfermedad. Esto conlleva a replantear los esquemas de vacunación.

A pesar de que el número de casos positivos es bajo, con relación al género se corrobora lo descrito por Appel J., y colaborador en 1979 y otros autores que afirman que el CPV puede afectar en igual proporción tanto hembras como machos.

10.3. METODOLOGIA

10.3.1. EXTRACCIÓN DNA

Se utilizaron tres técnicas de extracción, Fenol: cloroformo: isoamílico, Salting out, y kit de extracción de DNA GFX GENOMIC® amershamPharmacia,.

De los tres métodos empleados dos resultaron ser más adecuados para la extracción genómica viral (DNA GFX GENOMIC® amershamPharmacia, y fenol: cloroformo: isoamílico); pese a que el método de fenol: cloroformo: isoamílico es el método standar internacional para aislamiento genómico, es muy exigente en lo referente a la purificación del producto (DNA). Cabe anotar que se obtuvo buenos amplificadores con éste método más no así mapas de restricción con la enzima.

Por tanto se eligió para éste trabajo el método de extracción con el kit DNA GFX GENOMIC® amershamPharmacia, por ser un método rápido que permite optimizar tiempo de trabajo con buenos resultados, puesto que normalmente las muestras genómicas aisladas de materia fecal presentan muchos inhibidores.

Uwatoko, K., y colaboradores (1996) reporta que es importante remover los inactivantes o sustancias inhibitorias para PCR, dicho autor experimentó que el extracto de materia fecal inhibe la amplificación de DNA de CPV por PCR, al contrario, si las muestras son tratadas con un kit comercial se remueven las sustancias inhibitorias y se logra determinar un diagnóstico más certero en menos tiempo. Se realizó un experimento con la muestra No 45 (Fig. No7) y se observaron resultados compatibles con el kit de extracción de DNA GFX GENOMIC[®] amershamPharmacia, la línea 2 de la figura no presenta amplificación 2.2 Kb en comparación con la línea 3, siendo la misma muestra extraída por el método anterior.

10.3.2. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se empleó el protocolo de amplificación por PCR mencionado en metodología, técnica estandarizada con el DNA de vacuna comercial que contenía virus vivo modificado. Se realizaron ajustes a diferentes protocolos publicados (Sagazio, P., 1998, Mochizuki, 1993, entre otros) para poder amplificar la secuencia de 2.2 Kb aprox.

En el presente estudio 4 de las 56 muestras fueron positivas para Parvovirus Canina por PCR. A pesar del bajo volumen de cifra los resultados son similares a los obtenidos en España donde se analizan 141

muestras analizadas por anticuerpos monoclonales solo 13 fueron positivos a CPV (Ybañez, R., y colaboradores, 1995).

Vale anotar que todas las muestras analizadas fueron tomadas de animales sospechosos de infección con CPV; sin embargo solo el 7% de éstos resultaron positivos; ésta cifra aclara que se necesita de diagnósticos confiables y oportunos para evitar los sobrecostos del tratamiento para la infección de CPV (sueros hiperinmunes).

La especificidad y sensibilidad de la técnica empleada (PCR) no es evaluada en el presente estudio, solo se utiliza la técnica para diagnosticar positivos y poder evaluar el genotipo del virus, sin embargo, en un futuro inmediato se hará.

La especificidad y sensibilidad de la prueba ha sido discutido por varios autores como Pereira y colaboradores (2000) donde comparan en Brasil 38 muestras colectadas de perros con signos clínicos compatibles para CPV, muestras confirmadas entre los años de 1980 y 1995 por hemaglutinación, aislamiento de virus en cultivos celulares, microscopia electrónica y la prueba de ELISA. Dando también diagnósticos positivos por la técnica de PCR.

En Taiwan también las muestras positivas a CPV por PCR y hemoaglutinación, fueron sembradas en células A-72 y subsecuentemente confirmadas por microscopia electrónica (Chang, W., y colaboradores, 1996).

Sagazio, P. y colaboradores (1998), compara los resultados de la técnica PCR con la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales, evaluando de esta forma su sensibilidad y especificidad.

Las cuatro muestras positivas de éste estudio están dentro del grupo de las confirmadas, dos de ellas fueron confirmadas por IH, otra fue confirmada por ELISA y la última, confirmada por histopatología, la técnica de PCR utilizada en este estudio demuestra que éstos métodos diagnósticos también pueden ser sensible y específicos.

Mochizuki y colaboradores (1993) determinan muestras positivas en cultivo y PCR que dieron negativas por hemoaglutinación. La conclusión a que llega este autor es que los ensayos realizados hacen que la PCR sea la técnica más rápida, sensible y específica para la detección de CPV en muestras de materia fecal.

Es importante resaltar los precios diferenciales para técnicas de diagnóstico de CPV, se espera que en un futuro la PCR sea un método de diagnóstico

masivo y de ésta forma implementar técnicas mucho más sensibles que las presentes actualmente en el mercado.

El virus de la Parvovirus Canina tiene una secuencia total de 5323 pb. Los primers utilizados en éste estudio (primer A comprendido entre los nucleotidos 2284 - 2303, y primer B complementario a la región 4512 - 4530) de acuerdo con secuencia de Reed y colaboradores (1988) amplifican una longitud de 2248 pb. Dichos primer han sido utilizados en estudios anteriores (Mochizuki y colaboradores (1993), Sagazio, P., y colaboradores (1998) y por Hirasawa, T., y colaboradores (1996)). Estos cebadores amplifican por PCR el gen para la proteína de la cápside (VP1/VP2), secuencias de nucleotidos presentes en el CPV-2, CPV-2a y CPV-2b (Parrish y colaboradores, 1991). Esta afirmación nos permite comprobar que la secuencia se comparte con alta homología entre los tres genotipos reportados, dado que ésta codifica para la proteína de envoltura y que es donde se sucede la variación antigénica de los tres genotipos virales.

Se comprobó que el producto amplificado corresponde a esta misma región genómica del Parvovirus canino por el tamaño en pares de bases (2.2Kb), según se reporta en diferentes trabajos (Sagazio, 1998 y Mochizuki, 1993) y por patrón de restricción con la endonucleasa RsaI de los virus control (Sagazio, 1998).

Para confirmar Mochizuki (1993) e Hirasawa (1996) y sus respectivos colaboradores someten las pruebas positivas por los primers anteriormente mencionados a una segunda amplificación. El primero designa VP1 con un set de primers de 20 nucleotidos, complementario a la región 3484 a 3503 de acuerdo con la secuencia de Reed y colaboradores (1988). Mientras que el segundo determina VP2 utilizando tres tipos diferentes de primer en la segunda ronda, complementarios a la posición 2786 – 2805, 3627 – 3648 y 3955 – 3976.

Por otro lado Senda (1995) determina los diferentes genotipos de CPV con diferentes primers, donde los nucleotidos del CPV tipo 2a o 2b son diferentes del tipo CPV - 2.

Pereira, y colaboradores (2000) hace un estudio más profundo del CPV en Brasil, utilizando primers más sensibles donde se logra identificar la diferencia de secuencias entre los genotipos, utiliza dos pares de primers para determinar CPV tipo 2 y 2b con sentido y antisentido localizados respectivamente a 3025 – 3045 y 3685 – 3706 del genoma del CPV, con un producto de 681 pb. y otros localizados entre la región 4043 – 4062 y 4449 – 4470 con un producto de 427 pb.

En comparación con los demás autores que utilizaron diferentes pares de primers, nested PCR, anticuerpos monoclonales, y otras técnicas para lograr

genotipificar el virus. Este estudio determina suficiente amplificar muestras por PCR y hacer RLFP con endonucleasa RsaI, debido a que se logra diferenciar un genotipo del otro, sin necesidad de llegar a metodologías más complejas y de mayor costo. Según Sagazio y colaboradores (1998), incluso los productos amplificados del CPV 2 vacunal pueden ser diferenciados del CPV 2a y CPV 2b con RsaI. Otros estudios como los realizados por Hirasawa (1996) y Greenwood, (1995) y colaboradores reportan restricciones de CPV con diferentes enzimas también con restricciones de fragmentos específicos para determinar genotipos como la endonucleasa Hind II y HphI.

10.3.3. RESTRICCIÓN CON ENDONUCLEASA RsaI

La endonucleasa RsaI corta entre los pares de bases GT↓AC; lo que es suficiente para identificar los tres genotipos de CPV (Sagazio y colaboradores, 1998).

Por otro lado fueron sometidos a restricción con la endonucleasa RsaI algunos amplificados de muestras extraídas con el método de Fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) (datos no mostrados), y se encontró que no hubo restricción, probablemente debido a contaminación con fenol que posiblemente inhibió la enzima, lo que permite concluir que es necesario

hacer una buena purificación de los productos de extracción con éste método.

CONCLUSIONES

- ❖ Por ahora, la toma de muestra de elección para diagnosticar CPV por PCR es la de materia fecal, ya que no se logró un aislamiento a partir de muestra sanguínea. Sin embargo, se puede pensar en estandarizar marcadores de viremia para poder determinar virus en sangre y evitar el maltrato en la manipulación del paciente.
- ❖ Por el número de muestras amplificadas por PCR para CPV, se determina que no todos los casos con cuadro de gastroenteritis hemorrágica que se presentan en la ciudad de Bogotá-Colombia corresponden a dicha patología, lo que significa que se presentan muchas otras etiologías por infecciones virales (Coronavirus, Rotavirus, Paramixovirus, Adenovirus tipo 1); infecciones bacterianas; infecciones micóticas; Nematodos y Protozoarios; sin mencionar otros procesos idiopáticos, tóxicos, o metabólicos.

- ❖ Las muestras positivas en el presente estudio fueron respaldadas por la confirmación de otras pruebas, sin embargo, no se puede concluir la sensibilidad por la metodología empleada.
- ❖ El CPV es diagnosticado por PCR, realizando un perfeccionamiento metodológico, ya que los estudios clínicos o anatomopatológicos no identifican el virus causal y por lo tanto no son definitivos.
- ❖ Este estudio determina suficiente amplificar muestras por PCR y hacer RLFP con endonucleasa RsaI, debido a que se logran diferenciar los tres genotipos CPV-2, CPV-2a y CPV-2b, sin necesidad de llegar a metodologías más complejas y de mayor costo.
- ❖ En el estudio de las muestras tomadas a conveniencia en Bogotá, D.C., se encuentran dos genotipos CPV-2 y CPV-2b, información que no podemos ampliar dado que es un trabajo preliminar que requiere de posteriores estudios para determinar su prevalencia.
- ❖ Debido al gran número de agentes capaces de inducir diarrea y al manejo terapéutico específico que cada uno puede requerir, se hace necesario contar con metodologías, rápidas, seguras, confiables y económicas para el diagnóstico diferencial.

RECOMENDACIONES

- ❖ Tomar muestras de materia fecal y sangre del mismo paciente en diferentes etapas de la enfermedad del CPV para determinar virus en sangre en las diferentes etapas de viremia.
- ❖ Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica PCR para diagnosticar CPV, y estudiar la factibilidad de su aplicación en clínica frente a otras técnicas diagnósticas, como IH, o Sero neutralización.
- ❖ Se requiere de confirmación etiología de patologías gastroentericas para lo cual es indispensable disponer de kits económicos en el mercado, esto ayudaría a realizar estudios confiables de epidemiología que orienten en el tratamiento.
- ❖ Realizar en Colombia un estudio epidemiológico para determinar cuál es la prevalencia de los diferentes genotipos de CPV en el país.
- ❖ Conservar las muestras positivas a CPV en Colombia como lo hacen en otros países para lograr un banco o cepario y de esta forma en un futuro evaluar la evolución del virus.

BIBLIOGRAFIA

Abbod S., y colaboradores. *Part I y II. Columbia, Missouri* . 1995; 20 (5y 6):11-16 y 10-14, respectivamente.

Agbandaje Mavis, Kajigaya Sachico, Mckenna Robert, Young S. Neal, Rossmann Michael. *The structure of human Parvovirus B-19 at 8 Å Resolution*. *Virology*; 1994; 203:106-115.

Ahmed Rah, Biron Cristine. *Fundamental Immunology*. Fourth edition. Chapter 39: Immunity to viruses. Edited by William F. Paul. Philadelphia. 1999.

Almansa Jorge, Acosta Orlando, Barrera Jose Del Carmen. *Infeccion viral y respuesta inmune específica*. *Veterinaria al Día*, 1996; 2 (1):33-40.

Appel J.J.G., Scott, F.W. And Carmichael, L.E. *Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis*. *Vet, Rec.*, 1979; 105:156-159.

Barrowman, J.A.. *The trophic action of gastrointestinal hormones*. *Digestion*, 1975; 12: 92-104.

Basak Sukla Y Turner Henrietta. *Infectious Entry Pathway for Canine Parvovirus*. *Virology*, 1992; 186:368-376.

Basak Sukla, Turner Henrietta And Parr Steven. *Identification of a 40 to 42 Kda attachment polypeptide for canine Parvovirus in A72 Cells*. *Virology*, 1994; 205:7-16.

Binn,L.N., Lazar,E.C., Eddy,G.A., And Kajima,A. *Recovery and characterization of a minute - virus of canines*. *Infection and Immunity*, 1970;1:503

Birchard, Stephen J.. *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. Ed. Mc Graw-Hill-Interamericana. México.1:129. 1994.

Bonnard, G.D., E.K. Manders, And D.A. Campbell, Jr., R.B. Herbermann, And M.J. Collins, Jr. *J. Exp. Med.*, 1976; 143:187-205

Bosch Albert, Abad Xavier, Pinto Rosa. *Virus entéricos en superficies Inertes*. *Mundo Científico*, 1999; 203: 57-63.

Brooks, aren D. *Veterinary Techniciang. Canine Parvovirus*. 1993; 14.(2): 93-96.

Cancino, X., Y Castro, S. *Caracterización del síndrome diarreico en caninos y diagnóstico diferencial de Campylobacter y Parvovirus Canino tipo 2.* Santafé de Bogotá. Trabajo de grado (Bacterióloga). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Carrera de Bacteriología. 1998.

Carmichael, L.E., Joubert, J.C., And Pollock, R.V. H. *Hemagglutination by canine parvovirus : serologic studies and diagnostic applications.* Am. J. Vet. Res., 1980; 41: 784-791.

Carmichael, Leland E. *Pathogenicity of minute virus of canines (MVC) for the canine fetus.* Cornell Veterinary, 1991;.81.(2): 151-161.

CENPALAB La Habana Cuba, Laboratorios Vetipharma. *ALYB Gamma Hiperimmune a Parvovirus Canino.* Boletín,1997.

Chandler E.A.; Satton J.B. Y Thompson D.J. *Medicina y Terapéutica Canina.* Editorial Acribia S.A.. Zaragoza, España.:344, 359 – 364, 377. 1986

Creamer, B. *Intestinal structure in relation to absorption.* In *Biomembranes*, Vol.4, Intestinal Absorption:1 -42., edited by D.H. Smyth, Plenum Press, New York. 1974

Currier, T.C., And E.W. Nester. *Anal. Biochem.*, 1976; 76:431-441

Chang, W.C., Chang, A.Ch., Pan, M.J. *Antigenic types of canine parvovirus prevailing in Taiwan. The Veterinary Record*, 1996; 138 (18): 447.

Chapman, Michael, Rossman Michael. *Structure, Sequence and Function Correlations among Parvoviruses. Virology*. 1993; 194:491-508.

Churchill, A.G. *Preliminary development of a live attenuated Canine Parvovirus vaccine from an isolated of British origin. The Veterinary Record*, 1987; 120: 334-339

De Ybañez, R.R., Vela, C., Cortes, E., Simarro, I. Casal, J.I... *Identification of types of Canine Parvovirus circulating in Spain. The Veterinary Record*, 1995; 136 (7): 174-175.

Eastwood, G.L. *Gastrointestinal epithelial renewal. Gastroenterology*. 1997; 72: 962-975.

Ehlen, T., L. Dubeaud. *Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation specific, isosine- containing oligonucleotide primers. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989; 160:441-447.

Embert, H., Y Coles, D.. *Diagnóstico y Patología en veterinaria*. Cuarta edición. Interamericana Mc Graw Hill. P.4-9. 1989.

Ettinger, Stephen J. *Textboock of Veterinary internal medicine diseases of the dog and cat*. Los Angeles, California: W.B. Saunders Company. Fourth Edition: .403, 405 – 407, 433 – 434, 624, 1012 – 1013, 1020 1203, 1909 – 1910. 1995.

Fenner F., Bachman Peter, Gibss Paul. *Veterinary Virology*. Capter 22: Parvoviridae.: 421-434. Acribia S.A.. Zaragoza, España. 1992.

Fields, B.N., And Knipe, D.M. ED.2ª. Chap 62:1743-1784. 1990.

Freifelder David.. *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. Editorial Reverse S.A. España.:234-236. 1979.

Gabella, G.. *Structure of muscles and nerves in the gastrointestinal tract*. In : *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York. 335-381. 1987.

Glickman, Laurence T. Y Domanski, Linda, M. . *Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis*. Javma. Sep. 1985; 187 (6) :589-594.

Green, Craig E.. *Enfermedades infecciosas de los Pequeños Animales*. México: Editorial Rios S.A. 280-286. 1993.

Greenwood, N.,M., Chalmers, W.,S.,K., Baxendale, W., And Thompson, H. *Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis and vaccine efficacy against field strains*. Vet. Record, 1995: 136:63-67 .

Hill, Brillig. *Interactions between viruses an companion animals*. Veterinary Medicine, oct 1994; 87 (12): 1195-1206.

Hirasawa T., Yono, K., Mikasuki.. *Detection and genomic analysis of Canine Parvovirus by the polymerase chain reaction*. Journal Veterinary Medicine, 1996; 43: 545-554.

Hoskins Johnny. *Update on Canine Parvoviral enteritis*. Veterinary Medicine, 1997 August: 694-709.

Hoskins Johnny, Greene Craig E. *Infections diseases of the dog and cat*. Second edition. Chapter 8: Canine Viral Enteritis. Saunders Company. United States of America. 1998.

Hoskins Johnny.. *Comportamiento de las vacunas Novibac en cachorros Rottweiler*. Intervet de Colombia LTDA, Advance (3) Feb:1-5. 1999.

Houston Doreen M.. *Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991)*. Javma, Feb. 1996; 208. (4): 546.

Hughes, C.A., Bates, T., Y Dowling, R.H.. *Cholecystokinin and secretin prevent the intestinal mucosal hypoplasia of total parenteral nutrition in the dog*. Gastroenterology, 1978; 75: 34-41.

Innis, M. A., K. B. Myambo, D. H. Gelfand, Y D. Brock.. *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction amplified DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990; 85:9436-9440.

Johnson, L.R.. *Regulation of gastrointestinal growth*. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York, p. 331-333. 1987.

Jones, Brent D. *Initial assessment of patients with acute vomiting and/or diarrhea*. Veterinary Technician , 1995; 16. (4): 243-245.

Jones, Brent D. *Gastroenterología Canina y Felina*. Buenos Aires, Argentina : Editorial Intermédica:. 173. 1989

Juntsao, Chapman Michael, Agbandje Mavis, Keller Walter, Smith Kathy, Ming Luo, Wu Hao, Smith Thomas, Rossmann Michael, Richrdw. *The three Dimensional structure of Canine Parvovirus and its funtional implications.* Science 1991; 251: 1456-1463

Kim, H. S.. O. Smithies. *Recombinant fragments assay for gene targeting based on the polymerase chain reaction.* Nucleic Acids Res, 1988;. 16: 8887-8903

Knoth, F. , S. Roberds, C. Poteet, M. Tamkun. *Highly degenerate, inosine containing primers specifically amplify rare cDNA using the polymerase chain reaction .* Nucleic Acids Res, 1988;. 16:10932

Koptopoulos, G., Papadopoulos, O., Papanatasopoulou, M., Corwell. *Presence of antibody crossreacting with Canine Parvovirus in the sera of dogs from Grece.* The Veterinary Record, 1986; 118 (12): 332-333.

Langeveld Jan P.M., Casal J. Ignacio, Albert D.M.E., Osterhaus. *First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal studies of Canine parvovirus in Dog.* Journal of Virology; 1994; 68 (7): 4506-4513.

Langeveld Jan P.M., Casal J. Ignacio, Cortes Elena, Van De Wetering Gerard, Bosavizen Ronals, Wim, M.M., Sehaaper, Dalsgaard Kristian, Meloen Rob. *Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of Canine Parvovirus as a synthetic peptide.* Vaccine, 1994; 12 (15): 1473-1480.

Larson Laurie, Shultz Ronald. *High-liter Canine Parvovirus vaccine: serologic response and challenge of immunity study.* Veterinary Medicine, 1996; March: 210-218.

Levy Jay A.; Heinz Fraenkel Conrat; Owens Robert A. *Virology.* Third edition. Chapter. 7: Viruses with small DNA genomes:153-159. Prentice Hall, Englenwood Cliffs, New Yersey. 1994.

Macartney, L. Mc Candlish, I.A.P., Thompson, H., Cornwell H.J.C.. *Canine Parvovirus enteritis 1: Clinical, haematological and pathological features of experimental infection.* The Veterinary Record, 1984; 115 (9): 201-210.

Macdonald, T.T. Y Ferguson, A. *Small intestinal epithelial cell kinetics and protozoal infection in mice.* Gastroenterology, 1978; 74: 496-500.

Macintire, Douglass K. *Canine Parvovirus. Part II. Clinical Signs, diagnosis, and treatment.* Continuing Education. Mar. 1997; 19 (3):292-299.

Macintire, Douglass K. *Part I. Pathogenesis and Vaccination.* Feb. 1997;
19 (2): 125-133.

Madara, J.L. Y Trier , J.S. *Functional morphology of the mucosa of the small intestine.* *In: Physiology of the Gastrointestinal Tract.* Edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York: 1209-1249. 1987.

Madsen Marsha, Rut. *Canine Viral Enteritis a tale of two pathogens.*
Veterinary Technician, 1994; 15 (7): 375-383.

Margini, Ricardo Aníbal. *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos.*
Buenos Aires. Editorial Médica Paramericana. Segunda Edición : 432. 1977.

Mathys, R., Mueller, N. C., Pedersen, G. H., Theilen.. *Hemagglutination with formalin-fixed erythrocytes for detection of canine parvovirus.* *Am. J. Vet. Res.*, 1983. Enero; 44 (1): 150-151

Mccandlish, Irene A:P: Y Thompson, Hal. *Canine parvovirus infection . In Practice.* 1981; .3 (3):.5-14.

Mccandlish, IRENE A:P: Y THOMPSON, HAL.. *Canine Parvovirus infection,*
The Veterinary Records. August 30 1980: 204-205.

Mc Master, G.K., Beard, P., Engers, H.D., And Hirt, B.. *Characterization of an immuno suppressive parvovirus related to the minute virus of mice*. J. Virology, 1981; 38(1):317-326

Mc Master, G.K., Tartschin Jhon Duri, Siegl Gunter. *Comparison of canine Parvovirus with Mink enteritis virus by restriction site mapping*. Journal of Virology, 1981; 38 (1): 368-371

Melville, J., Macagno, E., Y Christensen, J.. *Longitudinal contractions in the duodenum: Their fluid-mechanical function*. Am. J. Physiol, 1975; 228: 1887-1892.

Mochizuki, M. San Gabriel, M.C., Nakatani, H., Yushida, M. *Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of Canine Parvovirus en faecal specimens*. Japenese Journal of Veterinary Science, 1993; 55: 60-63.

Mockett Adrian, Stahl Madeleine. *Comparing how puppies with passive immunity respond to three Canine Parvovirus vaccines*. Veterinary Medicine, 1995; May: 430-438.

Mogollon, J., Cortes Esperanza, Benavides Oscar, Forero, G. *Parvovirus Canina en Colombia I. Aspectos Clínicos y Morfológicos*. Acovez, 1981; 5 (18): 25-31.

Mogollon, G., Cortes Esperanza, Benavides Oscar, Forero, G.. *Parvovirus Canina en Colombia II. Aislamiento y serología*. Revista ICA , 1984;19 (2): 201-7.

Neil V. Y Anderson.. *Veterinary Gastroenterology*. Philadelphia: Editorial Lea & Febiger, p.12-13, 37-39. 1980.

Nelson, Richard W.. *Pilares de la medicina interna en pequeños animales*. Buenos Aires, Argentina: Intermédica., p. 321-322. 1995.

O'brien Susan E.. *Serologic response of pups to the low-passage modified-lived canine parvovirus-2 component in a combination vaccine*. JAVMA, 1994; 204 (8).

Ooms, L., Y Degryse. A.. *Pathogenesis and pharmacology of diarrhea*. Vet. Res. Commun. 1986; 10:355-397.

Paradiso Peter R. *Infectious Process of the Parvovirus H-1: Correlation of protein content, Particle density, and viral infectivity.* Journal of Virology, 1981; 39 No.3: 800-807.

Parrish, C.R., And Carmichael, L.E.. *Antigenic structure and variation of Canine Parvovirus type-2, Feline Paleukopenya Virus, and Mink.* Virology, 1983; 129:401-414.

Parrish, C.R., Gorham, J.R., Schwartz, T.M., And Carmichael, L.E.. *Characterization of antigenic variation among mink enteritis virus isolates.* Am. J. Vet. Res., 1984; 45:2591-2598

Parrish, C.R., O'connell, P.H., Evermann, J.F., And Carmichael, L.E.. *Natural variation of canine parvovirus.* Science, 1985; 230:1046-1048.

Parrish, C.R., Aquadro, Ch.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J-Y., And Mohammed, H.O.. *Rapid Antigenic - Type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus.* J. Virology, 1991; 65(12):6544-6552

Parrish Colin. *Emergence, Natural history and variation of canine, mink, and feline parvoviruses.* Advances in virus research, 1990 ; 38 : 403-451.

Pereira Cesar, Monezi Telma Durigon, Edison, L., y colaboradores. *Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay*. *Veterinary microbiology*, 2000; 75:127-133.

Quiroga Moscoso, Gloria Judith. *Correlación de la presencia de Parvovirus canino tipo II en muestras fecales de caninos con gastroenteritis e infectividad de estos en cultivos celulares*. Bogotá, D.C.. Trabajo de Grado (Bacteriología). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias, Carrera de Bacteriología. 2000.

Reed, A.P., Jones, E.V., And Miller, T.J.. *Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus*. *J. Virology*, 1988; 62(1):266-276.

Revie, D., B.Y. Tseng, R.H. Graftstrom, And M. Goulian., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1979; 76:5539-5543

Russell, S.J., Brandenburger A., Flemming C.L., Collins, M.K.L., Rommelaerg.. *Transformation Dependent Expression of Interleukin Genes Delivered by a Recombinant Parvovirus*. *Journal of Virology*, 1992; 66 (5): 2821-2828.

Sagazio Paola, Tempesta Maria, Buonavoglia Domenico, Cirone Francesco, Buonavoglia Canio. *Antigenic characterization of canine parvovirus strains isolated in Italy*. Journal of Virological Methods, 1998; 73: 197-200.

Saiki, R. K. , D. H. Gelfand. *Introduction AmpliTaq DNA polymerase*. Amplifications, 1989; 1: 4-6.

Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis, T.. *Molecular Cloning. Second Edition. Chapter 14: In vitro amplification of DNA by the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harbur Laboratory Press. United States of America. 1989.

Senda Megumi, Parrish Colin, Harasawa Ryo, Gamoh Kolchiro, Muramatsu Masatake, Hirayama Norio. *Detection by PCR of wild-type Canine Parvovirus wich contaminantes Dog vaccines*. Journal of Clinical Microbiology, 1995; 33 (1): 110-113.

Smith-Carr Saralin, Douglass K., Macintire, Swango Larry J.. *Canine Parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination*. The Compendium, 1997; 19 (2): 125-133.

Sodikoff, Charles H.. *Pruebas Diagnósticas y de laboratorio en las enfermedades de pequeños animales*. Madrid, España. Mosby-Doyma Libros S.A. Segunda Edición, p.374-375. 1996.

Solcia, E., Capella, C., Buffa, R., Uselline, L., Fiocca, R. Y Sessa, F..
Endocrine cells of the digestive system. In: Physiology of the Gastrointestinal Tract. Edited by L.R. Johnson. Raven Press, New York, p. 111-130. 1987.

Solon L. Rhode III. *Replication process of the Parvovirus H-1. IX. Physical mapping studies of the H-1 Genome.* Journal of Virology, 1977; 22 (2) :446-458.

Solon L. Rhode III.. *Nucleotide sequence of the coat protein Gene of Canine Parvovirus.* Journal of Virology, 1985; 54, No.2 : 630-633.

Shultz Ronald.. *Estrategias de vacunación para la enteritis viral canina. Simposio de Gastroenteritis infecciosa.* Intervet Colombia LTDA:, advance (1) Oct: 1-7. 1998.

Strasheim, M. Lisa, Gruenberg, Allen, Veijalainen Pirjo, Sgro Jean-Yves, Parrish Colin R.. *Two Dominant Neutralizing Antigenic Determinants of Canine Parvovirus are Found on the Three fold spike of the virus capsid..* Virology, 1994;198:175-184.

Strombeck, Donald R.. *Enfermedades digestivas de los animales pequeños*. Segunda Edición. Buenos Aires, República de Argentina: Editorial Inter-Médica. 348-350. 1995.

Studdert M.J.. *Aspect of the diagnosis, pathogenesis and epidemiology of canine parvovirus.* , Australian Veterinary Journal. 1983; Vol.60. NO.7., p.197-200.

Tattersall Peter, Cawte Patricia, Shatkin Aaron, Ward David. *Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a Parvovirus.* Journal of Virology, 1976; 20 (1): 273-289.

Thein, S.L., R.B. Wallace.. *The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridation probes in the diagnosis of genetics disorders.* In human genetic diseases: a practical approach, p.33-50. IRL Press, Herndon, Virginia. 1986.

Thomas, Blaha.. *Epidemiología especial Veterinaria.* Zaragoza, España. Editorial Acribia S.A. p.500-502.. 1995.

Thompson, Hal.. *British Small Animal Veterinary Association, The Veterinary Record.*1984:367.

Truyen, U., Agbandje, M., Parrish, C.R.,. *Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus*. *Virology*, 1994; 200: 494 - 503.

Truyen, U., And Parrish, C.R.. *Canine and Feline Host Ranges of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus : Distinct Host Cell Tropisms of each virus in vitro and in vivo*. *J. Virology*, 1992; 66(9):5399-5408

Truyen, U., Parrish, C.R., Harder, T.C. Kaaden, O.-R.,. *There is nothing permanent except change. The emergence of new viral diseases (review)*. *Vet. Microbiol*, 1995; 43: 103 - 102.

Truyen, U., Evermann James F., Vieler Elke, Parrish, C.R.. *Evolution of Canine Parvovirus involved loss and gain of Feline host range*. *Virology*, 1996; 215:186-189.

Tsao, J., Chapman, M.S., Agbandjes, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Lou, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., And Parrish, C.R.. *The Three - dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications*. *Science*, 1991; 251:1456-1464

Uwatoko, K., Sunairi, M., Yamamoto, A., Nakajima, M., Yamaura, K.. *Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase*

chain reaction from animal fecal samples. Veterinary microbiology, 1996; 52: 73-79.

Valencia, Maria De Los Angeles. *Parvovirus Canina. La Habana Cuba., p.1-6. 1997.*

Vasudevacharya Jayarama, Compans Richard W. *The NS and Capsid Genes Determine the Host Range of Porcine Parvovirus. Virology, 1992;187:515-524.*

Veloza Sandra, Rodriguez Alexandra, *Evaluación del tratamiento con ALYB Gamma Hiperimmune utilizado en cachorros con PVC. Bogotá. Trabajo de grado (Médica Veterinaria) Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA), 1998.*

Walker, J.M., Y Gingold, E.B.. *Biología Molecular y biotecnología. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza-España. p.44-46, 53-63 y 229-230. 1997.*

Yates, R.W., Weller, R.E.. *Have you seen the cardiopulmonary form of parvovirus infection?. Veterinary Medicine, 1998; April: 380-386*

Zee, Y.C.. *Tratado de Microbiología Veterinaria*. Capítulo 58: Parvoviridae. p 489-497. Editorial Acribia. Zaragoza España. 1990.

ANEXO No 1

RAZON SOCIAL

DIRECCION

ABANIMAL	Cra. 61 # 21 – 30 Sur
AC VET	Av. Caracas # 43 – 12
ADA	Clle. 63 # 26 - 40
AFTER PINCHE STA HELENITA	Cra 80 # 70 – 62
ANIMALANDIA	Aut. Nte. # 104 – 97
ANIMAL SHOP	Clle. 140 # 23 – 72
ANIMALITOS 101	Clle. 134 # 30 – 84
ANIMAL'S HOME	Clle. 53 # 73 – 55
ASIMEV	Clle. 22 A# 73 – 29 Sur.
BONANZA CLIN. VET.	Av. 81 # 68 – 53
CANAPOLIS CLIN. VET.	Cra. 83 # 70 – 76
CANES DE LA OCTAVA	Cra. 30 # 8 – 04 Sur
CANINOS Y FELINOS	Dg. 129 # 53 – 47
CENTRAL CANINA VET.	Clle. 95 # 29 – 34
CENTRO VET. MANDALAY	Tv. 75 # 5 – 04
CENTRO VET. MOTAS	Clle. 2 # 29 – 66
CENTRO VET. DEL SUR	Cra. 27 # 14 – 01 Sur
CENTRO VET. DINGO	Clle. 130 A # 7 – 29
CENTRO MED. VET. ZOOGAR	Clle. 76 # 22 – 81
CENTRO VET. CONTRY	Cra. 77A# 62 ^a - 53
CENTRO VET. ALAMOS	Clle. 68 # 46 – 15
CLINISUR	Av. Caracas con 22 Sur
CLINIVEPA	Clle. 60A # 74 ^H - 29
CLIN. VET. ALCATRAZ	Clle. 76 B# 102 – 69
CLIN. VET. BABIECA	Clle. 68 # 83 – 09
CLIN. VET. CANI-VET	Clle. 68 # 46 – 15
CLIN. VET. RINCON CANINO	Cra. 92 # 144 – 31
CLIN. VET. PAKUS	Tv. 75 # 4 ^A – 89
CLIN. VET. STA. ISABEL	Clle. 2 # 27 ^A – 66
CLIN. VET. MOTOSOS	Cra. 27 # 1 – 28
CLIN. VET. DOGO	Cra. 30 # 6 – 14 Sur
CLIN. VET. STA. MATILDE	Clle. 8 # 34 ^D – 28 Sur
CLIN. VET. PROTECT DEL SUR	Av. Caracas # 12–31Sur
CLIN. VET. POPULAR	Cra. 10 # 28 – 32 Sur
CLIN. VET. PEGASUS	Dg. 49 # 25 – 05 Sur
CLIN. VET. PROTECT. DE ANIMALES	Cra. 19 # 30 – 07
CLIN. VET. UNIVET	Dg. 127A # 7 – 61

CLIN. VET. CHICO	Cra. 14 # 86 ^A – 09
CLIN. VET. SNOOPY	Cra. 24 # 63 – 28
CLIN. VET. NORMANDIA	Av: Boyaca # 49 ^A – 41
CLIN. VET. GALERIAS	Clle. 53A # 27 ^A – 10
CLIN. VET. BOSCO	Clle. 80 # 75 – 04
CLIN. DEFENSORA DE ANIMALES	Clle. 163 # 25 – 06
CLINIVET	Clle. 80 # 83 – 40
CLINIDOG	Cra. 43A # 106 – 42
CLIN. DOVER	Clle. 124 con Cra. 7
CLINICA DE LA SALUD ANIMAL	Tv. 13A # 119 – 27
CLIN. VET. Dr. ORDOÑEZ	Tv. 38 # 106 – 20
CLIN. VET. LA FLORESTA	Tv. 47 # 100 – 15
CLIN. VET. SONIA CUERVO	Clle. 80 # 10 – 87
CLIN. VET. POINTER	Cra. 53 # 130 ^A – 23
CONS. VET MALU	Dg. 8 # 77 – 13
CONS. VET. GANASUR	Av. Caracas. # 28 – 07
CONS. VET. VENECIA	Dg. 49 # 52 – 17 Sur
CONS. VET. CIUDAD BOLIVAR	Cra. 44 # 60 – 59 Sur
CONS. VET. EL LABEL	Cra. 16 # 54 – 28 Sur
CONS. VET. MANNING	Tv. 82A # 86 ^B – 57 Sur
CONS. VET. SOACHA	Cra. 7 # 24 ^A – 28
CONTRY CAN	Av.15 # 128 – 51
ANIMALITOS DE SUBA	Cra. 111 # 135 ^B - 33
CRIADERO	Clle. 134 # 50 – 55
Dr. COTRINO	Aut. Nte. # 86 – 53
GIOVANNA CASTELLANOS	Clle. 6 ^a # 69 ^F – 46
HOSP. VET. SANTAFE DE BOGOTA	Dg. 103 # 56 ^A – 30
HOSPIVET	Tr. 38 # 105 – 28
KANICAT	Aut. Nte. 108 – 04
KENNEL DOG	Clle. 8 # 69 ^D – 05
LAB. CLIN. VET.	Aut. Nte. # 126 ^B – 21
LAB. CLIN. Dr. AZUMENDI	Clle. 139 # 22 – 15
LAB. CLIN. VET. DIAGNOSTICA	Clle. 98 bis # 56 ^a - 14
LAB. VET. Dr. G. LUQUE	Clle. 70 A # 10 – 86
LAS MASCOTAS DE YESI	Clle. 8 # 35 – 19 Sur
MASCOTILANDIA	Av. Caracas # 54 – 71
MEDICAL PET. CENTER	Clle. 124 con Cr. 7
PET. GARDEN AND MARKET	At. Nte. # 106 – 21
PETS'S PARLOUR VET.	Cra. 24 # 77 – 48
POLICLINICA VET. 20 DE JULIO	Clle. 24 # 6 – 56 Sur
R & M... ASCOTAS	Clle. 138 # 38 – 28
TIJERAS CANICAS	Av. Boyaca # 18 – 04

UNIVERSA MASCOTAS	At. Nte. # 102 - 90
URGENCIAS VET.	Cra. 21 # 1- 25
UNIVERSIDAD NACIONAL	Clle. 26 con 42
UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO	Km. 15 Av. USME
UNIVERSIDAD DE LA SALLE	Clle. 174 con Cra. 7
UNIVERSIDAD UDCA	Aut. Nte. con 222
UNIVERSIDAD SAN MARTIN	Clle. 182 # 20 – 17
VET. LA PERRILLA	Clle. 132 # 10 – 06
VET. MI GRANJITA	Aut. Nte. # 183 – 86
VETERILAB	Dg. 83 # 22 – 57
VET. QUINAVET	Cra. 17 # 70 – 45
VET. JUNGLA	Av. Caracas # 73 – 04
VET. SEA WORD I	Cra. 80 # 70 – 45
VET. TUCAN	Clle. 8 # 56 ^a - 20
PLANETA ANIMAL	Cra. 116B # 80 – 51
CRIADERO “ PERRITOS & GATITOS “	Clle. 137 # 108 – 22
CONS. VET. REFUGIO SUBA	Clle. 136B # 108 ^a - 17
CONS. VET. SAWAR	Clle. 139 # 109 – 02

ANEXO 2

FORMATO DE REGISTRO

Registro No. _____.

Clinica Vet. _____ . H.C. _____ . Fecha de Recolección. _____.

Raza. _____ . Edad. _____ . Sexo _____.

Mx Colectada

1. Materia Fecal
2. Sangre
3. Materia Fecal y Sangre

Plan de Vacunación.

Esquema Completo _____ . Parcial _____.

Cuales Vacunas _____

Dx. Confirmado Si _____ . No _____.