



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Caracterización molecular de las cepas de Parvovirus canino tipo 2 en perros de la ciudad de Cuenca”

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médica
Veterinaria Zootecnista

Autora:

Verónica Andrea Clavijo Izquierdo

CI: 0104834270

Correo electrónico: anshi94sdacr@gmail.com

Director:

Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD.

CI: 0151059417

Cuenca, Ecuador
06-enero-2020



RESUMEN

La parvovirus canina es una enfermedad infecto-transmisible causada por el Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2). Afecta especialmente a cachorros menores de seis meses y a perros adultos sin protección inmunológica. La signología incluye letargia, anorexia, fiebre, emesis y diarrea; si el animal no recibe tratamiento de soporte, la enfermedad puede ser fatal. La cepa original CPV-2 ha sido reemplazada completamente por tres variantes (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c), y dicha evolución se ha dado en un relativamente corto periodo de tiempo. Por otro lado, existe controversia con respecto a cuan virulentas resultan estas cepas, así como el nivel de protección de las vacunas actuales. El objetivo de este estudio fue identificar las diferentes cepas de CPV-2 en perros con signología compatible a parvovirus en la ciudad de Cuenca. Para ello se recolectó 80 muestras de heces, de las cuales se descartaron las que no generaron un amplicón específico de perro (Control de proceso). Posteriormente se realizó el PCR de diagnóstico de la enfermedad y se seleccionaron 25 muestras positivas que fueron enviadas a secuenciación. De estas muestras, fue posible obtener la secuencia genética de 21. El 47,61% pertenecieron a la cepa CPV-2a, seguida por la cepa CPV-2c con un 38,1%, y por último la cepa CPV-2b con un 14,29%. De acuerdo a lo publicado estas cepas sufren cambios de prevalencia y pueden generar subvariantes de las mismas en el tiempo y en diferentes ubicaciones geográficas.

Palabras claves: Parvovirus canino. Virología. Biología molecular. Medicina canina.



ABSTRACT

The canine parvovirus is a contagious disease caused by canine parvovirus type 2 (CPV-2). It especially affects puppies under six months and adult dogs without immune protection. The signology includes lethargy, anorexia, fever, vomiting and diarrhea; if the animal doesn't get support treatment, the illness can be lethal. The original strain CPV-2 has been completely replaced by three variants (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c), and this evolution has occurred in a relatively short time. However, there is controversy regarding how virulent these strains are, as well as the level of protection of the current vaccines. The aim of this study was to identify the different strains of CPV-2 in dogs with parvovirus compatible signs in the city of Cuenca. For this, 80 feces samples were collected, from which those that did not generate a specific amplicon of dog (Process control) were discarded. Subsequently, the disease diagnostic PCR was performed and 25 positive samples were selected and sent to sequencing. From these samples, it was possible to obtain the genetic sequence of 21. The 47,61% belonged to strain CPV-2a, followed by strain CPV-2c with 38.1%, and finally the strain CPV-2b with 14,29%. According to what has been published, these strains suffer prevalence changes and can generate subvariants of themselves over the time and in different geographic locations.

Keywords: Canine parvovirus. Virology. Molecular biology. Canine medicine.



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INDICE DE CONTENIDO	3
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS.....	6
INDICE DE ANEXOS	7
DEDICATORIA.....	10
AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	12
1. INTRODUCCION.....	14
1.1 Objetivos	16
1.1.1 Objetivo general.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
1.2 Hipótesis	16
2. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1 Generalidades	17
2.1.1 Taxonomía	17
2.1.2 Estructura.....	17
2.2 Datos históricos.....	19
2.3 Origen y evolución genética	20
2.3.1 Origen del parvovirus canino	20
2.3.2 Evolución genética	21
2.4 Interacción virus-huésped	24
2.4.1 Adherencia e invasión viral.....	24
2.4.2 Replicación.....	26
2.5 Susceptibilidad y transmisión	27
2.6 Patogénesis y signos clínicos	28
2.7 Epidemiología variantes (CPV-2a/2b/2c)	30
2.7.1 Circulación de las variantes en la región	30
2.7.2 Patogenicidad asociada a las nuevas variantes	31
2.8 Protección de las vacunas.....	32
2.9 Diagnóstico	33



2.10 Reacción en cadena de la polimerasa	35
2.11 Secuenciación de Sanger	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Materiales necesarios para la colecta, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras (Actividad experimental número 1).	39
3.2. Métodos para la colección, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras (Actividad experimental número 1).	39
3.3. Materiales para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxiribonucleico total (CPV-2 y la especie animal de estudio) (Actividad experimental número 2).	40
3.4. Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxiribonucleico total (CPV-2 y la especie animal de estudio) (Actividad experimental número 2).	41
3.5. Materiales para la amplificación del ADN canino para el control de proceso (Actividad experimental número 3).	43
3.6. Métodos para la amplificación del ADN canino para el control de proceso (Actividad experimental número 3).	44
3.7. Materiales para la detección del amplicon o producto de PCR del control de proceso (Actividad experimental número 4).	45
3.8. Métodos para la detección del amplicon del control de proceso (Actividad experimental número 4).	46
3.9. Materiales para la amplificación del ADN del CPV-2 (Actividad experimental número 5).	47
3.10. Métodos para la amplificación del ADN del CPV-2 (Actividad experimental número 5).	49
3.11. Secuenciación de los productos de la PCR correspondientes a la región codificante de la VP2 para la genotipificación de las variantes de los CPV-2 (Actividad experimental número 6).	49
3.12. Análisis estadístico (Actividad experimental número 7)	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
5. CONCLUSIONES	62
6. RECOMENDACIONES	63
7. BIBLIOGRAFÍA	64
8. ANEXOS	77



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructuras del virión de CPV-2.....	18
Figura 2: Esquema general de la vía de endocitosis mediada por clatrina.....	26
Figura 3: Esquema de las actividades realizadas dentro de la estrategia de trabajo que se siguió para la identificación de las variantes genéticas de los CPV-2 de pacientes caninos afectados por parvovirus.....	38
Figura 4: Electroforesis de los productos de PCR del control de proceso.....	52
Figura 5: Electroforesis de los productos de PCR de diagnóstico.....	54
Figura 6: Alineamiento de las secuencias obtenidas de los 25 productos de PCR enviados a secuenciar.....	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variaciones en los aminoácidos de VP2 de parvovirus de carnívoros.....	23
Tabla 2: Composición de la mezcla de reacción de los ensayos de PCR del control de proceso.....	44
Tabla 3: Perfil de temperatura empleado en el ensayo de PCR para el control de proceso.....	45
Tabla 4: Perfil de temperatura ajustado y empleado en el ensayo de PCR para la detección de material genético de los CPV-2.....	49
Tabla 5: Características clínicas de los casos de infección por las variantes de CPV-2 identificadas mediante secuenciación tipo Sanger.....	55
Tabla 6: Características biológicas de los casos de infección por las variantes de CPV-2 identificadas mediante secuenciación tipo Sanger.....	56
Tabla 7: Datos de los resultados de secuenciación.....	61



ÍNDICE DE ANEXOS

Figura 7: Recolección de material fecal.....	77
Figura 8: Proceso de extracción del material genético.....	77
Figura 9: Procesamiento del material genético para prueba de PCR.....	78
Figura 10: Colocación de las muestras en el equipo de electroforesis.....	78
Figura 11: Ejemplo de formato de la historia clínica.....	79
Tabla 8: Datos de cada una de las variables o descriptores de cada uno de los animales incluidos en el estudio.....	80



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Verónica Andrea Clavijo Izquierdo en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización molecular de las cepas de Parvovirus Canino tipo 2 en perros de la ciudad de Cuenca", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 06 de enero de 2020

Verónica Andrea Clavijo Izquierdo

C.I: 0104834270



Cláusula de Propiedad Intelectual

Verónica Andrea Clavijo Izquierdo, autora del trabajo de titulación “Caracterización molecular de las cepas de Parvovirus Canino tipo 2 en perros de la ciudad de Cuenca”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 06 de enero de 2020

Verónica Andrea Clavijo Izquierdo

C.I: 0104834270



DEDICATORIA

A Dios por sus bendiciones sin las cuales esto no sería posible. A mis padres por todo el sacrificio realizado en favor de mi formación. Por celebrar junto a mi cada logro, y brindarme soporte en los momentos difíciles. A mi hermana que fue un gran ejemplo a seguir desde la infancia. Porque siempre creyó en mí y me protegió con valentía y rudeza. A Nicholas Hopkins por alentarme y apoyarme en mis logros. Por mostrarme como ser una mejor mujer y ponerle un nuevo color a mi vida.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por su infinito amor y la grandeza de sus obras sobre mi vida. Por mostrarme de que soy capaz en su presencia. Por toda la alegría, gozo y sabiduría que me transmite en este caminar.

A mis padres por todos los esfuerzos que hicieron para poder hacer realidad este sueño. Gracias por su gran amor, dedicación y constancia.

Al Dr. Antonio Vallecillo por transmitirme todo el conocimiento posible en más que lo necesario para la realización de esta tesis. Gracias por mostrarme la pasión que necesité en este último proceso, y por la cálida amistad formada en ello.

A la Dra. Dora Botero por brindarme las herramientas necesarias para poder ver con nuevos ojos el mundo maravilloso que me rodea.

Al Dr. Guillermo Guevara por su apoyo económico y moral para la realización de esta investigación.

Al Dr. Fredy Carpio por aportar con su conocimiento, experiencia y las instalaciones de la clínica veterinaria de su propiedad.

A mis compañeros, que supieron hacer de este camino mucho más divertido e interesante. Gracias especialmente a los “Cholos” por tantos divertidos y gratos momentos compartidos dentro y fuera del aula. Gracias por el fuerte lazo de amistad formado para siempre.

A los docentes de la Universidad de Cuenca, por impartirme sus conocimientos y porque también me enseñaron otras cosas importantes para la vida.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Ala: Alanina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

CME: Endocitosis mediada por clatrina

CPV: Parvovirus canino

CPV-1: Virus diminuto de los caninos o parvovirus canino tipo 1 o MVC

CPV-2: Parvovirus canino tipo 2

dNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatos

ddNTP: Didesoxinucleótidos

FPV: Virus de la panleucopenia felina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de Virus

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

Met: Metionina

MEV: Virus de la enteritis del visón

ORF: Marcos abiertos de lectura

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RaPV: Parvovirus del mapache



TfR: Receptor de la transferrina

Thr: Treonina

Tyr: Tirosina

Val: Valina



1. INTRODUCCIÓN

Entre las causas más importantes de gastroenteritis hemorrágica viral en perros, se encuentra la Parvovirus canina; ésta enfermedad se transmite comúnmente por vía fecal-oral, aunque también es posible la diseminación por vía fecal-nasal (1). Se transmite fácilmente, debido a que es un virus estable que puede mantenerse viable hasta más de siete meses en el medio ambiente (2).

Los animales más afectados son los cachorros desde 6 semanas hasta 6 meses de edad, en los cuales se puede observar fiebre, anorexia, emesis y diarrea hemorrágica; y menos común es la miocarditis presentada en animales muy jóvenes con falla en la transferencia pasiva de inmunidad materna (3). Sin tratamiento farmacológico para evitar complicaciones, la mortalidad puede ser tan alta como del 91%, mientras que con un tratamiento agresivo la mortalidad se puede reducir desde un 48 a un 4% (1).

El virus causal de ésta infección está clasificado en la Familia Parvoviridae, los virus de ésta familia se caracterizan por ser de tamaño pequeño, carecer de envoltura y tener un genoma de cadena sencilla de ADN (Ácido desoxirribonucleico) (4). El primer Parvovirus descrito en perros fue el Virus diminuto canino (CPV-1, Canine parvovirus 1), que no está relacionado antigénicamente con el virus causante de la Parvovirus, el Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2, Canine parvovirus 2). Al día de hoy han sido reconocidas 3 variantes antigénicas (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) que han reemplazado en su totalidad a la cepa original CPV-2, demostrando que en un período relativamente corto desde su aparición, este ha sufrido varios cambios de adaptación al hospedador (5).



Los estudios realizados en Ecuador acerca de la circulación de las nuevas variantes antigénicas del CPV-2 han demostrado la presencia de las 3 variantes en el país. Uno de éstos estudios fue realizado en la provincia de Bolívar, en él se muestra una mayor prevalencia de la variante del CPV-2c entre los años 2011 y 2012 (6). Por otro lado el más reciente realizado en la ciudad de Quito en el 2017, muestra una mayor frecuencia de CPV-2a (7).

Los anteriores son los únicos estudios con los que se cuenta en el país acerca de las variantes del virus. Por ello se planteó investigar la caracterización de las cepas del CPV-2 en los perros de la ciudad de Cuenca, y como se ha visto en los estudios citados anteriormente, la distribución del virus difiere de región en región. En concordancia con esto, una revisión realizada por Puentes en el 2012, señala que las cepas CPV-2 (a/b/c) circulan con diferentes frecuencias según el área geográfica analizada, esto debido a los resultados publicados en países Latinoamericanos como Uruguay y Argentina en diferentes años (8). Por otro lado, Pérez y colaboradores en el año 2007 realizaron la primera detección de la cepa CPV-2c en Latinoamérica, mostrando ser la principal variante viral en Uruguay, manteniéndose de esa forma hasta el 2009 (9); sin embargo otro estudio en el mismo país mostró un inesperado cambio en el año 2010 con la aparición de una nueva cepa CPV-2a que comenzó a esparcirse rápidamente. Estos resultados enfatizan los cambios dinámicos que sufre el virus incluso en una misma región a través del tiempo, motivo de la importancia de llevar a cabo programas de vigilancia continuos para una mejor comprensión del comportamiento viral (10). Por lo anterior, el presente trabajo se plantean los siguientes objetivos:



1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo general

Evaluar la frecuencia de las variantes genéticas del Parvovirus canino tipo 2 en caninos afectados por ésta virosis en la ciudad de Cuenca.

1.1.2 Objetivos específicos

- Identificar la presencia de material genético del Parvovirus canino tipo 2 en muestras de heces de caninos con signología clínica compatible con la Parvovirus canina.
- Obtener la secuencia genética codificante de la región entre los aminoácidos 100 a 500 de la proteína VP2 del Parvovirus canino tipo 2.

1.2 Hipótesis

Es posible la identificación de las 3 variantes de Parvovirus canino tipo 2 en la ciudad de Cuenca, así como se ha demostrado en distintos estudios alrededor del mundo.



2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades

2.1.1 Taxonomía

La familia Parvoviridae comprende dos subfamilias, Parvovirinae que infecta a vertebrados y Densovirinae, que infecta a insectos. Las últimas actualizaciones propuestas por el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) ampliaron la subfamilia Parvovirinae de 5 a 8 géneros: Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus, Dependoparvovirus, Eritroparvovirus, Protoparvovirus y Tetraparvovirus. El Parvovirus canino (CPV), está dentro del género Protoparvovirus, conjuntamente con el Virus de la panleucopenia felina (FPV), el Virus de la enteritis del visón (MEV) y el Parvovirus del mapache (RaPV) (11).

2.1.2 Estructura

Los parvovirus son de pequeño tamaño (diámetro 25 nm) sin envoltura lipídica y de forma icosaédrica (Figura 1), cuyo genoma está compuesto por una hebra de ADN lineal, aproximadamente de 5000 nucleótidos empaquetados como una cadena de sentido negativo en el caso del parvovirus canino (12,13).

Este genoma contiene dos grandes marcos abiertos de lectura (ORF's del Inglés Open Reading Frame). Uno de ellos codifica dos proteínas no estructurales (NS1 Y NS2), las cuales están involucradas con la replicación de ADN genómico viral; mientras que el segundo ORF codifica las dos proteínas estructurales de la cápside: VP1 la menos abundante y VP2 la de mayor abundancia, que se forman por empalme o *splicing* alternativo de un ARN mensajero (ARNm) transcrito a partir del ADN genómico viral (13,14).

La cápside consiste en 60 copias de la combinación de estas 2 proteínas, más una tercera (VP3), resultado de la escisión de VP2 por la acción de las proteasas del hospedero, por lo que solo está presente en viriones completos que contienen ADN del individuo afectado (14,15). Los cambios en la secuencia de aminoácidos de VP2 son los que han provocado cambios en las propiedades antigénicas de las variantes virales, así como la determinación del intervalo del hospedero; siendo esta proteína el lugar donde se hayan dos grandes epítomos antigénicos (Epítomo A y epítomo B) (15,16).

Las características de superficie incluyen una estructura elevada en el eje triple de simetría (espiga triple) y regiones deprimidas alrededor del eje quíntuple (cañon) que abarcan el eje doble (hoyuelo). Los cambios en el rango de huésped del virus se encuentran dentro de la espiga triple (Figura 1) (17,18).

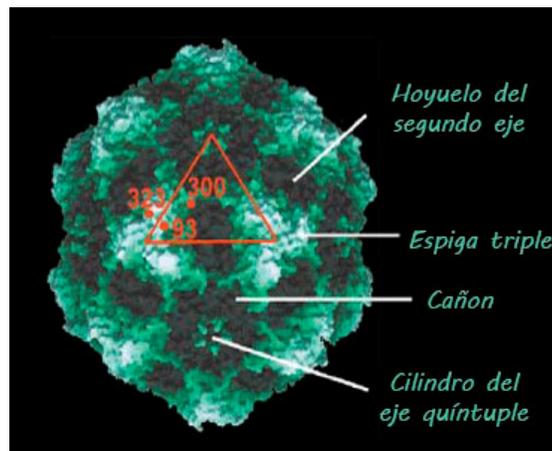


Figura 1: Estructuras del virión de CPV-2. El triángulo rojo indica una unidad asimétrica de la cápside. En rojo se indican las áreas de la espiga triple relacionadas con el intervalo de huésped (Modificado de Hueffer K. y Parrish C., 2003) (18).



2.2 Datos históricos

Se le otorgó el nombre de CPV-2 al virus causante de la enfermedad para poder diferenciarlo del primer parvovirus descrito en el año 1970, llamado Parvovirus canino tipo 1 (CPV-1) o Minute virus of canines (MVC), que originalmente se creía no era patogénico (19). Años después se demostró que en realidad el CPV-1 causaba enteritis y diarrea en neonatos (20), así como también reabsorción y aborto en perras preñadas (21).

El CPV-2 surgió a comienzos del año 1978, cuando muchos clínicos en diferentes partes del mundo, en especial en los Estados Unidos, Australia y Europa; observaron casi de manera simultánea brotes de gastroenteritis severa entre grupos de perros, pudiendo presentarse en camadas enteras e incluso en colonias (21,22), sin embargo, varios análisis serológicos retrospectivos realizados en Europa, revelaron que en sueros recolectados entre 1974 y 1977 ya se encontraban presentes anticuerpos contra el CPV-2 (23). Los primeros estudios que se realizaron para determinar la causa de estos grandes brotes concluyeron que esta nueva enfermedad era muy parecida al FPV, debido a los hallazgos realizados en la necropsia de varios animales infectados, junto a la signología que mostraban. Por esto, también se asoció la idea de que el CPV evolucionó a partir del FPV (24, 25).

Este primer biotipo del CPV-2 fue reemplazado completamente en la población canina entre 1979 y 1985 por dos variantes antigénicas, designadas como CPV-2a y CPV-2b, los cuales se propagaron rápidamente por todo el mundo (26,27). Varios años después en el 2000, se identificó en Italia otra variante, la CPV-2c (28), aunque un estudio más actual concluyó que la cepa más antigua de CPV-2c se detectó en Alemania en 1996, mostrando un tiempo de circulación más



anticipado a su primer reporte (29). Esta cepa fue identificada consecuentemente en Vietnam (30), España (31), Latinoamérica (9) y Estados Unidos (32), demostrando su diseminación a nivel mundial.

2.3 Origen y evolución genética

2.3.1 Origen del parvovirus canino

Los parvovirus se han aislado de una amplia variedad de hospedadores, incluyendo el humano, pero las propiedades que poseen son similares (25, 33), como su replicación, la cual se realiza en las células que se dividen activamente en el huésped (34).

Aunque el origen exacto del CPV-2 es todavía debatido, la estrecha relación con el FPV, junto a su repentina aparición, sugiere que el CPV-2 es una variante que ha modificado el intervalo de hospedadores a los que afecta el FPV o se trata de un ancestro antigénicamente similar, que afecta a un carnívoro salvaje (5, 35, 36). Otra teoría apunta que la mutación se dio a partir de cepas vacunales de FPV (12).

Los virus como el FPV, RaPV y MEV son similares al CPV por encima del 98% en su secuencia de ADN dentro del gen de la proteína de la cápside, incluso son similares antigénicamente (37). Por otro lado, pese a su similitud, el CPV-2 difiere de los otros virus en algunas características específicas que serán descritas más adelante. Como sea, es probable que el CPV-2 surgió al haber adquirido mutaciones que le permitieron la interacción al receptor de Transferrina canina (TfR), el cual media el proceso de adherencia e invasión (38, 39).



2.3.2 Evolución genética

El CPV-2 ha evolucionado a una mayor velocidad en comparación a su virus relacionado, el FPV, mostrando tasas de sustitución genética similares a los virus con genoma de ARN (13).

Para su evolución fueron necesarios cambios consecutivos en tres aminoácidos esenciales dentro de la región perteneciente a la depresión de la cápside que está asociada con el reconocimiento del TfR celular, el cual funge como receptor al CPV-2 (12). La secuencia del CPV-2 se diferencia de FPV en aproximadamente 17 nucleótidos distribuidos por todo el genoma, pero el mayor número de cambios se concentra en la región codificante de la VP2 (40). Esas modificaciones en VP2, sustituyeron en el residuo 93 de Lys⁹³ por Asn y en el residuo 323 de Asp³²³ por Asn, y estos fueron cambios claves para introducir el intervalo de hospederos al canino, y adicionalmente un intervalo de pH para hemoaglutinar y un epítipo específico para CPV-2 (17, 36, 37, 41). También se menciona el residuo 300 como un componente importante en el proceso de adaptación al hospedador, en el que se dio el cambio de Ala por Gly en los virus derivados de CPV-2a en perros (Ver Tabla 1) (18, 42).

Entre el CPV-2 y el FPV el intervalo de hospederos difiere tanto *in vivo* como *in vitro*. Ambos muestran capacidad para replicarse en cultivos celulares felinos, pero solo el CPV-2 lo hace eficientemente en cultivos celulares caninos, y esta limitación de intervalo de hospedador en el caso de FPV se debe en esencia a la falta de un receptor funcional en la superficie de las células caninas; mientras FPV y CPV-2 se unen al TfR felino, solo el CPV-2 puede unirse de manera eficiente al TfR canino (41,43).



Los aislamientos de CPV-2 se ha considerado que no eran capaces de replicarse en los gatos, pero un año después de su aparición, surgió una variante (CPV-2a), la cual es capaz de infectar y provocar enfermedad en gatos, y también se convirtió en el virus más común en otros carnívoros (35, 41).

La primera variante (CPV-2a) contenía seis sustituciones en la secuencia de la VP2, en el residuo Met⁸⁷ paso a Leu, el de Ile¹⁰¹ a Thr, el de Val¹⁰³ a Ala, el de Ala³⁰⁰ a Gly, el de Asp³⁰⁵ a Tyr y el de Val⁵⁵⁵ a Ile, y existe evidencia de que esta cepa posee mayor capacidad para infectar células caninas que su predecesora, el CPV-2 (18, 44). En este sentido, se debe mencionar que, a pesar de los múltiples estudios epidemiológicos emergentes, los procesos evolutivos asociados con la transferencia de virus de especies cruzadas son poco conocidos. Aunque la adaptación a la nueva especie hospedadora es fundamental pues eleva la tasa reproductiva para lograr una transmisión sostenida; la mayoría de estas transferencias entre especies dan como resultado un callejón sin salida para el virus (45).

Por otro lado, dos fueron los residuos que diferenciaron CPV-2a de CPV-2b (Asn⁴²⁶-Asp y Ile⁵⁵⁵-Val) (13). En las últimas décadas se han producido cambios en el residuo 297 (Ser a Ala) tanto en CPV-2a como en el CPV-2b. Estas cepas con mutación en el residuo 297 a menudo se designan como variantes nuevas CPV-2a y CPV-2b (Ver Tabla 1) (46).

Los primeros CPV-2a se diferencian de las demás variantes en el residuo 555 (Ile) (Ver Tabla 1) (13). Con la introducción posterior de este cambio, las cepas nuevas de CPV-2a/2b y el CPV-2c difieren entre sí solo en el residuo 426 de la proteína capsídica VP2, exhibiendo los aminoácidos Asn para el CPV-2a, Asp para el CPV-



2b y Glu para el CPV-2c (44, 47). Esta mutación en el residuo 426 afectó la región antigénica mayor, el epítipo A, que está colocado en lo más alto de la espiga triple (38). También se ha informado cambios en el residuo 440 en CPV-2a y CPV-2b, pero sus implicaciones no se entienden claramente (48).

En los últimos años se ha descrito un mutante más, la presencia de residuo Asp³⁰⁰ en los CPV-2a/2b, el cual ha sido detectado en poblaciones de felinos domésticos o salvajes y mapaches. Este cambio de Gly³⁰⁰ por Asp es probablemente la expresión de una adaptación adicional del virus a la replicación en tanto huéspedes felinos o mapaches (Ver Tabla 1) (42, 49).

Tabla 1: Variaciones en los aminoácidos de VP2 de parvovirus de carnívoros.

Virus	Residuos												
	80	87	93	101	103	297	300	305	323	426	555	564	568
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Val	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
Nueva CPV-2a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
Nueva CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Gly	Tyr	Asn	Glu	Val	Ser	Gly
Asp- 300	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asn	Val	Ser	Gly

Fuente: Modificado de Martella *et al.*, 2006 (44).



2.4 Interacción virus-huésped

2.4.1 Adherencia e invasión viral

Para obtener acceso a la célula, los virus animales han desarrollado una amplia variedad de mecanismos para enviar sus genes y proteínas accesorias a la célula blanco. Algunos virus explotan las vías endocíticas celulares para invadir las células diana, pero para hacer uso de estas vías, deben involucrar la unión a moléculas receptoras de la superficie celular que faciliten la endocitosis del virus (50). La unión a receptores es clave en este proceso para que se inicie el ciclo de replicación de los virus, y en muchos casos esta interacción virus-receptor determina la susceptibilidad del hospedero, así como el tropismo del tejido. Algunos receptores para diferentes virus involucran carbohidratos, proteínas, y también receptores múltiples que en conjunto median la unión celular y la infección o invasión viral (51). La consecuente internalización del virus puede implicar varios tipos de endocitosis, entre los descritos se encuentran la invasión por endocitosis mediada por Clatrina (CME), macropinocitosis, endocitosis mediada por caveolas o una variedad de otros mecanismos aun poco caracterizados (52).

Los virus no envueltos al realizar la interacción con el receptor celular, activan una serie de pasos que llevan a la endocitosis de la partícula viral, clasificación de la partícula dentro de un compartimento endosomal para la penetración en el citoplasma y desensamblaje del virus para liberar su material genético y poder replicarse (39, 53).

La entrada del CPV-2a a la célula comienza por la unión a los TfR celular tipo I, seguida de CME y el transporte a los endosomas de reciclaje (54).



El TfR tipo I es una glucoproteína transmembrana homodimérica de tipo II que facilita el ingreso de Hierro a la célula al unir e internalizar la Transferrina cargada con Hierro (50). Se ha demostrado que las interacciones específicas entre las cápsides víricas y los TfR del hospedador son fundamentales para la infección, por lo que proporcionan un control para el intervalo de hospedero al que afecta la infección viral, en el caso del CPV-2, los aminoácidos sustituidos que afectaron el rango de hospedador en variantes naturales o mutantes, incluyen los residuos de la proteína VP2: 93, 323, 299 y 300 (39). El CPV-2 se une al TfR mediante la triple espiga de la cápside (55). A continuación, la célula internaliza el virus por endocitosis dependiente de Clatrina, cuyo mecanismo forma vesículas de membrana dependientes de una serie de componentes estructurales, entre ellos la Clatrina. La Clatrina es un complejo proteico reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras como el complejo AP-2, el cual estimula la formación de una malla de Clatrina. Cuando la vesícula ya ha sido formada, la fisión de esta es controlada por GTPasa dinamina. Una vez separadas estas vesículas de la membrana plasmática, la capa que contiene Clatrina y los adaptadores se desmontan rápidamente para permitir la fusión de la vesícula con un endosoma, que posteriormente enviará el genoma viral al núcleo para iniciar la replicación (Figura 2) (50, 53).

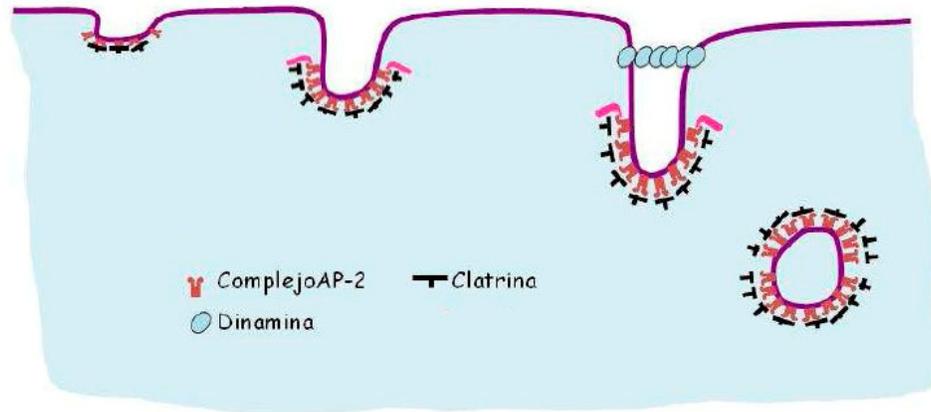


Figura 2: Esquema general de la vía de endocitosis mediada por clatrina (Modificado de Gutiérrez M. y López S., 2010) (53).

2.4.2 Replicación

Los parvovirus entregan su genoma encerrado en la cápside a la célula, atravesando el citoplasma y el núcleo con una estructura intacta, aunque con una cápside algo reordenada. La encapsidación dentro de un pequeño virión es posible porque estos virus solo codifican dos casetes de genes, y son únicos al poseer un ADN tanto lineal y monocatenario, esto hace a su cromosoma pequeño y flexible. Sin embargo, es este pequeño tamaño el que les costó el carecer de proteínas accesorias que fueran capaces de inducir la fase S en las células del hospedero, además de una plantilla de transcripción dúplex (56). Debido a estas carencias los parvovirus autónomos se multiplican a través de un proceso modificado de replicación por lazo rodante en el núcleo de las células susceptibles del hospedero, para lo cual deben esperar a que la célula entre en la fase S de mitosis antes de que puedan controlar su maquinaria sintética para su propia replicación, pues requieren funciones celulares como las ADN polimerasas, entre otros componentes, además del NS1 viral (40). Como resultado, estos virus son capaces de secuestrarse en las células en reposo sin inhibir el programa de



tránsito de la célula mediante el ciclo celular, evitando desencadenar muchas de las respuestas celulares que suelen acompañar la entrada a la célula por virus de otras familias. Esto le permite superar la desventaja de poseer una sola hebra, por la capacidad de empaquetar un genoma relativamente complejo para ser importada intacta en el núcleo de la célula (56).

2.5 Susceptibilidad y transmisión

Animales de todas las edades pueden contraer la infección si no poseen inmunidad o si esta inmunidad está incompleta; pero son los cachorros entre 6 semanas a 6 meses de vida los más susceptibles de manifestar la enfermedad clínica, mientras los animales adultos pueden no desarrollar la enfermedad o que esta sea leve (3, 21).

Durante las primeras semanas de vida los cachorros están protegidos por los anticuerpos calostrales de la madre (suponiendo que la madre posee anticuerpos), por lo que es extremadamente raro encontrar la enfermedad en recién nacidos. Sin embargo esta inmunidad dada tiene una vida media de unos 10 días, por lo que al ser destetados la cantidad de estos disminuye y se vuelve vital la inmunización para su protección (5). Es necesario tener en cuenta que existe un periodo crítico en el que dependiendo del momento de la primovacuna del cachorro, los títulos de anticuerpos maternos pueden ser suficientemente altos como para bloquear una correcta respuesta inmune, pero no suficientes para protegerlo (7, 57).

Otros factores que predisponen a la infección y pueden volver más severa la infección, es la sobrepoblación, la insalubridad, el compromiso de la barrera gastrointestinal; como en el caso de los parásitos intestinales y la infección por



Coronavirus; también condiciones estresantes del medio ambiente; como al momento del destete, cuando los enterocitos sufren un alto recambio por los cambios en la microbiota y en la dieta, esto los vuelve más susceptibles al tropismo viral (21, 58, 59).

Razas como el Rottweiler, Doberman pinsher, Pit Bull Terrier Americano, Labrador Retriever y el Pastor Alemán muestran un mayor riesgo de infección y, aunque las razones de esto son poco claras, en el caso del Doberman Pinsher y el Rottweiler que comparten una ascendencia común, se ha implicado la mayor prevalencia de presentar enfermedad de Von Willebrand, así como la inmunodeficiencia hereditaria del Rottweiler (5, 58). Entre perros mayores de 6 meses, los machos enteros tienen doble riesgo de infección en comparación de hembras enteras (34). También se describe un mayor riesgo según la estacionalidad, dándose con mayor frecuencia la infección en las épocas de Verano (5, 60).

El virus se transmite de forma directa por vía fecal-oral, el cual es liberado en las heces a partir del día 3 o 4 después de la exposición, o también de forma indirecta por vía oronasal al estar los animales en contacto con fómites contaminados con heces infectadas; también es posible la diseminación por parte de roedores, aves o insectos (3).

2.6 Patogénesis y signos clínicos

El periodo de incubación puede ir desde 3 a 14 días, aunque lo más común va de 5 a 7 días (3, 61). La replicación primaria se da en el tejido linfoide de la orofaringe, nódulos linfáticos mesentéricos y en el timo (3, 12). Después la



viremia primaria se produce entre el día 3 a 5, diseminándose por vía hematógica hacia varios órganos, dando como resultado una infección sistémica (61).

El virus presenta alto tropismo por los tejidos con alta división mitótica, como los de la médula ósea, órganos linfoides y criptas intestinales (12, 62), también se localiza en la cavidad bucal y esófago (5). Además, un estudio realizado por Decaro y colaboradores en el 2007, demostró que todas las cepas aparte de encontrarse en títulos virales altos en los órganos linfoides y médula ósea como cabría de esperarse, se localizaban sorprendentemente con títulos medianos en órganos del sistema nervioso central (62). La excreción en heces comienza el día 3 o 4 tras la exposición, sin necesidad de que el animal manifieste en ese instante los signos clínicos, y se libera ampliamente por un máximo de 7 a 10 días (63).

Se conoce que los primeros signos involucran en la mayoría de perros, la letargia, anorexia y fiebre con ausencia de signos gastrointestinales, los cuales se desarrollan en 24 a 48 horas de presentar los primeros signos (34, 64).

El virus se replica activamente en el epitelio germinal del intestino, disminuyendo la capacidad de los enterocitos para madurar, lo que provoca acortamiento de las vellosidades, reducción de la capacidad de absorción y pérdida de la integridad de esta barrera (1, 5). Esto desencadena diarrea que puede ser mucoide o sanguinolenta, y al perderse la integridad de la barrera puede ocurrir translocación de bacterias intestinales y la absorción de endotoxinas bacterianas en la circulación sistémica, como consecuencia se puede producir sepsis, endotoxemia, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (asociada con mayores tasas de mortalidad), coagulación intravascular diseminada y la muerte (3).

Se puede desarrollar rápidamente deshidratación y choque hipovolémico por la pérdida de líquidos y proteínas a consecuencia de la diarrea y emesis (34).



También es posible el dolor abdominal a la palpación de manera secundaria a enteritis, gastroenterocolitis aguda o intususcepción. La intususcepción se atribuye a cambios en la motilidad intestinal y daños en la pared intestinal, que podría provocar que una zona del intestino penetre dentro de sí otra sección necrosada o disfuncional (1).

Hallazgos en el hemograma a menudo muestran leucopenia grave, siendo más frecuente y pronunciada la linfopenia que la neutropenia. También es posible observar anemia, pero esta no es una característica constante de la infección (61).

2.7 Epidemiología variantes (CPV-2a/2b/2c)

2.7.1 Circulación de las variantes en la región

Al día de hoy la original CPV-2 ha sido completamente reemplazada por otras variantes (27). Los más recientes estudios sobre su distribución en Latinoamérica, señalan que desde el año 2007 al 2009 en Uruguay, la única cepa detectada fue la CPV-2c, mientras que en el 2010 la cepa CPV-2a sufrió una expansión clonal y fue la que predominó por entonces (10). Por otro lado en Argentina entre el 2008 al 2010 existió prevalencia de la cepa CPV-2c (65). Por último en São Paulo-Brasil, en el año 2016 se encontró que CPV-2b predominó muy por encima de las otras dos (66). Estos resultados muestran los cambios dinámicos en las variantes de CPV-2 no solo con respecto al área geográfica, sino también en el tiempo, motivo por el cual se resalta la importancia de los programas de vigilancia en curso para proporcionar una mejor comprensión acerca de la distribución de las variantes del CPV-2 (10).



2.7.2 Patogenicidad asociada a las nuevas variantes

El CPV-2 fue la primera variante del virus asociada con el desarrollo de diarrea hemorrágica (34). Un par de años más tarde, antes de lograr identificar la cepa CPV-2a, se informó sobre varios brotes excepcionalmente graves y con poca eficacia al tratamiento paliativo que se prestaba inicialmente. Ello demostraba un mayor potencial patogénico, que se debía en gran medida a la acumulación de cambios en los aminoácidos de la proteína VP2 (22). Se ha informado que las variantes antigénicas CPV-2a y CPV-2b se liberan en las heces en títulos mucho más altos y provocan una manifestación de la enfermedad más grave. Además, parece ser necesaria una dosis infectiva (número de partículas virales) más baja para producir la infección. También se ha mencionado que los pequeños cambios en las nuevas cepas de CPV-2a y CPV-2b no representan un mayor riesgo patógeno al de las primeras variantes de estas mismas (38).

Un estudio realizado en Korea comparó la patogenicidad entre las cepas de mayor circulación en la región. Entre estas cepas se mantenía una subdivisión de CPV-2: CPV-2a-I y CPV-2a-V (Variantes propias de la región). Parte de sus resultados mostraron que CPV-2a-I exhibe un mayor potencial patógeno en comparación con CPV-2b, habiendo presentado un menor tiempo medio en la aparición de leucopenia y por lo tanto fue el primer grupo en exhibir signos clínicos de infección, aunque fue la cepa CPV-2a-V la que reportó una mayor mortalidad (67).

Por otro lado, con respecto al potencial patogénico de la última cepa reportada CPV-2c existen datos controversiales, una de las primeras investigaciones mostró que es capaz de inducir signos menos severos en comparación con las otras cepas, como por ejemplo diarrea mucoide en lugar de hemorrágica, ausencia de



emesis, y finalmente todos los animales se recuperaron en pocos días; indicando que su potencial patógeno sería menor, pero observándose un tiempo prolongado de hasta 51 días de eliminación (68). Por otro lado un estudio realizado en el 2015, en el cual se inoculó experimentalmente a perros con las variantes CPV-2a y CPV-2c, demostró que el cuadro clínico fue más severo en presencia de la cepa CPV-2c, en donde la leucopenia y la depresión mental aparecían más tempranamente (69).

Por último, se han reportado casos de infecciones agudas por CPV-2a y 2b en felinos salvajes (72). Mientras que infecciones por los 3 tipos han sido reportados en gatos domésticos (49, 73). En este sentido unos estudios mostraron que gatos con la enfermedad provocada por la cepa tipo 2c fue leve (74, 75). Pero se asume que los gatos pueden diseminar la enfermedad y contagiar a los perros (73).

2.8 Protección de las vacunas

En general para una buena efectividad protectora de las vacunas deben contener los tipos antigénicos más nuevos de un virus, pues ello implica una protección más completa; sin embargo, la variante original CPV-2 se sigue usando en las formulaciones de vacunas (76). La protección que confieren las vacunas resulta controversial debido a los estudios realizados. Mientras unos estudios señalan que las vacunas con la cepa antigua son capaces de proteger incluso frente a la cepa CPV-2c en condiciones experimentales (77, 78). Por otro lado Ohshima y colaboradores (2008), encontraron que los anticuerpos en perros inmunizados con vacuna CPV-2 no reaccionaron de manera eficaz ante aislados de CPV-2a o de CPV-2b, cuando se compararon con sueros de perros vacunados con las



cepas homólogas, lo cual lleva a pensar que la respuesta protectora no es adecuada ante virus heterólogos y puede exponer a los animales a la infección por las nuevas variantes (46).

Estudios más recientes demostraron que al aplicar una vacuna multivalente con la cepa CPV-2b en su formulación, puede inducir respuesta cruzada contra todas las cepas de campo actualmente en circulación, inclusive en cachorros con anticuerpos maternos (79, 80). Por último, otro estudio acerca de los factores asociados a fallas en la vacunación señala que, el tipo de cepa usada no se asoció significativamente con el fracaso, por el contrario, la edad de administración de la última vacuna de CPV-2 antes de presentar la enfermedad fue un factor de riesgo significativo para la falla de la vacunación (81). Por lo tanto, es necesaria más investigación pues los experimentos no son lo suficientemente concordantes.

2.9 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la infección por CPV-2 se basa en los antecedentes epidemiológicos, la signología clínica y en los antecedentes de un protocolo de vacunación incompleto o inexistente (2, 82). Por otro lado, los mismos signos clínicos pueden ser producidos por otros patógenos, por lo que la confirmación del diagnóstico debe realizarse con pruebas de laboratorio (83).

La prueba más utilizada por los profesionales son las pruebas de inmunocromatografía debido a su simplicidad y rapidez; sin embargo, algunos estudios demuestran su baja sensibilidad diagnóstica (83–85). Estas pruebas detectan la presencia del antígeno en las heces, pero es posible resultados falsos positivos desde el día 3 a 10 post vacunación con una vacuna a virus activo (vivo)



modificado por la excreción fecal del virus vacunal (34). Aunque en este sentido, un estudio realizado en 2007 en el que analizaron muestras fecales de perros con diarrea post vacunación con CPV-2, determinó que la mayoría de las infecciones similares al virus que ocurren poco después de la vacunación, están relacionados con la infección por cepas de campo de CPV-2, en lugar de la reversión a la virulencia del virus activo modificado de la vacuna (86). Por otro lado, los resultados falsos negativos también son posibles debido a la baja carga vírica que se presenta en las últimas etapas de la infección (día 10 a 12), siendo fácilmente detectables en el pico de liberación viral (4-7 días después de la infección). También puede ser debido a la presencia de anticuerpos a nivel intestinal que neutralizan al virus, impidiendo la detección de éste en las heces (13, 34). Adicional a esto se ha postulado que puede haber falla debido a las pequeñas modificaciones en el genoma de las diferentes cepas que alteran su perfil antigénico (87, 88). Sin embargo, un estudio del 2010 demostró que las pruebas inmunocromatográficas de uso común en la clínica son capaces de detectar las 3 cepas virales (89).

Las pruebas serológicas no son relevantes para el diagnóstico del virus, debido a que los anticuerpos séricos pueden persistir durante meses y la respuesta serológica a la infección no se puede diferenciar de aquella inducida por la vacunación (84). Otros tipos de pruebas usadas en el diagnóstico son la hemoaglutinación, el aislamiento en líneas celulares felinas, la aglutinación en látex, visualización por microscopia electrónica y la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction) (90).

La prueba molecular de PCR resulta ser la más sensible y específica al momento de diagnosticar el virus (83, 91).



2.10 Reacción en cadena de la polimerasa

El descubrimiento de la estructura del ADN marco el inicio de una nueva era en el estudio de los ácidos nucleicos (92), Despertando el interés de varios grupos por desarrollar tecnologías y métodos para el estudio y detección del ADN (93).

La invención oficial de la PCR se le atribuye a Kary Mullis, quien describió el proceso en 1984 y se hizo con el premio Nobel de Química gracias a ello. Sin embargo, fue Gobind Khorana y su equipo quienes describieron por primera vez en 1971 un método para replicar *in vitro* una secuencia pequeña de ADN con el uso de cebadores o *primers*, aunque lastimosamente este no recibió demasiada atención (94, 95).

En la actualidad PCR convencional consiste básicamente en combinar una muestra de ADN que incluye la secuencia diana a detectar en un tubo de ensayo con cebadores u oligonucleótidos específicos para la diana, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y la polimerasa de ADN tipo *Taq* termoestable en una solución tampón adecuada, cuya preparación se calienta y se enfría repetidamente durante varios ciclos hasta lograr amplificar la cantidad deseada del material genético en estudio (96).

Hay 3 pasos fundamentales en la técnica del PCR. El primer paso es la desnaturalización del ADN a altas temperaturas (desde 90 a 97°C). La etapa dos de hibridación se da a una temperatura entre 50 a 60°C, y es en donde se da el acoplamiento de los *primers* o cebadores al extremo 3' en la hebra plantilla para cebar la extensión. En el paso tres, la extensión comienza con la acción de la enzima *Taq* polimerasa sobre el complejo de *primers* acoplado en la segunda etapa. La enzima trabaja a una temperatura óptima de 72°C y su acción es



agregar dNTPs complementarios para completar la cadena de ADN. Al final del último ciclo, las muestras se suelen incubar a 72°C durante unos cuantos minutos para rellenar los extremos de los productos de PCR recién sintetizados. Como resultado, se habrá formado los amplicones o productos de PCR con un tamaño según el número total de pares de bases (pb) que debe ser conocido por el investigador (93, 94).

Al final de la PCR, los amplicones se visualizan mediante el método de electroforesis en geles de agarosa. El ADN se coloca en pocillos prefabricados en gel de agarosa y se aplica una corriente, debido a que el esqueleto de fosfatos del ADN le confiere carga negativa, en la electroforesis los fragmentos de ADN migrarán hacia el polo cargado positivamente. A estos geles también se les adiciona Bromuro de etidio, un colorante apropiado que permite visualizar bajo luz ultravioleta el resultado de la migración de las moléculas de ADN (93, 97).

2.11 Secuenciación de Sanger

Este método de secuenciación fue desarrollado por Frederick Sanger entre el año 1975 y 1977 (98). Consiste en el empleo de análogos químicos de los dNTPs, los dideoxinucleótidos (ddNTP) que carecen del grupo terminal 3' hidroxilo, que se requiere para la extensión de las cadenas de ADN y por lo tanto no se pueden enlazar con el 5' fosfato del siguiente dNTP, por lo que la extensión se detendrá en ese punto. Se realizan cuatro reacciones paralelas, cada una con un ddNTP radiomarcado de una base específica (Adenina, Guanina, Citocina y Timina), que al realizar la lectura mostrará su marca justo donde se detuvo la reacción que corresponde a un par de bases en concreto. Años después la técnica se mejoró, reemplazando el marcaje radioactivo por detección fluorométrica, esto permitió



que la reacción ocurriera en un solo tubo y que la detección se realice mediante electroforesis capilar (99).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Para lograr el cumplimiento de los objetivos planteados se tomaron muestras de heces de un total de 80 animales con la ayuda de un hisopo estéril, sin considerar su sexo, edad o raza, para la inclusión de los sujetos de estudio se estableció la condición de que los animales que presentaran signología clínica sugerente a la infección por CPV-2, los cuales adicionalmente deberían estar acompañados de los resultados de una biometría hemática y de un respectivo formulario completado con los datos básicos del paciente (nombre, raza, edad, sexo, estado vacunal). Las muestras fueron recolectadas en distintas clínicas veterinarias que amablemente colaboraron en el proyecto. Un esquema general de las actividades realizadas dentro de la estrategia de trabajo que se siguió se muestra en la Figura 3.

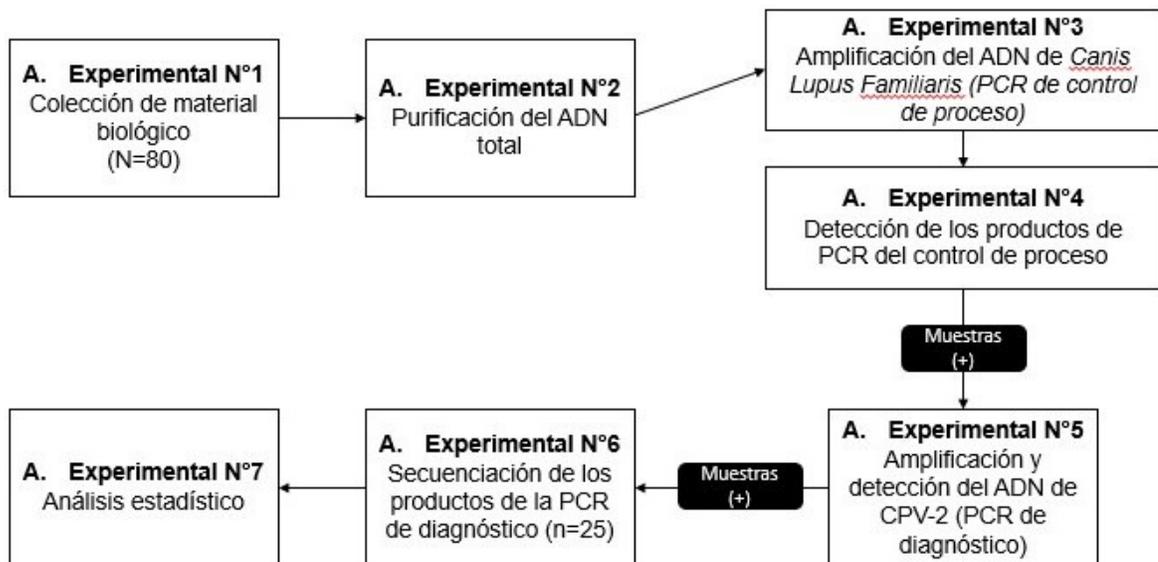


Figura 3: Esquema de las actividades realizadas dentro de la estrategia de trabajo que se siguió para la identificación de las variantes genéticas de los CPV-2 de pacientes caninos afectados por parvovirus.



3.1. Materiales necesarios para la colecta, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras (Actividad experimental número 1).

Biológicos:

- Hisopos con heces de caninos con signología clínica compatible con la causada por la infección por CPV-2.

Equipos y otros materiales:

- Hisopos estériles.
- Tubos estériles.
- Ultracongelador a -80°C .
- Cooler.
- Gel refrigerante.
- Refrigerador.
- Rotulador.

3.2. Métodos para la colección, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras (Actividad experimental número 1).

PASO 1: Se tomaron las muestras de heces con un hisopo estéril directamente del recto del animal (Anexo 1).

PASO 2: Las muestras colectadas (Hisopo) se colocaron en un tubo estéril adecuadamente rotulado.

PASO 3: Las muestras se mantuvieron en refrigeración por 7 días como máximo hasta llevarlas al lugar de almacenamiento final.

PASO 4: El material colectado fue transportado en un cooler con gel refrigerante, para finalmente almacenarlas en un Ultracongelador a -80°C en el Laboratorio de



Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, hasta ser procesado para la obtención del material genético total.

3.3. Materiales para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxiribonucleico total (CPV-2 y la especie animal de estudio) (Actividad experimental número 2).

Biológicos:

- Muestras de heces obtenidas de la actividad experimental número 1.

Reactivos:

- Agua destilada estéril.
- Solución de lisis 2X (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM de EDTA, pH 8.0, 200 mM de NaCl, 50 mM de Sucrosa y 2 % de SDS) (Sigma, Cat. no.: T4661, EDS, S3014, S0389, 71725).
- Solución de proteinasa K (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 50 % de Glicerol y 5 mg/ml de Proteinasa K (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, G5516, P2308).
- Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. no.: 77619).
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. no.: E7148) y/o Isopropano (Sigma, Cat. no.: 278475).
- Etanol al 70 % (Sigma, Cat. no.: E7148 y W4502).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).



Equipos y otros materiales:

- Material de cristalería.
- Micropipetas (10, 100 y 1000 μ l).
- Puntas diferentes para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Baño María
- Platina de agitación.
- Balanzas.
- Potenciometro (pHmetro).
- Refrigerador (4 °C).
- Ultracongelador (-80 °C).

3.4. Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxiribonucleico total (CPV-2 y la especie animal de estudio) (Actividad experimental número 2).

PASO 1: Se colocó en tubos que contenían los hisopos con las muestras biológicas 200 μ l de agua destilada estéril, 250 μ l de la Solución de lisis 2X, y 50 μ l de la Solución de proteinasa K.

PASO 2: Los tubos fueron agitados en vortex por 5 a 10 s y se incubaron las muestras por una hora a 56 °C.

PASO 3: Una vez concluido el período de incubación, se retiró cuidadosamente el hisopo, presionándolo en las paredes del tubo para liberar lo más posible la Solución de lisis (Anexo 2).



PASO 4: Se colectó la Solución de lisis ($\pm 400 \mu\text{l}$) y se colocó en un tubo eppendor de 1.5 ml, al que se le adicionó un volumen igual de la Solución de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1.

PASO 5: Las muestras se mezclaron en vortex por 10 a 15 s y para separar las fases se centrifugaron a $12,000 \times g$ por 10 min a 4°C .

PASO 6: Una vez concluida la centrifugación, la fase acuosa ($\pm 400 \mu\text{l}$) fue recolectada y se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 2.0 ml, al cual se le adicionó 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío (4°C) para precipitar el ADN total, las muestras se mezclaron por inversión 5 a 6 veces.

PASO 7: Para coleccionar el ADN precipitado las muestras se centrifugaron a $12,000 \times g$, por 10 min a 4°C .

PASO 8: Una vez generada la pastilla, se retiró el sobrenadante mediante decantación y se adicionó $500 \mu\text{l}$ de Etanol al 70% para realizar un lavado.

PASO 9: Se volvió a centrifugar en las condiciones antes descritas, para posteriormente eliminar la solución de Etanol al 70% por decantación.

PASO 10: Las pastillas se dejaron secar a temperatura ambiente protegidas del polvo, y de la luz directa por 8 a 12 h.

PASO 11: Una vez secas las pastillas de ADN total, éstas fueron resuspendidas en $20 \mu\text{l}$ de agua grado biología molecular y almacenadas a -20°C hasta su uso en los ensayos de PCR para el control de proceso y el de detección del material genético del CPV-2.



3.5. Materiales para la amplificación del ADN canino para el control de proceso (Actividad experimental número 3).

Biológicos:

- Ácido desoxiribonucleico total, obtenido de la actividad experimental número 2.

Reactivos:

- Enzima *Taq* ADN polimerasa, con la Solución Buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030).
- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).
- Oligonucleotidos sentido DOGCyB-For (AATTGAATAGGGCCATGAA) (Invitrogen). Y oligonucleotido antisentido DOGCyB-Rev (CTCCTCTTG TGTTTTAGTTAAGTTAATATG) (Invitrogen). Los oligonucleotidos previamente reportados amplifican un producto de PCR de 808 bp.
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).

Equipos y otros materiales:

- Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Termociclador.



3.6. Métodos para la amplificación del ADN canino para el control de proceso (Actividad experimental número 3).

PASO 1: En un tubo eppendorf de tamaño (1.5 o 2.0 ml) adecuado de acuerdo al número de muestras que se van a ensayar se mezcló los siguientes reactivos, para tener por cada muestra un volumen final de reacción de 25 μ l.

Tabla 2: Composición de la mezcla de reacción de los ensayos de PCR del control de proceso.

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19.15 μ l	No aplica.
Buffer de PCR.	10 X	2.5 μ l	1X
dNTP's	10 mM c/u	0.25 μ l	0.1 mM c/u
MgCl ₂	50 mM	1 μ l	2 mM
Oligo F DOG12S-For	100 μ M	0.2 μ l	0.8 μ M
Oligo R DOG12S-Rev	100 μ M	0.2 μ l	0.8 μ M
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/ μ l	0.2 μ l	0.04 U/ μ l
Volumen final	-----	23 μl	-----

Nota: El volumen de cada uno de los reactivos que se adicionan a la premezcla corresponde al producto de multiplicar el número de muestras por el volumen correspondiente al necesario de cada reactivo por cada reacción.

PASO 2: De esta premezcla se tomó 23 μ l y se colocó en cada uno de los tubos de PCR (250 μ l) a los que posteriormente se le adicionó 2 μ l de cada una de las muestras de ADN total correspondiente.

PASO 3: Las reacciones de PCR así preparadas se colocaron en el termociclador para iniciar el proceso de amplificación de acuerdo al siguiente perfil de temperatura programado.

**Tabla 3:** Perfil de temperatura empleado en el ensayo de PCR para el control de proceso.

Etapa:	Desnaturalización	35 ciclos			Extensión final
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
Tiempo	5 min	30 s	25 s	45 s	5 min

PASO 4: Una vez concluido el proceso de amplificación, a cada uno de los tubos se les adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga de ADN 6X, se mezcló y 10 µl de la mezcla fueron tomados para ser sometidos a electroforesis en gel al 1.2% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio (Anexo 3).

3.7. Materiales para la detección del amplicon o producto de PCR del control de proceso (Actividad experimental número 4).

Biológicos:

- Productos de PCR de las reacciones de amplificación.

Reactivos:

- Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500).
- Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045).
- Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637).
- Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3 % de Azul de bromofenol, 0.3 de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516).
- Marcador de peso molecular (Invitrogen, Cat. no.: 15628-050).



Equipos y otros materiales:

- Micropipetas (10, 100 y 1000 μ l).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vortex.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Horno de microondas.
- Balanza.
- Potenciometro (pHmetro).
- Platina de agitación.
- Transiluminador.
- Fotodocumentador.
- Computadora de escritorio.

3.8. Métodos para la detección del amplicon del control de proceso (Actividad experimental número 4).

PASO 1: Para el gel al 1.2% fueron pesados 0.36 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 30 ml de Solución buffer TAE 1X, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.

PASO 2: Una vez disuelta completamente la agarosa la mezcla se enfrió (\pm 45 a 55 $^{\circ}$ C) y se le adicionó 1 μ l de una Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, y la mezcla se vertió en el molde para el gel e inmediatamente se ubicaron los peines para formar los pozos.



PASO 3: Una vez gelificado, el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se le adicionó la cantidad de Solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.

PASO 4: Se procedió a cargar cada una de las muestras en el gel, y en uno de los pocillos se colocó 450 ng del Marcador de peso molecular de ADN (Anexo 4).

PASO 5: Concluido el proceso de cargado de las muestras y el marcador de peso molecular, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectó la corriente eléctrica a un voltaje de 90 V por 30 a 45 min.

PASO 6: Una vez resueltos los productos de PCR, se visualizaron en el transiluminador y con fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.

PASO 7: Se consideró como positiva la reacción de amplificación si fue posible observar un producto de PCR o amplicon con un tamaño de ± 808 bp; lo cual fue interpretado como una muestra de ADN de calidad suficiente y viable de ser amplificado, es decir una muestra válida para la detección de material genético del CPV-2.

PASO 8: Todas las muestras (positivas) validadas con este ensayo fueron sometidas a la detección de material genético del CPV-2.

3.9. Materiales para la amplificación del ADN del CPV-2 (Actividad experimental número 5).

Biológicos:

- Muestras de Ácido desoxiribonucleico validadas con el control de proceso.



Reactivos:

- Enzima *Taq* ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030).
- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).
- Oligonucleotidos sentido CPVCodGFor (GTTAATACTATGAGTGAGTTGC) (Invitrogen) y Oligonucleotido antisentido CPVCodGRev (GTATTAAATATATTAGTATAGTTAATTCC) (Invitrogen). Los oligonucleotidos fueron diseñados por el Dr. Antonio J. Vallecillo, y se estimó que amplifican un producto de PCR con un tamaño de 962 bp, y que incluyen la región entre el aminoácido Val¹³⁹/Iso¹³⁹ al Tre⁴⁴⁰/Ser⁴⁴⁰, y permite detectar el cambio en la posición 426 de la VP2, la cual corresponde a Asn (N⁴²⁶) para el CPV-2a, Asp (D⁴²⁶) para el CPV-2b y Glu (E⁴²⁶) para CPV-2c.
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).

Equipos y otros materiales:

- Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Termociclador.



3.10. Métodos para la amplificación del ADN del CPV-2 (Actividad experimental número 5).

Para la realización de ésta actividad (**Actividad experimental número 5**), se procedió a preparar las reacciones de manera similar a lo descrito en la sección 6.6. (**6.6. Métodos para la amplificación del ADN canino para el control de proceso.**), así como el proceso de amplificación, únicamente en éste caso se realizaron los ajustes necesarios en el tiempo de extensión para tener un producto de PCR del tamaño esperado en muestras de ADN de cepas vacunales (Vanguard® Plus 5/L y Canigen® MHA2 Puppy), las cuales fueron empleadas como control positivo. Con las condiciones de amplificación ya ajustadas (Tabla 4) se procedió a identificar la presencia de material genético del CPV-2 en las muestras de ADN ya validadas con el control de proceso.

Tabla 4: Perfil de temperatura ajustado y empleado en el ensayo de PCR para la detección de material genético de los CPV-2.

Etapa:	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
Tiempo	5 min	30 s	25 s	50 s	5 min

3.11. Secuenciación de los productos de la PCR correspondientes a la región codificante de la VP2 para la genotipificación de las variantes de los CPV-2 (Actividad experimental número 6).

De las muestras positivas a la presencia de material genético de CPV-2 se seleccionaron 25 de ellas, de las cuales fueron enviados los productos de PCR correspondientes a Corea para realizar la secuenciación de los mismos (Macrogen Korea. 0F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul 08511, Rep. of



Korea). Este número de muestras a secuenciar fue determinado en base a un análisis de los resultados publicados en los estudios realizados en el país, en los que con relación a la frecuencia observada de las variantes es posible identificar al menos una muestra de la variante menos frecuente (6, 7).

Con los datos obtenidos de la secuenciación de los productos de PCR, se procedió a realizar el análisis bioinformático necesario para la identificación de las variantes en la posición 426 de la VP2, las que corresponde como ya se mencionó a un residuo de Asn (N⁴²⁶) para el CPV-2a, Asp (D⁴²⁶) para el CPV-2b) y Glu (E⁴²⁶) para CPV-2c.

3.12. Análisis estadístico (Actividad experimental número 7)

Se realizó estadística descriptiva para obtener el porcentaje de muestras validas en el control de proceso. A continuación, se contrasto este porcentaje de muestras validas con aquellas muestras que den positivo a la prueba de PCR. Finalmente se realizó estadística descriptiva para determinar la presencia de las 3 cepas y en qué proporción fueron identificadas. Con respecto a los datos de los pacientes, la información se organizó de la siguiente forma. Para la edad se contempló dos grupos; el primero que comprende desde los dos hasta los 6 meses de edad (periodo de susceptibilidad mayor), y el otro grupo a los animales mayores de 6 meses. Para la raza únicamente se tomó en cuenta si el animal pertenecía a una raza pura o no. Por último, para agrupar a los animales según su estado de vacunación, se tuvo en cuenta primero, un grupo para aquellos animales que no fueron vacunados (No vacunados), un grupo para aquellos que completaron de manera exitosa su calendario de vacunación (Vacunas completas), un grupo para aquellos que habían sido vacunados pero su



calendario de vacunación no estaba al día (Vacunas incompletas), otro grupo para los que llevaban un calendario de vacunación al día según la edad del animal (Calendario al día), y finalmente otro grupo para aquellos animales con un calendario desconocido (Desconocido).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la recolección de 80 muestras de heces de perros de cualquier edad, raza y sexo con signología clínica compatible con los generados por la infección de CPV-2, conjuntamente con la recolección de datos en una hoja de historia clínica (Anexo 5 y 6). Al total de muestras que fueron recolectadas se las procesó para la obtención de material genético, para luego ser sometidas a un ensayo PCR de control de proceso para validar la viabilidad del material genético para ser amplificado. El amplicon que se generó con un tamaño de 808 pb, fragmento de ADN correspondiente a la secuencia de nucleótidos del ARN ribosomal 12S, en cuyo caso se confirmaba la presencia de ADN de *Canis familiaris* y la validez de las muestras de ADN total (Figura 4) (100%).

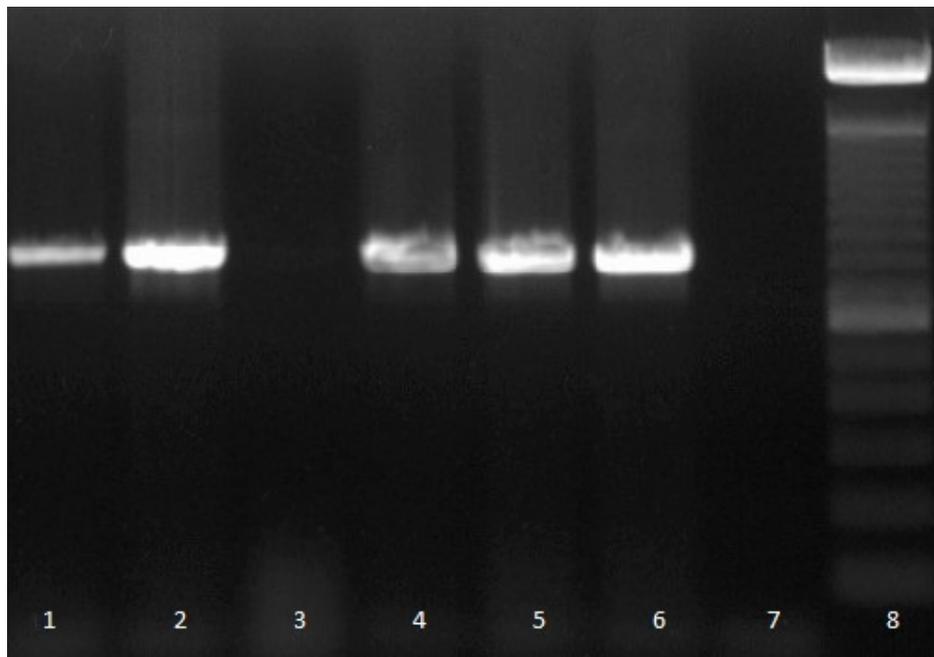


Figura 4: Electroforesis de los productos de PCR del control de proceso. Carril 1: Muestra 5 positiva. Carril 2: Muestra 6 positiva. Carril 3: Muestra 7 negativa. Carril 4: Muestra 8 positiva. Carril 5: Muestra 9 positiva. Carril 6: Muestra 10 positiva. Carril 7: Control negativo. Carril 8: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder (Invitrogen, Cat. no.: 15628-050).

El número de muestras validadas con éste control fue de 64 de un total de 80 (80%) (Tabla 5 y Anexo 6). Lo antes obtenido se puede deber a que se conoce



que las heces contienen inhibidores para el ensayo del PCR tales como las sales biliares, subproductos bacterianos y polisacáridos complejos, los cuales pueden afectar el éxito del ensayo si no se purifican lo suficiente; adicional a esto, se debe pensar también en la cantidad de heces utilizada y si es necesario medios de conservación o el uso de las heces frescas (101–103). Debido a estos factores es que no fue posible la detección del material genético en todas las muestras, sobre todo teniendo en cuenta que éstas contenían alta carga de material biológico de varios tipos por el mismo proceso patológico en curso, y que algunos animales brindaban mayor cantidad de muestra en relación a otros.

A estas 64 muestras se les aplicó el ensayo de PCR para detectar material genético de CPV-2, obteniéndose un 93,75% (60/64) de ensayos positivos (Figura 5, Tabla 5 y Anexo 6). Desario y colaboradores en su estudio obtuvieron un 76.40% (68/89) de muestras positivas mediante PCR convencional, utilizando primers ya descritos con anterioridad; sin embargo, las muestras incluidas en el estudio procedían de animales menores de un año cuyo único síntoma requisito era la presencia de diarrea (81). De manera parecida, Pérez y colaboradores obtuvieron un 75,37% de positivos en muestras de perros sospechosos de portar la enfermedad, empleando primers diseñados en el estudio (10). Es importante mencionar que en ninguno de estos estudios se realizó un PCR de control de proceso, lo cual puede mostrar una falsa menor eficiencia del PCR convencional si es que primeramente no se valida el material genético de las muestras.

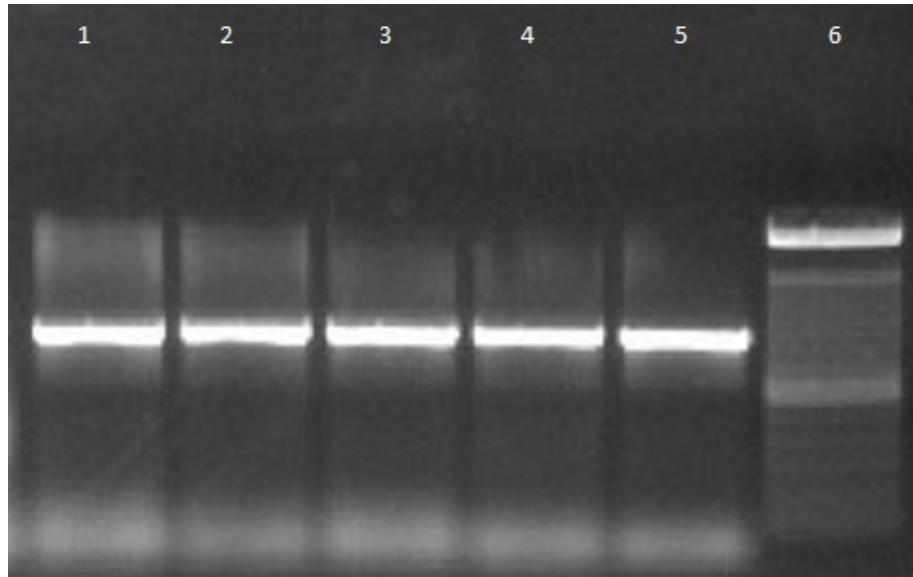


Figura 5: Electroforesis de los productos de PCR de diagnóstico. Carril 1: Muestra 24 positiva. Carril 2: Muestra 26 positiva. Carril 3: Muestra 27 positiva. Carril 4: Muestra 28 positiva. Carril 5: Muestra 29 positiva. Carril 6: Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder (Invitrogen, Cat. no.: 15628-050).

Las muestras de estos animales procedentes de clínicas veterinarias ubicadas dentro del sector urbano de la ciudad de Cuenca presentaron como signo clínico más común la diarrea (91,66%); pudiendo ser esta mucoide (45,45%) o hemorrágica (54,54%). Kalli y colaboradores en el 2010 mostraron que, de 94 cachorros con parvovirus, un 69,00% presentó diarrea, de los cuales 73,84% fue de tipo hemorrágica y en un 26,15% diarrea no hemorrágica.

El segundo síntoma más común fue el vómito, con un 81,66%, mientras que en el estudio de Kalli y colaboradores se reportó un 66,00%.

Seguido se posicionó la anorexia con un 73,33%, para lo cual Kalli reportó un porcentaje similar 71,33%.

Finalmente, la depresión o letargia (55,00%) y la fiebre (8,33%) se mostraron en un porcentaje mucho menor; mientras Kalli reportó un 71,30% de animales con letargia y un 33,00 % de animales con fiebre (102).



Un estudio realizado por Castro y colaboradores en el 2007 mostró que 70,00% de animales positivos a la enfermedad presentaban los signos clásicos de la parvovirus (vómito, anorexia, letargia y diarrea hemorrágica) (103). Por otro lado, un estudio realizado por Aguilar en el 2014 mostró que, de 100 animales positivos, el 76% presentó un cuadro típico en el que fueron agrupados los signos de diarrea con o sin sangre y presencia o ausencia de vómito. También se observó un 30% de animales con hipotermia (83).

Estos resultados tienen concordancia en el sentido de que los signos no se presentan de manera simultánea, y más bien ello depende primeramente del tiempo de la infección (1), debiendo tener en cuenta que los animales se presentaron para la recolección de la muestra en tiempos distintos desde que adquirieron la infección, y por otro lado también depende de la gravedad de la infección, siendo un factor influyente el tipo de cepa con la cual se encuentren infectados.

Tabla 5: Características clínicas de los casos de infección por las variantes de CPV-2 identificadas mediante secuenciación tipo Sanger.

Signo clínico	PCR		Secuenciación		
	C.P. n = 64 (%)	D.CPV-2 n = 60 (%)	Cepa de CPV-2		
			CPV-2a n = 10 (%)	CPV-2b n = 3 (%)	CPV-2c n = 8 (%)
Temperatura					
Fiebre >39,3°C	5 (7,81)	5 (8,33)	1 (10,00)	0	0
Estado mental					
Normal	26 (40,62)	25 (41,67)	3(30,00)	1(33,33)	4(50,00)
Deprimido	35 (54,68)	33 (55,00)	7(70,00)	2(66,66)	4(50,00)
Estuporoso	3 (4,18)	2 (3,33)	0	0	0
Gastrointestinales					
Anorexia	48 (75,00)	44 (73,33)	9(90,00)	3(100)	5(62,5)
Vómito	53 (82,81)	49 (81,66)	8(80,00)	3(100)	6(75,00)
Diarrea	59 (92,18)	55 (91,66)	9(90,00)	3(100)	8(100)

Tipo de diarrea	n = 59 (%)	n = 55 (%)	n = 9 (%)	n = 3 (%)	n = 8 (%)
Mucoide	25 (42,37)	25 (45,45)	5(55,55)	0	3(37,5)
Hemorrágica	34 (53,12)	30 (54,54)	4(44,44)	3(100)	5(62,5)

Notas: C.P., Control de proceso; D.CPV-2, Diagnóstico de PVC-2.

También se observó un mayor porcentaje de animales infectados entre las edades de 2 a 6 meses, así como también una mayor proporción de machos positivos, animales de razas puras y sin vacunas o con un calendario incompleto. Esto concuerda con lo ya descrito en la sección de revisión bibliográfica. (Tabla 6).

Tabla 6: Características biológicas de los casos de infección por las variantes de CPV-2 identificadas mediante secuenciación tipo Sanger.

Variable	PCR		Secuenciación		
	C.P. n = 64 (%)	D.CPV-2 n = 60 (%)	Cepa de CPV-2		
			CPV-2a n = 10 (%)	CPV-2b n = 3 (%)	CPV-2c n = 8 (%)
Edad					
(2-6 meses)	53 (82,81)	49 (81,60)	7(70,00)	1(33,33)	7(87,5)
(>6 meses)	11 (17,18)	11 (18,33)	3(30,00)	2(66,66)	1(12,5)
Sexo					
Macho	42 (65,62)	38 (63,33)	5(50,00)	2(66,66)	5(62,5)
Hembra	22 (34,37)	22 (36,60)	5(50,00)	1(33,33)	3(37,5)
Raza					
Mestiza	21 (32,81)	20 (33,33)	1(10,00)	2(66,66)	2(25,00)
Razas puras	43 (67,18)	40 (66,66)	9(90,00)	1(33,33)	6(75,00)
Estado vacunal					
No vacunado	25 (39,06)	23 (38,33)	3(30,00)	1(33,33)	4(50,00)
Vacunas completas	2 (3,12)	2 (3,33)	1(10,00)	1(33,33)	0
Vacunas incompletas	15 (23,43)	15 (25,00)	2(20,00)	1(33,33)	2(25,00)
Calendario al día	15 (23,43)	13 (21,66)	3(30,00)	0	2(25,00)
Desconocido	7 (10,93)	7 (11,66)	1(10,00)	0	0

Notas: C.P., Control de proceso; D.CPV-2, Diagnóstico de PVC-2.



De las 60 muestras positivas a la presencia de material genético de CPV-2 se seleccionaron 25 muestras para ser enviados los productos de PCR correspondientes a secuenciación tipo Sanger (Macrogen Korea. 0F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul 08511, Rep. of Korea). Posterior al análisis de los resultados (Figura 6), se logró obtener lecturas confiables de 21 muestras (Tabla 7).

	10	20	30	40	50	60	70	80
90 CaPV-2A_PCR_Product-MF177277 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	<u>AAAT</u> GATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 5 TGTTCCG	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTAATGCGAA CT-
Muestra 8 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 16 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAA	ATGTTGCTAC
Muestra 35 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 41 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 43 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 52 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 60 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 65 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 67 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAATGATAAT	GTATTGCTAC
CaPV-2B_PCR_Product-MF177280 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	<u>AGAT</u> GATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 1 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 26 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGATGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 44 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGATGATAAT	GTATTGCTAC
CaPV-2C_PCR_Product-MF177286 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	<u>AGAA</u> GATAAT	GTATTACTAC
Muestra 22 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 24 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 28 TGCTGGT	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTAATGCTAC CA-
Muestra 29 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTAATGCTAC
Muestra 36 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 50 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTAATGCTAC
Muestra 58 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTAATGCTAC
Muestra 69 CAACAGATCC	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAAGATAAT	GTATTGCTAC
Muestra 6 ATTGCTACCA	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAGGAATGGA	ATAAATGTA
Muestra 9 GCTACCAACA	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAAATGGAAT	ATATGTAATT
Muestra 10 CTACCAACAA	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AAAATGGAAT	AATGTAATTG
Muestra 20 ACCAA-CAAA	TACAGGAAGA	TATCCAGAAG	GAGATTGGAT	TCAAAATATT	AACTTTAACC	TTCTGTAAAC	AGAATGGAAT	ATGATTGCT

Figura 6: Alineamiento de las secuencias obtenidas de los 25 productos de PCR enviados a secuenciar. Se resalta la variación en la secuencia del codón (61-64) 426 obtenido en la secuenciación y su clasificación en las variantes de CPV-2a, 2b, 2c y 4 secuencias no legibles (Muestras 6, 9, 10 y 20).



La cepa CPV-2a se mostró de forma predominante con un 47.61 %, seguida por la cepa CPV-2c con un 38.1% y finalmente la CPV-2b en menor proporción (Tabla 7).

Un estudio de revisión realizado por Zhou y colaboradores en el 2017, señalaron que, en términos globales, entre los años de 2009 a 2015, CPV-2a (49,69%) fue la cepa con mayor predominio sobre 2b y 2c. Sin embargo a nivel de Europa y América Latina la cepa predominante era la CPV-2c, con un 57,02% y 47,00% respectivamente (104). En el continente Sudamericano esto se halló en países como México (105), Uruguay (9), Brasil (106), Argentina (65, 107, 108), y en nuestro país en la provincia de Bolívar (6).

Los cambios de distribución se han mencionado en países como Uruguay, cuando en el 2010 se dio una expansión clonal de la cepa 2a (38,00%); población donde predominaba la cepa 2c como ya se mencionó (10). Por otro lado, Monteiro y colaboradores en el año 2016, en Brasil, reportaron que de un total de 20 muestras, 18 de ellas pertenecían a la cepa 2b (66). Por último, un estudio realizado en Colombia en el 2017, mostró la presencia de las cepas 2a y 2b, pero no hallaron la presencia de la 2c (109).

De forma adicional, al relacionar mediante estadística descriptiva los principales datos de los pacientes junto a su signología con respecto al tipo de cepa que portaban se encontró que los animales con la cepa CPV-2c presentaron en iguales porcentajes (50/50) un estado mental normal y deprimido. Los signos típicos como anorexia, vómito y diarrea se presentaron mayoritariamente en muestras de perros con las cepas 2a y 2b. La diarrea de tipo hemorrágica se presentó en todos los animales contagiados por CPV-2b y en un 62,5 % para



CPV-2c; mientras la diarrea mucoide fue común para los infectados por CPV-2a (55,55%).

Respecto a esto resultados, Moon y colaboradores en el 2008 mostraron que animales inoculados con subvariantes de la cepa 2a presentaban más temprano la signología clásica en comparación con animales inoculados con la cepa 2b (67). Otro estudio realizado por Aldaz y colaboradores en el 2015 demostró que al inocular perros con la cepa 2a y 2c, los signos clínicos se evidenciaron mucho antes en presencia de la 2c (69). Por otro lado, un estudio muestra que animales infectados con la cepa 2c presentaron signos menos severos y la diarrea fue mucoide para todos los casos (68). Estos resultados no concluyentes pueden deberse al diseño experimental de cada estudio, pues en el caso de los dos primeros, la infección se provocó mediante inoculación, mientras que para el último la infección se dio de manera natural. También podría afectar la variación genética tanto de los virus como del hospedador por la región en la que se encuentran.

También se observó que la enfermedad en animales mayores de 6 meses fue más común para las cepas 2b (66,66%) y 2a (30%), y que fueron infectados animales con su calendario de vacunas completas con la cepa 2a y 2b. Decaro y colaboradores en el 2008 reportaron la presencia de la cepa 2c en una perra adulta preñada con calendario de vacunación completo (110). Por otro lado, Castro y colaboradores en el 2011 mostró que cachorros entre 2 a 6 meses con su calendario de vacunas al día presentaron enfermedad por las cepas 2a y 2b y en un perro de 10 meses de edad con calendario completo se halló la cepa 2a (111). Es posible que estos animales no hayan sido inmunizados de manera



correcta, ya sea a causa de la vacuna comercial usada o por un incorrecto protocolo.

Por otro lado, solo para la cepa 2a el número de infectados era de un 50% para machos y hembras, mientras para las otras cepas predominaban los machos. En relación con la raza, la cepa 2a y 2c infectó a la mayoría de razas puras, mientras los mestizos portaban 2b con mayor frecuencia.

Sin embargo, es necesario ampliar el número de muestras en futuras investigaciones y de esa manera conseguir datos confiables y descriptivos del comportamiento de cada una de estas cepas dentro de la población de perros de la ciudad de Cuenca.

Tabla 7: Datos de los resultados de secuenciación.

Cepa identificada:	Número de muestra:	Edad (Meses):	Raza:	Sexo:	Estado vacunal	Temperatura (° C):	Estado mental:	Anorexia:	Vómito:	Diarrea:
CPV-2a 10/21 (47,61%)	5	3	Shitzu	H	Desconocido	35,2	Deprimido		X	D.S.
	8	4	Pitbull	M	Una	39,9	Normal	X	X	D.M.
	16	8	Bull dog frances	M	Tres	37,8	Normal	X	X	D.S.
	35	2	Bull dog frances	H	Una	38,5	Normal	X	X	D.S.
	41	11	Bull terrier	M	Completas	39,5	Deprimido		X	D.M.
	43	4	French Poodle	H	Ninguna	38,2	Deprimido	X	X	No
	52	2.5	Mestizo	H	Una	38,5	Deprimido	X		D.M.
	60	12	Bull dog frances	M	Ninguna	36,0	Deprimido	X	X	D.S.
	65	4	American bully	M	Tres	37,8	Deprimido	X	X	D.M.
	67	3	Pitbull	H	Ninguna	38,0	Deprimido	X		D.M.
CPV-2b 3/21 (14,29%)	1	4	Mestizo	M	Ninguna	38,2	Deprimido	X	X	D.S.
	26	7	Braco aleman	Mo	Completas	39,8	Normal	X	X	D.S.
	44	8	Mestizo	H	Una	39,3	Deprimido	X	X	D.S.
CPV-2c 8/21 (38,1%)	22	2	Cocker	M	Una	38,0	Deprimido		X	D.S.
	24	3	Pitbull	M	Una	38,8	Deprimido		X	D.S.
	28	2	Husky	M	Una	38,7	Normal	X	X	D.M.
	29	7	Mestizo	H	Una	39,2	Normal	X	X	D.S.
	36	2	Mestizo	H	Ninguna	38,0	Normal			D.M.
	50	2.5	Pequines	H	Ninguna	38,5	Deprimido	X		D.M.
	58	3	Shitzu	M	Ninguna	38,2	Deprimido	X	X	D.S.
	69	4	Mestizo	M	Ninguna	38,1	Normal	X	X	D.S.
N.I	6	2	Husky	M	Una	39,7	Deprimido	X	X	D.S.
	9	2	French Poodle	M	Ninguna	38,0	Normal	X	X	No
	10	2	Chihuahua	M	Una	37,9	Normal		X	D.M.
	20	12	Mestizo	M	Ninguna	37,8	Deprimido		X	D.M.

N.I. No identificado, D.S. Diarrea con sangre, D.M. Diarrea mucosida.



5. CONCLUSIONES

Fue posible hallar material genético de los CPV-2 en la mayoría de las muestras, indicando que el diseño de los primers fue adecuado, y que su uso puede ser factible para el diagnóstico clínico. Se logró obtener de manera confiable la secuencia genética codificante de la región entre los aminoácidos 100 a 500 de la proteína VP2 en 21 muestras positivas a la presencia del virus. A diferencia de lo que se muestra en la mayor parte de la región, este estudio muestra que actualmente en la ciudad, es la cepa 2a la que prevalece en el medio. Con ello, se demuestra la necesidad de mantener una vigilancia constante del virus, y lo importante que puede ser para el clínico en cuanto es necesario conocer el comportamiento del virus en la zona para de esta forma poder tratar a sus pacientes de una forma integral, teniendo en cuenta lo que implica la mayor presencia de dicha cepa.

Por otro lado, los principales signos clínicos que caracterizan la enfermedad fueron hallados de manera variable, por lo que es necesario tener en cuenta que estos dependen de muchas variables intrínsecas y extrínsecas al individuo, motivo por el cual siempre se debe acompañar la sospecha de la enfermedad con exámenes complementarios como lo son el hemograma, las pruebas de inmucromatografía y el PCR, que es lo más accesible para el clínico.



6. RECOMENDACIONES

Se recomienda incluir un mayor número de muestras para realizar la secuenciación en estudios posteriores, para lograr un análisis más representativo de la población.

Se recomienda analizar la genética de las cepas que se encuentran en la región, y con ello poder formular vacunas que sean más efectivas en la inmunización de los animales.

Incluir análisis estadísticos con respecto a cuan diferente es la afectación o la gravedad de los signos en los animales según el tipo de cepa que presenten; y esto también en cuanto a la eficiencia tanto del tipo de vacunas que se utilizan, como los protocolos más usados por los clínicos locales, a fin de tener una idea más clara de una correcta medicina preventiva, por cuanto se ha mencionado que inclusive pacientes con un calendario completo o casi exitoso también son susceptibles de presentar la enfermedad, e incluso mayores de 6 meses pueden llegar a morir a causa de ésta.

También es elemental continuar en la investigación de la interacción virus-hospedador, ajustando los métodos empleados de estudio, para obtener información que represente lo que ocurre de manera natural en los animales infectados.

Finalmente, se sigue planteando el diseño e implementación de un ensayo de PCR múltiple con los primers aquí descritos, capaz de identificar el ADN del perro (Control de proceso), al mismo tiempo que logre hacerlo con el material genético del CPV-2 como herramienta alternativa diagnóstica a los ensayos inmunocromatográficos.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tabor B, Ecc VTS, Marrow B. Canine Parvovirus. *Vet Tech.* 2011;1–10.
2. Judge PR. Management of the Patient with Canine Parvovirus Enteritis. In *New Zealand Veterinary Nursing Association*; 2015. p. 5–11.
3. Ettinger S, Feldman E. *Textbook of veterinary internal medicine.* 7ma Ed. Canada: Elsevier Health Sciences; 2010. 2208 p.
4. Flores R. Parvovirus canina y aspectos de inmunización. *Ciencias Vet.* 1987;4:131–59.
5. Goddard A, Leisewitz AL. Canine Parvovirus. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2010;40(6):1041–53.
6. Aldaz J, García-Díaz J, Calleros L, Sosa K, Iraola G, Marandino A, et al. High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador. *Vet Microbiol.* 2013;166(1–2):214–9.
7. Erazo L. Determinación de las variantes antigénicas del parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en caninos domésticos de la ciudad de Quito. *Universidad Central del Ecuador*; 2017.
8. Puentes R. Parvovirus canina: situación actual y protección de las vacunas contra las nuevas variantes virales circulantes en la región. *Soc Med Vet del Uruguay.* 2012;48(598):5–10.
9. Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.* 2007;124(1–2):147–52.
10. Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, et al. Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet Microbiol.* 2012;155(2–4):214–9.



11. Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha D V., Pintel DJ, Qiu J, et al. The family Parvoviridae. *Arch Virol.* 2014;159(5):1239–47.
12. Díaz C, Correa JJ, Vera V, R. CAD, Correa JJ, A. VJV. Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. *Rev Med Vet.* 2008;(15):57–65.
13. Decaro N, Buonavoglia C. Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 2012;155(1):1–12.
14. Agbandje M, Parrish CR, Rossmann MG. The recognition of parvovirus capsids by antibodies. *Semin Virol.* 1995;6(4):219–31.
15. Xu J, Guo HC, Wei YQ, Shu L, Wang J, Li JS, et al. Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus Isolates from Sichuan and Gansu Provinces of China in 2011. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62(1):91–5.
16. Paul Reed A, Jones E V, Miller TJ, Reed AP, Jones E V, Miller TJ. Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol.* 1988;62(1):266–76.
17. Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR. Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol.* 1995;69(8):4702–10.
18. Hueffer K, Parrish CR. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):392–8.
19. Binn LN, Lazar EC, Eddy GA, Kajima M. Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun.* 1970;1(5):503–8.
20. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Minute Virus of Canines (MVC, Canine parvovirus type-1): Pathogenicity for pups and seroprevalence



- estimate. *J Vet Diagnostic Investig.* 1994;6(2):165–74.
21. Pollock RVH, Coyne MJ. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 1993;23(3):555–68.
 22. Carmichael LE. An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal.* 2005;52(7–8):303–11.
 23. Parrish CR. Emergence, natural history, and variation of canine, mink, and feline parvoviruses. *Adv Virus Res.* 1990;38:403–50.
 24. Kelly W. An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia. *Aust Vet J.* 1978;54:593.
 25. Paradiso PR, Rhode SL, Singer II. Canine parvovirus: A biochemical and ultrastructural characterization. *J Gen Virol.* 1982;62(1):113–25.
 26. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science.* 1985;230(4729):1046–8.
 27. Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol.* 1991;65(12):6544–52.
 28. Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *J Gen Virol.* 2001;82:3021–5.
 29. Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, et al. Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13(8):1222–4.
 30. Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HTT, Nguyen NH, et al. A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol.* 2004;149(11):2261–9.



31. Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco AL, Camero M, Manna L, et al. First detection of Canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal.* 2006;53(10):468–72.
32. Tanner P, Pardo MC, Saliki JT, Sanchez S, Buonavoglia C, Desario C, et al. Occurrence of Canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diagnostic Investig.* 2011;19(5):535–9.
33. Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res.* 1987;33:91–174.
34. Prittie J. Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care.* 2004;14(3):167–76.
35. Truyen U. Evolution of canine parvovirus: loss and gain of the feline host. *Tierarztl Prax.* 1996;24(3):316–8.
36. Horiuchi M, Goto H, Ishiguro N, Shinagawa M. Mapping of determinants of the host range for canine cells in the genome of Canine parvovirus using canine parvovirus/mink enteritis virus chimeric viruses. *J Gen Virol.* 1994;75(6):1319–28.
37. Chang SF, Sgro JY, Parrish CR. Multiple amino acids in the capsid structure of Canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol.* 1992;66(12):9214–22.
38. Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. *J Gen Virol.* 2016;97(9):2043–57.
39. Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR. Purified feline and canine Transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of Canine



- and Feline parvoviruses that correspond to their host ranges. *J Virol.* 2006;80(17):8482–92.
40. Parrish CR, Kawaoka Y. The origins of new pandemic viruses: The acquisition of new host ranges by Canine parvovirus and Influenza A viruses. *Annu Rev Microbiol.* 2005;59(1):553–86.
 41. Hueffer K, Parker JSL, Weichert WS, Geisel RE, Sgro J-Y, Parrish CR. The natural host range shift and subsequent evolution of Canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine Transferrin receptor. *J Virol.* 2003;77(3):1718–26.
 42. Allison AB, Harbison CE, Pagan I, Stucker KM, Kaelber JT, Brown JD, et al. Role of multiple hosts in the cross-species transmission and emergence of a pandemic Parvovirus. *J Virol.* 2011;86(2):865–72.
 43. Truyen U, Parrish CR. Canine and feline host ranges of Canine parvovirus and Panleukopenia virus: Distinct host cell tropisms of each virus *in vitro* and *in vivo*. *J Virol.* 1992;66(9):5399–408.
 44. Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. Evolution of CPV-2 and impliceance for antigenic/genetic characterization. *Virus Genes.* 2006;33(1):11–3.
 45. Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(2):379–84.
 46. Ohshima T, Hisaka M, Kawakami K, Kishi M, Tohya Y, Mochizuki M. Chronological analysis of Canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci.* 2008;70(8):769–75.
 47. Cavalli A, Desario C, Kusi I, Mari V, Lorusso E, Cirone F, et al. Detection and genetic characterization of Canine parvovirus and Canine coronavirus



- strains circulating in district of Tirana in Albania. *J Vet Diagnostic Investig.* 2014;26(4):563–6.
48. Kang BK, Song DS, Lee CS, Jung K II, Park SJ, Kim EM, et al. Prevalence and genetic characterization of Canine parvoviruses in Korea. *Virus Genes.* 2008;36(1):127–33.
 49. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, et al. Predominance of Canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology.* 2000;278(1):13–9.
 50. Cureton DK, Harbison CE, Cocucci E, Parrish CR, Kirchhausen T. Limited Transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of Canine parvovirus into Clathrin endocytic structures. *J Virol.* 2012;86(9):5330–40.
 51. Smith AE, Helenius A. How viruses enter animal cells. *Science* (80-). 2004;304(5668):237–42.
 52. Mercer J, Schelhaas M, Helenius A. Virus entry by endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:803–33.
 53. Gutiérrez M, López S. Mecanismos de entrada de virus: Una manera de conocer la célula. *Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas.* 2010;13:26–34.
 54. Suikkanen S, Antila M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M, Vuento M. Release of Canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology.* 2003;316:267–80.
 55. Hafenstein S, Palermo LM, Kostyuchenko VA, Xiao C, Morais MC, Nelson CDS, et al. Asymmetric binding of Transferrin receptor to parvovirus capsids. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(16):6585–9.
 56. Cotmore SF, Tattersall P. Parvoviral host range and cell entry mechanisms.



- Adv Virus Res. 2007;70(07):183–232.
57. O'Brien SE. Serologic response of pups to the low-passage, modified-live Canine parvovirus-2 component in a combination vaccine. *J Am Vet Med Assoc.* 1994;204(8):1207—1209.
 58. Houston DM, Ribble CS, Head LL. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc.* 1996 Feb 15;208(4):542–6.
 59. Smith-Carr S, Macintire DK, Swango LJ. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian. The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA). [Veterinary Learning Systems]; 1997.
 60. Aldaz Cárdenas JW, García-Díaz JR, Quiñonez-Ramos R. Factores de riesgo asociados a la Parvovirus canina en el Cantón Guaranda, Bolívar, Ecuador. *Rev Salud Anim.* 2015;37(3):183–90.
 61. Lamm CG, Rezabek GB. Parvovirus infection in domestic companion animals. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2008;38:837–50.
 62. Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, et al. Tissue distribution of the antigenic variants of Canine parvovirus type 2 in dogs. *Vet Microbiol.* 2007;121(1–2):39–44.
 63. Hurtado D, Báez P. Nueva perspectiva del Parvovirus canino. *Agric Anim Sci.* 2012;1(2):46–60.
 64. Nelson RW, Couto CG. Small animal internal medicine. Quinta Edi. *Small Animal Internal Medicine.* Elsevier; 2014. 392 p.
 65. Calderón MG, Romanutti C, Antuono AD, Keller L, Mattion N, La Torre J. Evolution of Canine parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010:



- CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population. *Virus Res.* 2011;157(1):106–10.
66. Monteiro K, Allendorf SD, Vicente AF, Appolinário CM, Peres MG, Cortez A, et al. Viral type characterization and clinical aspects of Canine parvovirus in naturally infected dogs in São Paulo State, Brazil. *Pesqui Veterinária Bras.* 2016;36(12):1181–5.
 67. Moon HS, Lee SA, Lee SG, Choi R, Jeoung SY, Kim D, et al. Comparison of the pathogenicity in three different Korean Canine parvovirus 2 (CPV-2) isolates. *Vet Microbiol.* 2008;131(1–2):47–56.
 68. Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by Canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagnostic Investig.* 2005;17(2):133–8.
 69. Aldaz Cárdenas I JW, García-Díaz II JR. Perfil hematológico y bioquímico de perros infectados experimentalmente con diferentes variantes de Parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) en la provincia Bolívar, Ecuador. *Rev Salud Anim.* 2015;37(3):173–82.
 70. Steinel A, Munson L, Van Vuuren M, Truyen U. Genetic characterization of Feline parvovirus sequences from various carnivores. *J Gen Virol.* 2000;81(2):345–50.
 71. Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, Sato E, Kawakami K, Miyazawa T, et al. Pathogenic potential of Canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Vaccine Immunol.* 2002;8(3):663–8.
 72. Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, et al. Characterisation of Canine parvovirus strains isolated from cats with



- feline panleukopenia. *Res Vet Sci.* 2010;89(2):275–8.
73. Decaro N, Desario C, Amorisco F, Losurdo M, Colaianni ML, Greco MF, et al. Canine parvovirus type 2c infection in a kitten associated with intracranial abscess and convulsions. *J Feline Med Surg.* 2011;13(4):231–6.
74. Truyen U. Evolution of canine parvovirus-A need for new vaccines? *Vet Microbiol.* 2006;117(1):9–13.
75. Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WSK, Tarpey I. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 2008;128(1–2):48–55.
76. Siedek E, Schmidt H, Sture G, Raue R. Vaccination with canine parvovirus type 2 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2011;124:58–64.
77. Wilson S, Illambas J, Siedek E, Stirling C, Thomas A, Plevová E, et al. Vaccination of dogs with Canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine.* 2014;32(42):5420–4.
78. Glover S, Anderson C, Piontkowski M, Ng T. Canine parvovirus (CPV) type 2b vaccine protects puppies with maternal antibodies to CPV when challenged with virulent CPV-2c virus. *Int J Appl Res Vet Med.* 2012;10(3):217–24.
79. Altman KD, Kelman M, Ward MP. Are vaccine strain, type or administration protocol risk factors for Canine parvovirus vaccine failure? *Vet Microbiol.* 2017;210(April):8–16.
80. Puentes R, Eliopulos N, Finger P, Castro C, Nunes C, Furtado A, et al. Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus



- canino. *Veterinaria*. 2010;46(177-178-179-180):47-9.
81. Desario C, Decaro N, Campolo M, Cavalli A, Cirone F, Elia G, et al. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *J Virol Methods*. 2005;126(1-2):179-85.
 82. Schmitz S, Coenen C, König M, Thiel H-J, Neiger R. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagnostic Investig*. 2009;101:344-5.
 83. Aguilar M. Análisis de la sensibilidad de métodos diagnósticos comúnmente utilizados en hospitales veterinarios para el diagnóstico de Parvovirus canino. Universidad Autónoma del Estado de México; 2014.
 84. Decaro N, Desario C, Elia G, Campolo M, Lorusso A, Mari V, et al. Occurrence of severe gastroenteritis in pups after Canine parvovirus vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*. 2007;25(7):1161-6.
 85. Kapil S, Cooper E, Lamm C, Murray B, Rezabek G, Johnston L, et al. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):4044-7.
 86. Mauro LD. Claves para comprender a la Parvovirosis canina producida por la variante CPV-2c. *Rev Electron Vet*. 2015;16(2):1555-60.
 87. Decaro N, Desario C, Beall MJ, Cavalli A, Campolo M, DiMarco AA, et al. Detection of Canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet J*. 2010;184(3):373-5.
 88. Ariza S, Fuentes D, Vera VJ, Villamil LC, Ramírez GC. Aglutinación en látex, ELISA y hemoaglutinación: Alternativas para el diagnóstico de la



- Parvovirus canina en heces. *Rev la Fac Med Vet y Zootec.* 2005;52(1):5–11.
89. Decaro N, Elia G, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, et al. New approaches for the molecular characterization of Canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med Ser B Infect Dis Vet Public Heal.* 2005;52(7–8):316–9.
90. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990;262(4):56–65.
91. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig en Discapac.* 2013;2(2):70–8.
92. Joshi M, Deshpande JD. Polymerase chain reaction : Methods, principles and application. *Int J Biomed Res.* 2010;1(5):81–97.
93. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol.* 1971;56(2):341–61.
94. Erlich HA. Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press; 1989. 246 p.
95. Lee PY, Costumbrado J, Hsu C-Y, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 2012;(62):1–5.
96. García-Sancho M. Frederick Sanger: el hombre que convirtió los genes en secuencias. Edimburgo: SEBBM; 2014. p. 10–1.
97. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016;107(1):1–8.
98. Martín I, García T, Fajardo V, Rojas M, Hernández PE, González I, et al.



- Technical Note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *J Anim Sci.* 2007;85(10):2734–9.
99. Lindquist CD, Wictum EJ. Less is more - optimization of DNA extraction from canine feces. *J Forensic Sci.* 2016;61(1):212–8.
 100. Zhang BW, Li M, Ma LC, Wei FW. A widely applicable protocol for DNA isolation from fecal samples. *Biochem Genet.* 2006;44(11–12):494–503.
 101. Rådström P, Knutsson R, Wolffs P, Dahlenborg M, Löfström C. Pre-PCR processing of samples. *Methods Mol Biol.* 2003;216:31–50.
 102. Kalli I, Leontides L, Mylonakis M, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas A. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci.* 2010;89(2):174-178 p.
 103. Castro TX, Miranda SC, Labarthe NV, Silva LE, Cubel García RCN. Clinical and Epidemiological aspects of canine parvovirus (CPV) enteritis in the State of Rio de Janeiro: 1995-2004. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2007;59(2): 333-339.
 104. Zhou P, Zeng W, Zhang X, Li S. The genetic evolution of Canine parvovirus – A new perspective. Cao Y, editor. *PLoS One.* 2017 Mar 31;12(3):1–13.
 105. Pedroza-Roldán C, Páez-Magallan V, Charles-Niño C, Elizondo-Quiroga D, Leonel De Cervantes-Mireles R, López-Amezcu MA. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagnostic Investig.* 2015;27(1):107–11.
 106. Pinto LD, Streck AF, Gonçalves KR, Souza CK, Corbellini ÂO, Corbellini LG, et al. Typing of Canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010. *Virus Res.* 2012;165(1):29–33.



107. Gallo M, Mattion N, Bucafusco D, Fogel F, Remorini P, La Torre J. Molecular characterization of Canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *J Virol Methods*. 2009;159(2):141–5.
108. Calderón MG, Romanutti C, Wilda M, D'Antuono A, Keller L, Giacomodonato MN, et al. Resurgence of Canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina. *J Virol Methods*. 2015;222:145–9.
109. Duque-García Y, Echeverri-Zuluaga M, Trejos-Suarez J, Ruiz-Saenz J. Prevalence and molecular epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging? *Vet Microbiol*. 2017;201:56–61.
110. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, et al. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with Canine parvovirus type 2c. *New Microbiol*. 2008;31(1):125–30.
111. Castro TX, Costa EM, Leite JP, Labarthe N V., Cubel Garcia RCN. Monitoring of Canine parvovirus (CPV) strains detected in vaccinated puppies in Brazil. *Res Vet Sci*. 2011;90(2):336–40.

8. ANEXOS

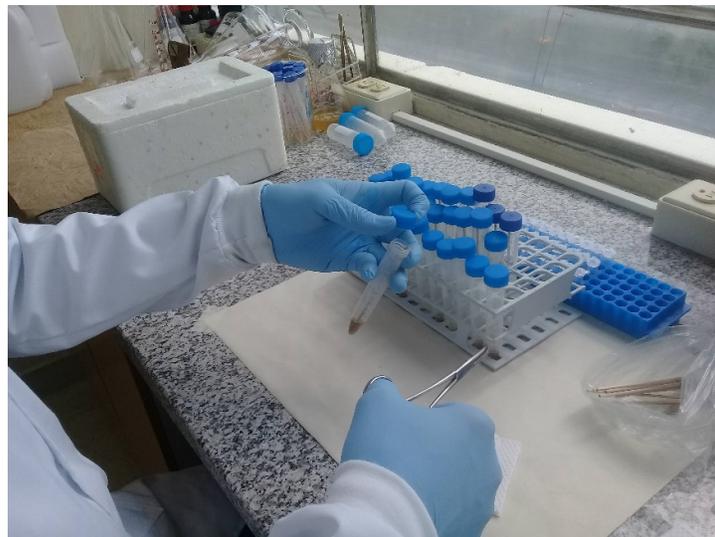
Anexo 1.

Figura 7: Recolección de material fecal.



Anexo 2.

Figura 8: Proceso de extracción del material genético.



Anexo 3.

Figura 9: Adición de solución buffer de carga de ADN 6X en las muestras después de realizado el PCR.



Anexo 4.

Figura 10: Colocación de las muestras en el equipo de electroforesis.





Anexo 5.

Figura 11: Ejemplo de formato de la historia clínica.



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIDAD DE TITULACIÓN

Tesis: "Caracterización de cepas de parvovirus canino tipo 2, mediante la técnica de PCR en perros de la ciudad de Cuenca"

Datos Clínicos:

Numero de muestra: # _____ Raza: _____
Nombre del paciente: _____ Edad: _____
Sexo: _____
Estado vacunal: _____

Anorexia: Temperatura: _____ °C
Vomito: Disenteria:
Diarrea Mucoide:
Estado mental: Normal Deprimido Estuporoso Comatoso

HEMOGRAMA:

Análito	Resultado	Unidad
Eritrocitos		
Hemoglobina		
Hematocrito		
VCM		
MCHC		
Plaquetas		
Leucocitos		
Neutrófilos		
Basófilos		
Eosinófilos		
Linfocitos		
Proteínas totales		

Observaciones adicionales: _____

Anexo 6:
Tabla 8: Datos de cada una de las variables o descriptores de cada uno de los animales incluidos en el estudio.

Número	Edad (Meses)	Raza	Sexo	Estado vacunal	Temperatura (°C)	E.M	Anorexia	Emesis	Diarrea	C.P.	D. CPV	Secuenciación		
												CPV-2a	CPV-2b	CPV-2c
1	4	Mestizo	M	Ninguna	38,2	D	+	+	D.S	+	+			+
2	5	Schnauzer	H	Desconocido	38,4	D	+	+	-	+	+			
3	2	Schnauzer	M	Desconocido	37,8	D	+	+	D.S	+	+			
4	2	Schnauzer	M	Ninguna	38	E	+	+	D.S	-				
5	3	Shitzu	H	Desconocido	35,2	D	+	+	D.S	+	+		+	
6	2	Husky	M	Una	39,7	D	+	+	D.S	+	+			
7	6	Mestizo	M	Ninguna	39,2	N	+	+	D.M	-				
8	4	Pitbull	M	Una	39,9	N	+	+	D.M	+	+		+	
9	2	French Poodle	M	Ninguna	38	N	+	+	-	+	+			
10	2	Chihuahua	M	Una	37,9	N	-	+	D.M	+	+			
11	2	Chihuahua	H	Una	38,7	N	-	+	D.M	-				
12	2	French Poodle	M	Ninguna	34	E	+	+	D.M	+	+			
13	4	Husky	M	Una	38,6	N	+	+	D.S	+	+			
14	3	Border Collie	M	Una	38,9	D	+	-	D.M	+	+			
15	2	French Poodle	H	Una	38,6	N	+	+	D.M	+	+			
16	8	Bull dog frances	M	Tres	37,8	N	+	+	D.S	+	+		+	
17	2	Golden Retriever	M	Dos	38,3	D	-	+	D.S	-				
18	2	Husky	M	Dos	38,6	D	+	+	D.S	+	-			
19	5	Mestizo	M	Dos	38,6	D	+	+	-	+	+			
20	12	Mestizo	M	Ninguna	37,8	D	-	+	D.M	+	+			
21	2	Shitzu	H	Una	38,7	D	+	+	D.M	-				
22	2	Cocker	M	Una	38	D	-	+	D.S	+	+			+
23	3	Pincher	M	Desconocido	36,5	N	+	-	D.S	+	+			
24	3	Pitbull	M	Una	38,8	D	-	+	D.S	+	+			+
25	2	Cocker	M	Ninguna	37,4	D	+	+	D.M	-				
26	7	Braco aleman	M	Completas	39,8	N	+	+	D.S	+	+			+
27	2	Samoyedo	M	Desconocido	37,2	D	+	+	D.M	+	+			
28	2	Husky	M	Una	38,7	N	+	+	D.M	+	+			+
29	7	Mestizo	H	Una	39,2	N	+	+	D.S	+	+			+
30	6	Pomeranio	H	Completas	38,7	D	+	+	D.S	-				



31	3	Labrador	M Ninguna	37,7	N	+	+	D.M	-			
32	2	Bull dog frances	M Una	38,2	D	+	+	D.S	+	+		
33	2	Bull dog frances	M Una	38,7	N	+	+	D.S	+	-		
34	2	Bull dog frances	M Una	38,7	N	+	+	D.S	+	+		
35	2	Bull dog frances	H Una	38,5	N	+	+	D.S	+	+	+	
36	2	Mestizo	H Ninguna	38	N	-	-	D.M	+	+		+
37	2	shitzu	H Ninguna	37	D	+	+	D.M	+	+		
38	2	Husky	M Ninguna	38,3	D	+	+	D.S	+	+		
39	14	Labrador	M Una	37,2	N	-	+	D.S	-			
40	2	Mestizo	H Ninguna	38,2	D	-	+	D.M	+	+		
41	11	Bull terrier	M Completas	39,5	D	-	+	D.M	+	+	+	
42	3	Basset hound	M Ninguna	38,1	D	+	+	D.M	-			
43	4	French Poodle	H Ninguna	38,2	D	+	+	-	+	+	+	
44	8	Mestizo	H Una	39,3	D	+	+	D.S	+	+		+
45	2	French Poodle	M Ninguna	38,6	N	+	-	D.M	-			
46	2,5	Mestizo	H Ninguna	37,2	N	+	+	-	+	+		
47	3	Mestizo	H Ninguna	38,2	N	-	-	D.M	+	+		
48	3	Mestizo	H Ninguna	38,5	N	-	-	D.M	+	+		
49	2,5	Pequines	M Ninguna	38,7	D	+	-	D.M	-			
50	2,5	Pequines	H Ninguna	38,5	D	+	-	D.M	+	+		+
51	2,5	Pequines	H Ninguna	37,4	D	+	-	D.M	+	+		
52	2,5	Mestizo	H Una	38,5	D	+	-	D.M	+	+	+	
53	2,5	Mestizo	M Una	37,5	D	+	-	D.M	+	+		
54	2	Pastor Aleman	M Ninguna	38	D	+	+	D.M	+	+		
55	2	French Poodle	M Ninguna	39,2	N	-	+	D.S	+	+		
56	3	Mestizo	M Una	38,6	N	-	+	D.M	+	+		
57	2	Schnauzer	M Una	38,7	N	+	-	D.S	+	+		
58	3	shitzu	M Ninguna	38,2	D	+	+	D.S	+	+		+
59	2	Daschound	M Ninguna	38,9	E	+	+	D.S	+	-		
60	12	Bull dog frances	M Ninguna	36	D	+	+	D.S	+	+	+	
61	5	Pequines	H Dos	38,9	D	+	+	D.M	+	+		
62	2	French Poodle	H Una	36,2	D	+	-	D.M	-			
63	6	Mestizo	M Una	36,5	D	+	+	D.S	+	+		
64	2	Chihuahua	M Ninguna	38,5	N	-	-	D.S	+	+		
65	4	American bully	M Tres	37,8	D	+	+	D.M	+	+	+	
66	5	Mestizo	M Ninguna	37,5	D	+	+	D.S	+	-		
67	3	Pitbull	H Ninguna	38	D	+	-	D.M	+	+	+	
68	7	Mestizo	H Una	40	D	+	+	D.M	-			
69	4	Mestizo	M Ninguna	38,1	N	+	+	D.S	+	+		+
70	8	Schnauzer	M Una	38,2	N	+	+	D.M	+	+		
71	8	Mestizo	M Desconocido	36,2	E	+	+	D.S	+	+		
72	4	Husky	H Una	39,8	N	-	+	D.S	+	+		
73	4	Mestizo	H Ninguna	39,3	N	+	+	D.S	+	+		
74	5	Mestizo	M Ninguna	38,9	D	+	+	-	-			
75	10	Rottweiler	M Una	39	D	+	+	D.S	+	+		



76	8	Mestizo	M Ninguna	38,9	D	+	+	D.M	+	+								
77	2	Husky	M Una	39,2	N	+	+	D.S	-									
78	3	Pitbull	M Una	37	D	-	+	D.S	+	+								
79	3	Mestizo	H Desconocido	38,4	N	-	+	D.S	+	+								
80	2	Mestizo	H Una	37,8	D	-	+	D.S	+	+								
											61	65		64	60	10	3	8

Sexo: **M:**Macho, **H:** Hembra

E.M: Estado mental: **N:** Normal, **D:** Deprimido, **E :**Estuporoso

Diarrea: **D.S.:** Diarrea sanguinolenta, **D.M.:** Diarrea mucoide

C.P.: Control de Proceso

D. CPV: Diagnóstico de Parvovirus canino



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEJAMOS CONSTANCIA DE HABER RECIBIDO LA TESIS DE GRADO DE LA EGRESADA

VERONICA CLAVIJO IZQUIERDO

MISMA QUE HA SIDO REVISADA Y CORREGIDA PARA CONTINUAR CON LOS TRÁMITES DE GRADUACIÓN.

Cuenca, 12 de diciembre de 2019

Dr. Omar Andrade

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Fredi Carpio

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Juan Ramones

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Dr. Antonio Vallecillo

DIRECTOR DE TESIS

