



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias
Maestría en Medicina Canina y Felina

Evaluación de la aplicación de un ensayo LAMP para el diagnóstico de
Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en heces.

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Magíster
en Medicina Canina y Felina

Autora:

M.V.Z. Paola Gabriela Alvarado Dávila.

CI: 010708952- 6

Correo electrónico: pauly_2122@hotmail.com

Director:

Dr. Teófilo Estuardo Palacios Ordóñez Mgt.

CI: 010133057- 9

Cuenca, Ecuador

29-septiembre-2021



Resumen:

El Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) causa una enfermedad infecto transmisible, principal causante de diarrea sanguinolenta en cachorros desde los 2 hasta 6 meses de edad, se la conoce también como enteritis viral canina y es producida por un virus de ADN de la familia Parvoviridae, del género Parvovirus, los signos clínicos más comunes son: anorexia, letargia, fiebre, vómitos, diarrea y deshidratación. Su diagnóstico se la realiza por medio de una prueba de inmunocromatografía para la detección de antígeno de CPV-2, dicha prueba puede ser negativa si el análisis se realiza muy pronto en el curso clínico de la enfermedad, otra prueba utilizada es LAMP, que se trata de un método único de amplificación de genes. El objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de material genético de CPV-2 aplicando la técnica de diagnóstico de LAMP y la prueba de inmunocromatografía en hisopados de heces de perros que presentaron signos clínicos compatibles con parvovirus canina. Los resultados con la prueba de inmunocromatografía dio que 8 de las 62 muestras fueron positivas a CPV-2 ADN, mientras que en el ensayo LAMP, 32 fueron positivas a CPV-2 ADN de un total de 62 muestras analizadas; la sensibilidad diagnóstica del ensayo LAMP fue del 62.5%, mientras que la especificidad fue de un 50%.

Palabras claves: Parvovirus canino. Test de inmunocromatografía. LAMP. Heces perros.



Abstract:

Canine parvovirus type 2 or (CPV-2) is a contagious infectious disease, the main cause of bloody diarrhea in puppies from 2 to 6 months of age, it is also known as canine viral enteritis and is produced by a DNA virus of In the family Parvoviridae, of the genus Parvovirus, the most common clinical signs are: anorexia, lethargy, fever, vomiting, diarrhea and dehydration. Its diagnosis is made by means of an immunochromatography test for the detection of CPV-2 antigen, said test can be negative if the analysis is performed very early in the clinical course of the disease, another test used is LAMP, which is It is a unique method of gene amplification. The objective of this research was to identify the presence of CPV-2 genetic material by applying the LAMP diagnostic technique and the immunochromatography test on swabs of stool from dogs that presented clinical signs compatible with canine parvovirus. The results with the immunochromatography test showed that 8 of the 62 samples were positive for CPV-2 DNA, while in the LAMP test, 32 were positive for CPV-2 DNA out of a total of 62 samples analyzed; the sensitivity of the LAMP assay was 62.5%, while the specificity was 50%.

Keywords: Canine parvovirus. Immunochromatography test. LAMP. Dog feces.



Índice del Trabajo

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
DEDICATORIA	10
AGRADECIMIENTOS	11
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA.....	12
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	13
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GENERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPÍTULO III: PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	16
CAPÍTULO IV: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	17
4. PARVOVIRUS CANINO.....	17
4.1 Historia.	17
4.2 Taxonomía.....	17
4.3 Estructura.	18
4.4 Evolución genética.....	19
4.5 Interacción virus-hospedador.....	20
4.6 Animales susceptibles.....	23
4.7 Factores de riesgo	24
4.8 Signos clínicos.....	25
4.9 Diagnóstico	26
4.10 Tratamiento.....	29
4.11 Vacunación	30
4.12 Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas.....	31
CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Materiales para la toma de muestra de heces para la aplicación del test de inmunocromatografía diagnóstica para CPV-2 (Actividad experimental número 1).	34



5.2 Métodos para la aplicación del test de inmunocromatografía diagnóstica para CPV – 2 (Actividad experimental número 1).	35
5.2.1 Interpretación de la prueba de inmunocromatografía	35
5.3 Materiales para la extracción y purificación de ADN de la vacuna de CPV-2 que fue usada como control positivo.	36
5.4 Métodos para la extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico de la vacuna Puppy DP que se usó como control positivo para el ensayo LAMP.	37
5.5 Materiales para la toma, transporte, almacenamiento y purificación de las muestras para el ensayo LAMP (Actividad experimental número 2).	38
5.6 Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de (CPV-2 y la especie animal de estudio para el ensayo de LAMP.	39
5.7 Materiales para la amplificación del ADN de CPV-2 mediante el ensayo LAMP.	40
5.8 Métodos para la amplificación de la prueba control mediante el ensayo LAMP.	41
5.9 Materiales para la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.	42
5.10 Método de detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel al 1.5% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.	43
CAPÍTULO VI: RESULTADOS.....	47
CAPÍTULO VII: CONCLUSION	53
CAPÍTULO IV: RECOMENDACIONES	53
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	54
Anexo 1. Ficha clínica de campo.	60
Examen físico:	62
Anexo 2. Parámetros normales de las constantes fisiológicas del perro.	62
Anexo 3 Fotografías.....	63
Anexo 4. Cálculo de las variables de rendimiento diagnóstico en perros con CPV-2 del ensayo LAMP para la detección de material genético de CPV-2 en muestras de heces de perros.	72



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases consecutivas del proceso de validacion de un ensayo.	33
Figura 2. Actividades realizadas dentro de la estrategia de trabajo que se siguió para determinar la presencia de ADNde CPV-2 en heces de perros con siignoloigía clínica.	34
Figura 3. Pasos para validar el ensayo LAMP.	45
Figura 4. Porcentaje de pruebas positivas y negativas según el tipo de prueba utilizada.....	47



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Premezcla utilizada para el ensayo LAMP para detección de ADN.....	41
Tabla 2. Tiempo y temperatura de desnaturalización del ADN.....	42
Tabla 3. Cantidad de enzima utilizada por reaccion para la amplificación del ADN.....	40
Tabla 4. Extension e inactivacion de la mezcla en el termociclador.....	42
Tabla 5. Tabla de contingencia que expresa el número y porcentaje de casos positivos, casos negativos, la sensibilidad y especificidad diagnóstica con el ensayo LAMP, en comparación con la prueba de inmunocromatografía.....	48
Tabla 6. Sensibilidad y especificidad de la prueba LAMP para detectar ADN de CPV-2 en heces de perros con intervalos de confianza del 95%.....	49



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Paola Gabriela Alvarado Dávila en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo LAMP para el diagnóstico de Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en heces", 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, 29 de septiembre de 2021

Paola Gabriela Alvarado Dávila

C.I: 0107089526



Cláusula de Propiedad Intelectual

Paola Gabriela Alvarado Dávila, autor/a del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de un ensayo LAMP para el diagnóstico de Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en heces", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29 de septiembre de 2021



Paola Gabriela Alvarado Dávila

C.I: 0107089526



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de titulación primero a Dios, por todas las bendiciones que me ha vertido sobre mi ser, dándome inteligencia y las capacidades cognitivas para poder llegar un paso más adelante dentro de mi vida profesional, también dedico este trabajo de titulación a mi madre, por ayudarme en cada etapa de mi vida, por ser incondicional y por la paciencia con la que ha forjado en mi la responsabilidad.



AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios por darme vida y la capacidad intelectual para poder desarrollar este trabajo de investigación.

A mi madre por todo el apoyo recibido durante toda mi vida y en especial en los momentos más duros de mi carrera profesional.

A mi director de tesis, Dr. Estuardo Palacios por todo el conocimiento impartido para que este trabajo de investigación sea de gran aporte para la comunidad veterinaria.

Al Dr. Antonio Vallecillo por la dedicación, entrega y el aporte científico que me ha brindado durante todos los meses que nos ha tomado el desarrollo de la parte práctica de la presente investigación.

A mi hermana Lorena, por ser un ejemplo de valentía y perseverancia.

A mis sobrinos, por enseñarme lo hermoso que es la vida, por la ternura y el amor que me han dado desde el primer día de su existencia.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

Ala: Alanina.

ADN: Acido desoxirribonucleico.

Asn: Asparagina.

Asp: Aspartato.

CPV: Parvovirus canino.

CVP- 2: Parvovirus canino tipo 2.

FEC- G: Factor estimulante de colonias de granulocitos humano.

FPV: Panleucopenia viral felina.

Gly: Glicina.

GTPasa: Guanosina trifosfatasa.

ICTV: International Committee on Taxonomy of virus.

Ile: Isoleucina.

Leu: Leucina.

Lys: Lisina.

Met: Metionina.

Ser: Serotonina.

TfR: Tranferrina- Receptor.

Thr: Treonina.

Val: Valina.

TICD: Dosis infecciosa para cultivo de tejido.



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Hoy en día, el perro se ha vuelto un compañero inseparable para el hombre, por ello es importante estudiar las diversas enfermedades infecciosas que son relevantes en sus vidas, entre las enfermedades virales predominantes se encuentran la infección por Parvovirus canino (CPV-2) (Mokhtari, Farmani, & Rajabi, 2018), que se transmite comúnmente por vía fecal – oral, aunque también por la vía fecal – nasal (Tabor, 2011).

El virus causal de esta infección está clasificado en la familia Parvoviridae, caracterizado por su tamaño pequeño, sin envoltura y de genoma ADN (Ácido desoxirribonucleico) de cadena sencilla (Flores, 1987). 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 CPV-2. Hoy en día han sido reconocidas 3 variantes antigénicas (CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c) que han reemplazado en su totalidad a la cepa original CPV-2, demostrando su adaptación al hospedador en un tiempo corto desde su aparición (Goddard, Leisewitz, 2010).

Los perros que no han sido vacunados frente a CPV-2 tienen el riesgo de contraer la infección; sin embargo, en los cachorros aumenta el riesgo de adquirirla entre el destete y los seis primeros meses de vida, por ello es necesario un diagnóstico temprano y rápido para poder aislar a los perros infectados y con ello evitar la propagación de la enfermedad y también para administrar un tratamiento de apoyo para reducir la morbilidad y la mortalidad (Mukhopadhyay, Amsaveni, Matta, Thanislass, Pillai, 2012).



Es difícil diagnosticar la infección por CPV-2 a partir de los signos clínicos típicos ya que son comunes a las otras enfermedades. Existen algunos métodos convencionales utilizados que incluyen microscopía electrónica, aislamiento del virus, aglutinación de látex, hemaglutinación y el ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA). Sin embargo, la especificidad y sensibilidad diagnóstica no están claramente descritas (Sun, Yen, Tu, 2013). La prueba LAMP (Amplificación isotérmica mediada por bucle) es una técnica nueva, sensible para la detección de ADN genómico, el producto final es ADN además de un subproducto a base de Pirofosfato de Magnesio visible en electroforesis en gel. En el mercado existen kits de diagnóstico rápido de antígenos de CPV-2 en hisopados de heces, sin embargo, en la práctica de la medicina veterinaria diaria no existe evidencia sobre la especificidad y sensibilidad diagnóstica de dichas pruebas, razón por la cual se requiere de estudios que diagnostiquen la enfermedad en periodos más tempranos para actuar de manera eficaz en la aplicación de terapias de soporte disminuyendo la tasa de mortalidad.



CAPÍTULO II: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad diagnóstica de la prueba de LAMP para la detección de ADN viral del CPV-2 en perros de dos a seis meses de edad diagnosticados con la enfermedad mediante inmunocromatografía en hisopados de heces en perros.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar casos positivos de infección por CPV-2 en perros de dos a seis meses de edad con signos clínicos compatibles con la enfermedad, diagnosticados mediante inmunocromatografía en hisopados de heces.
- Identificar la presencia de material genético (ADN) de CPV-2 mediante un ensayo de LAMP en hisopados de heces con signos clínicos compatibles con parvovirus canina.
- Establecer las variables de rendimiento diagnóstico en perros con CPV-2 del ensayo LAMP para la detección del material genético de CPV-2 en muestras de heces de perros.



CAPÍTULO III: PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe coincidencia de la capacidad diagnóstica para la detección de material genético viral del CPV-2 en hisopados de heces mediante el ensayo de LAMP frente a la prueba comercial de inmunocromatografía empleada para la detección de antígeno viral?



CAPÍTULO IV: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4. PARVOVIRUS CANINO

El CPV-2 constituye a nivel mundial una de las principales causas de diarrea sanguinolenta en el perro (Cárdenas, García, Quiñonez, 2015), esta enfermedad afecta a perros jóvenes, sin distinción de sexo a partir de las seis semanas de edad al perder la inmunidad maternal (Durán, 2018).

4.1 Historia.

El virus causante de la parvovirus canina se descubrió en los años 70 como una variante del virus de la Panleucopenia viral felina (FPV) (Díaz, Correa, Vera, 2008), El CPV-2 surgió a comienzos del año de 1978, diferentes clínicos de varias partes del mundo observaron de manera simultánea un gran brote de gastroenteritis severa entre grupos de perros presentándose en camadas completas e incluso colonias (Carmichael, 2005), los primeros estudios que se realizaron para determinar la causa del brote concluyeron que esta nueva enfermedad era muy parecida a la FPV debido a los hallazgos realizados en la necropsia de varios animales infectados, junto a la signología clínica que mostraban (Kelly, 1978), al inicio el virus se identificó como la variante CPV-2, para distinguirlo del virus no relacionado con problemas entéricos CPV-1 (Díaz, Correa, Vera, 2008).

4.2 Taxonomía.

La familia Parvoviridae comprende dos subfamilias, Parvovirinae que infecta a vertebrados y Densovirinae, que afecta a insectos, las dos últimas actualizaciones propuestas por el ICTV, ampliaron la subfamilia Parvovirinae a 8 géneros: Amdoparvovirus, Aveparvovirus, Bocaparvovirus, Copiparvovirus,



Dependoparvovirus, Eritroparvovirus, Protoparvovirus (dentro del cual se encuentra el Parvovirus canino CPV-2), Tetraparvovirus (Cotmore et al., 2014).

4.3 Estructura.

Los parvovirus son de tamaño pequeño con un diámetro aproximado de 25 nm, (Díaz et al., 2008) tiene un genoma de ADN monocatenario con una longitud de aproximadamente 5.200 nucleótidos y expresa 2 proteínas estructurales (VP1 y VP2) y 2 no estructurales (NS1 y NS2) (Parthiban et al., 2012). De las proteínas expresadas existe una que codifica las proteínas no estructurales las NS1 y NS2 respectivamente, y la otra proteína expresada codifica las proteínas de la cápside VP1 y VP2 en donde VP2 es la principal proteína de la cápside, y altamente antigénica, desempeñando papeles importantes en la determinación de virus, intervalo de hospederos y tropismos de tejido (Pérez, Bianchi, Calleros, Francia, Hernández, Maya, 2012).

La cápside contiene 60 copias de la combinación de las proteínas VP1 y VP2, más una tercera (VP3) que es el resultado de la escisión de VP2 por la acción de las proteasas del hospedadero, por ello está presente en viriones completos que contienen ADN del individuo afectado (Xu et al., 2015). La proteína VP2 es la encargada de permitir el ingreso del virus en el interior de la célula gracias a la interacción con el Receptor celular de la transferrina (TfR); además, si se producen leves cambios en su secuencia de aminoácidos puede variar el grado de afinidad por el receptor celular, y por lo tanto se alteraría la capacidad infectiva y el intervalo del hospedero del virus, por ello, las mutaciones que afectan a la VP2 son las responsables de la evolución de diferentes variantes antigénicas y el conocimiento



de estas mutaciones podrían ser de gran ayuda para identificar las cepas emergentes de CPV-2 en un área geográfica determinada (Brito, 2017), siendo esta proteína el lugar en donde están dos epítomos antigénicos (A y B) (Reed, Jones, & Miller, 1988). La proteína VP1 se encarga del control del transporte nuclear, tanto la proteína VP1 como la VP2 cuentan con epítomos antigénicos importantes para la neutralización por anticuerpos. NS1 es una fosfoproteína nuclear pleiotrópica que durante el proceso de replicación del ADN es la encargada de reconocer, unir y cortar el mismo, además de que regula la expresión génica y la organización del ADN en el interior de la cápside, y también actúa controlando el proceso de apoptosis celular una vez terminada la infección viral. NS2 se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma, y su función consiste tanto en el ensamblaje como en la regulación de la expresión génica (Brito, 2017).

4.4 Evolución genética.

El CPV-2 ha evolucionado con rapidez (Angulo, 2013), para esto necesitó 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 sirve como receptor de CPV-2 (Díaz et al., 2008). La secuencia del CPV-2 se diferencia de FPV en 17 nucleótidos distribuidos por todo el genoma, pero el mayor número de cambios se concentra en la región codificante de la VP2 (Hueffer et. al., 2003) que sustituyó en el residuo de Lys por Asn y en el residuo de Asp por Asn, que fueron claves para introducir en el intervalo de hospedadores a los caninos y adicionalmente un intervalo de pH para hemoaglutinar y un epítomo específico para CPV-2 (Horiuchi, Goto, Ishiguro, & Shinagawa, 1994).



Se consideraba que los aislamientos de CPV-2 no eran capaces de replicarse en los gatos pero un año después de su aparición, surgió una nueva variante (Hueffer, et al., 2003) la CPV-2a (Díaz, et al., 2008) que contiene seis mutaciones en la secuencia de la VP2, en el residuo Met87 pasó a Leu, el Ile101 a Thr, el de Val103 a Ala, el de Ala300 a Gly, el de Asp305 a Tyr y el de Val55 a Ile, y existe la evidencia de que esta cepa posee mayor capacidad para infectar células caninas que su predecesora, el CPV-2 (Hueffer & Parrish, 2003), lo cual ocasionó una rápida pandemia de la cual se conocen los subtipos CPV-2a y CPV-2b (Asn426 Asp y Ile555 – Val) (Decaro, et al., (2006), que han sido identificados por anticuerpos monoclonales y presentan pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos de las proteínas virales. Actualmente se ha identificado una tercera variante (CPV-2c) en Italia, Reino Unido, Alemania, Indonesia, Malasia, Uruguay y Argentina; y Ecuador y, en Colombia la enfermedad fue identificada por primera vez en 1982 con una alta morbilidad y mortalidad en cachorros (Díaz et al., 2008). En las últimas décadas se ha producido cambios en el residuo 297 (Ser a Ala) tanto en CPV-2a como en CPV-2c estas cepas a menudo se designan como variantes nuevas (Ohshimab et al., 2008).

4.5 Interacción virus-hospedador

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. Algunas 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 (Cureton



Harbison, Cocucci, Parrish, & Kirchhausen, 2012). 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 (Smith & Helenius, 2004). 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 ensamblaje del virus para liberar su material genético y poder replicarse (Palermo, Hafenstein, & Parrish, 2006).

El CPV-2 se propaga rápidamente entre los perros a través de la ruta fecal-oral (transmisión directa) o a través de la exposición oro-nasal a fómites contaminados por heces (transmisión indirecta) (Durán, 2018) ingresa a la célula y comienza por la unión a los TfR celular tipo I (que facilita el ingreso de Hierro a la célula al unir e internalizar la transferrina cargada con Hierro) y el transporte a los endosomas de reciclaje (Suikkanen, Antila, Jaatinen, Vihinen-Ranta, & Vuento, 2003) se ha demostrado que son fundamentales las interacciones específicas entre la cápside viral y el TfR del hospedador para la infección proporcionando un control en el intervalo de hospedero al que afecta la infección viral, en el caso del CPV-2, los aminoácidos sustituidos que afectaron el intervalo del hospedador en variantes naturales o mutantes, incluyen los residuos de la proteína VP2: 93, 323, 299, y 300 (Palermo et al., 2006).

El CPV-2 se une al TfR mediante la triple espiga de la cápside (Hafenstein y otros, 2007) en la célula se internaliza el virus por endocitosis dependiente de Clatrina



(complejo proteico reclutado a la membrana plasmática por proteínas adaptadoras como el complejo AP-2, el cual estimula la formación de una malla), cuyo mecanismo forma vesículas de membrana dependientes de una serie de componentes estructurales, cuando la vesícula está formada, la fusión es controlada por GTPasa dinamina. Una vez separadas estas vesículas de la membrana plasmática, la capa que contiene claritina 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 (Gutiérrez & López, 2010).

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, debido a estas carencias los parvovirus autómonos se replican a través de un proceso modificado de replicación 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 (Hueffer et al., 2003) como resultado, estos virus son capaces de secuestrarse en las células en reposo evitando desencadenar muchas de las respuestas celulares que suelen acompañar la entrada la célula por virus de otras familias. Esto permite superar la desventaja de poseer una sola hebra



en su ADN por la capacidad de empaquetar un genoma relativamente complejo para ser importada intacta en el núcleo de la célula (Cotmore et al., 2014).

Se ha demostrado que la excreción fecal del virus se da después de tres días posteriores a la inoculación experimental, y la eliminación puede continuar por un período máximo de 3 a 4 semanas después de iniciada la enfermedad clínica o subclínica, la replicación del virus comienza en el tejido linfoide de la orofaringe, nódulos linfáticos mesentéricos y el timo, y se disemina a las criptas intestinales del intestino delgado por vía hematológica (3–4 días después infección). Se observa viremia marcada de 1 a 5 días después de la infección. Posterior a la viremia, el CPV-2 se localiza predominantemente en el revestimiento del epitelio de la lengua, la cavidad oral y el esófago; el intestino delgado, médula ósea y tejido linfoide, como el timo y nódulos linfáticos (Goddard & Leisewitz, 2010). El virus se replica en las criptas intestinales y causa pérdida de la forma en punta de la vellosidad, provocando signos como emesis, diarrea (Durán, 2018).

4.6 Animales susceptibles.

La capacidad del CPV-2 de causar enfermedad parece estar limitada a la especie canina. Existen publicaciones que fundamentan la enfermedad en el perro doméstico, coyotes y ciertas variedades de lobos (Castro, 1987). Animales de todas las edades pueden contraer la infección si no poseen inmunidad o está incompleta, sin embargo, los cachorros entre 6 semanas y 6 meses son los más susceptibles de manifestar la enfermedad clínica (Pollock, & Coyne, 1993) por ello, si la madre de los cachorros tiene anticuerpos contra el CPV-2, ya sea por infección o vacunación, sus cachorros están protegidos contra la infección por el CPV-2 durante las primeras



semanas de vida por los anticuerpos maternos. El título de anticuerpos CPV-2 transferido al neonato es del 50 al 60% del título de la madre, por lo tanto, el título de anticuerpos que logra ingerir el cachorro está determinado por el título de anticuerpos en suero de la madre al momento del parto, la cantidad de calostro ingerido y el tamaño de la camada. El anticuerpo materno contra el CPV-2 tiene una vida media de aproximadamente 10 días, a medida que disminuye este título de anticuerpos, los cachorros se vuelven susceptibles a la infección. La ventana de mayor susceptibilidad a la infección viral ocurre cuando el anticuerpo materno interfiere con la respuesta inmune a la vacuna de CPV-2 (Prittie, 2004), es raro que la enfermedad se manifieste en animales adultos porque ya están inmunizados por vacunación o infecciones subclínicas (Durán, 2018).

4.7 Factores de riesgo

A más de la edad que constituye el mayor riesgo para contraer CPV-2 en cachorros entre las seis semanas y seis meses en donde el cuadro clínico se presenta más rápidamente, existe correspondencia en los trabajos que demuestran que los perros no vacunados tuvieron más probabilidades de presentar la enfermedad que los vacunados (Cárdenas et al., 2015).

Dentro de los factores que influyen están el estrés, los parásitos y factores inespecíficos como el destete, pueden predisponer a los perros a la enfermedad clínica y al aumento de la actividad de las células mucosas. Durante el destete, los enterocitos de las criptas intestinales tienen un índice mitótico más alto debido a los cambios en la microbiota bacteriana y dieta, por lo tanto, son más susceptibles al tropismo viral por dividirse rápidamente las células (Goddard & Leisewitz, 2010).



4.8 Signos clínicos.

El virus posee gran tropismo por los tejidos con alta división mitótica, como los de la médula ósea, órganos linfoides, criptas intestinales (Decaro et al., 2007) también se encuentran en la cavidad bucal y esófago (Goddard & Leisewitz, 2010), al encontrarse dentro de las criptas intestinales, produce una enteritis profunda y consecuentemente diarrea. El período de incubación es de 3 a 14 días entre la infección inicial y la aparición de signos clínicos. Típicamente la infección por CPV-2 se da después del destete a la edad de 4 a 12 semanas, cuando los anticuerpos maternos disminuyen, sin embargo, la infección se puede ver comúnmente en cachorros de hasta 6 meses de edad. Los signos clínicos más frecuentes en algunos cachorros incluyen emesis y diarrea que puede variar de mucoide a sanguinolenta. La deshidratación y la infección secundaria se desarrollan rápidamente, la diarrea puede estar ausente en fases iniciales y puede ocurrir de 24 - 48 horas después del inicio de emesis. Los motivos de consulta pueden variar desde letargia, anorexia hasta hematemesis. Los signos clínicos pueden estar exacerbados por una infección concurrente con el Virus del moquillo o Distemper canino, Coronavirus, *Salmonella spp* canina, y bacterias del género *Campylobacter*, protozoarios como *Giardia* u otros parásitos intestinales. Clínicamente, los animales tienen leucopenia severa, con 500 a 2000 glóbulos blancos (WBC) / μ L. La linfopenia es más pronunciada que la neutropenia, la anemia puede estar presente pero no es una característica consistente de infección y la muerte puede ocurrir 24 horas después del inicio de los signos clínicos, especialmente en animales más jóvenes (Lamm & Rezabek, 2008).



Los signos clínicos compatibles con CPV-2 son: anorexia, letargia, fiebre, emesis, diarrea y deshidratación acompañados de hipotermia, ictericia y coagulación intravascular diseminada (CID); se ven típicamente en los casos graves con sepsis bacteriana o endotoxemia (Hall, Simpson & Williams, 2012).

4.9 Diagnóstico

El diagnóstico clínico de la infección por CPV-2 se basa en los antecedentes epidemiológicos, la signología clínica y en protocolos de vacunación incompletos o inexistentes (Schmitz, Coenen, König, Thiel & Neiger, 2009) y los hallazgos del examen clínico, si existe una historia de hematemesis y diarrea en un perro joven, hace que se considere la presencia de neutropenia en el hemograma, que asociada a los signos de enteritis es sugestiva de CPV- 2 (Hall et al., 2012).

La prueba de Inmunocromatografía diagnóstica para CPV-2 en heces se puede completar en pocos minutos y se lo realiza incluso si no hay diarrea, sin embargo, puede ser negativa si el análisis se realiza muy pronto en el curso clínico de la enfermedad o 10-14 días tras la infección (Hall et al., 2012). El límite de detección de los kits diagnósticos es aproximadamente de 10^3 TCID 50/ml de CPV-2 en heces caninas por lo que la aplicación de este método limita la detección temprana de la enfermedad (Cho, Kang & Young, 2006), 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 virus activo modificado por la excreción fecal del virus vacunal (Prittie, 2004).

Otras pruebas para el paciente con CPV-2 incluyen el diagnóstico por imágenes, como radiografía y ultrasonido que pueden ser útiles para eliminar otras causas de



vómitos y diarrea, y para determinar si la obstrucción intestinal o intususcepción está presente (Judge, 2015).

También se puede utilizar la evaluación mediante microscopía electrónica de las heces en busca del virus (el CPV-1 y CPV-2), inhibición de la hemoaglutinación para la IgM sérica, histopatología de las lesiones intestinales e inmunohistoquímica de las muestras de biopsia intestinal (Hall et al., 2012).

Recientemente, se ha realizado un ensayo de PCR en tiempo real, basado en la tecnología TaqMan desarrollado para la detección y cuantificación de ADN de CPV-2 en muestras fecales y se ha establecido como estándar de oro para el diagnóstico de infección por CPV-2. Hasta la fecha, un método capaz de identificar todas las variantes no está disponible y debe usarse más de un método para la caracterización de CPV-2 (Decaro et al., 2006). En un estudio realizado por (Sun, Yen & Tu, 2014) mostraron resultados en los que la combinación de 2 ensayos como PCR + ELISA podían detectar concentraciones de 10^2 TCID 50/ml.

Las pruebas de ELISA fecales son muy precisas, pero pueden dar resultados erróneos en ocasiones, por ejemplo:

- Resultados falsos positivos: donde un perro no tiene CPV-2, pero el resultado es positivo: puede ocurrir entre cinco y quince días después de una vacuna.
- Resultados falsos negativos: donde un perro tiene CPV-2, pero no da un resultado positivo, puede ocurrir si una muestra fecal se toma muy temprano en la enfermedad (dentro de uno a cuatro días de infectarse). Las pruebas que dan como resultado negativo debe ser repetidas 1 a 4 días después en individuos sospechosos de tener CPV-2 según la historia y los signos clínicos (Judge, 2015).



Por otro lado, LAMP es un método único de amplificación de ADN, en el que el ADN puede ser amplificado utilizando solo una enzima con un simple calentador, además, se aplica en una amplia gama de campos, incluida la tipificación de polimorfismos de un solo nucleótido y la cuantificación de ADN de plantilla. Se puede sintetizar una gran cantidad de ADN (10 – 30 µg/25 µl) en poco tiempo (15 – 60 min), mientras se mantiene una alta especificidad de las reacciones LAMP (Parthiban et al., 2012). Esta técnica amplifica la secuencia de ADN diana con alta selectividad; el ensayo puede completarse en 1 hora, tiene una alta sensibilidad analítica o diagnóstica y el producto final se lo puede ver a simple vista (Cho, Kang & Young, 2006). La técnica LAMP se puede usar como una potente prueba de diagnóstico de campo para la detección de CPV-2, ya que es menos sensible que la PCR a sustancias inhibitorias presentes en muestras biológicas en especial de heces. Este método se ha aplicado con éxito para la detección del Parvovirus porcino, Parvovirus del ganso, *Leptospira spp*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Dirofilaria immitis*, *Babesia canis* y muchos otros patógenos (Mukhopadhyay et al., 2012).

La técnica LAMP ofrece varias ventajas sobre los análisis de PCR para la detección de ADN de CPV-2 en heces de perros, puede amplificar algunas copias de ADN 10^9 moléculas aproximadamente en 1 hora bajo condiciones térmicas (Cho et al., 2006). En un estudio realizado por (Sun et al., 2014) se demostró que la combinación de LAMP + ELISA podía detectar un nivel de moléculas de 10^{-1} TCID 50/ml.



4.10 Tratamiento

La atención de apoyo es la piedra fundamental de la terapia para los pacientes con CPV, animales que pueden manejarse como pacientes ambulatorios son aquellos que presentan emesis y diarrea mínima y no hay otros hallazgos clínicos significativos; por lo tanto, se recomienda dar terapia de apoyo y puede ser enviado a casa. Aquellos que requieren hospitalización y terapia intensiva presentan emesis agudas y diarrea acompañada por otros signos clínicos significativos como hipertermia, dolor abdominal agudo, deshidratación, melena, depresión severa; cuando la condición del paciente empeora o si no responde a la terapia de apoyo en un día o dos, el animal debe ser hospitalizado y recibir una evaluación más completa (Pollock & Coyne, 1993).

En la actualidad si bien no existe tratamiento específico directamente frente al virus, el tratamiento gira entorno a corregir un volumen circulatorio eficaz, controlar las infecciones bacterianas secundarias y proporcionar descanso al sistema digestivo (Huertado, 2012).

El tratamiento es de soporte y similar al de otras enteropatías infecciosas agudas graves, están indicados los fluidos y los electrolitos intravenosos, con especial atención a la repleción de Potasio. La ruta intramedular puede utilizarse en cachorros muy pequeños, la vía subcutánea probablemente sea inadecuada ya que la absorción es lenta y puede tardar entre 6 a 8 horas. Se añade una solución de Glucosa (2,5 – 5%) a los fluidos si el perro esta hipoglucémico. El plasma o los coloides (Dextrano 70 o Hetastarch) están indicados si la concentración de Albúmina sérica está por debajo de 20 g/L. Se administra antibiótico a los perros



con fiebre o con neutropenia severa. Los perros en choque séptico deberían tratarse con antibióticos de amplio espectro aeróbico y anaeróbico (por ejemplo, Ampicilina junto con Amikacina). Se ha utilizado el Factor estimulante de colonias de granulocitos humano (FEC-G) a dosis de 5 ug/kg SC o IV cada 24 horas para aumentar el número de Neutrófilos, pero puede que no influya en el resultado, mientras que el Interferón omega ha demostrado algún beneficio.

Los antieméticos, como la Proclorperazina, la Metoclopramida y el Ondansetrón, están indicados si el vómito es intratable. La Metoclopramida es más efectiva si se administra en infusión continua a una dosis de 1 mg/kg cada 24 horas. Los protectores gástricos incluyendo los antagonistas de los receptores H2 y el Sucralfato están indicados si hay evidencia de esofagitis secundaria, deberían administrarse antihelmínticos de amplio espectro para tratar parásitos intestinales concurrentes cuando los perros ya no vomitan. Muchos perros pueden destetarse gradualmente implementando una dieta rica en proteína y altamente digerible. Sin embargo, la presencia de emesis intratable podría obligar a la administración de nutrición parenteral parcial o total (Hall et al., 2012).

4.11 Vacunación

La prevención más efectiva de la infección por CPV es la inmunización, que depende de la edad de inicio del calendario de vacunación para que sea más segura, el título de anticuerpos de la madre, la inmunogenicidad, el título del antígeno y de la interferencia de la vacuna con los anticuerpos maternos. Los cachorros de una perra con títulos bajos de anticuerpos, la vacunación puede ser efectiva a las 6 semanas de edad, mientras que la vacunación de cachorros de una



perra con un título alto de anticuerpos debe retrasarse porque los anticuerpos de la madre pueden persistir; si el estado inmune de los cachorros es desconocido, pueden ser vacunados con un título alto usando vacunas atenuadas, cepas activas CPV-2 a las 6, 9 y 12 semanas de edad, seguida de la revacunación anual. Los títulos de anticuerpos se pueden verificar antes de la revacunación mediante pruebas de título de anticuerpos ya que el nivel del título verifica la respuesta inmunológica a la infección, pero no garantiza la protección contra la infección (Tabor, 2011).

Hoy en día, la frecuencia de los refuerzos vacunales es controvertida y la concentración de anticuerpos en suero muestra relativamente una buena correlación entre un título de anticuerpos “positivo” y una protección contra el CPV-2. Sin embargo, la ausencia de anticuerpos no necesariamente se correlaciona con la susceptibilidad, más aún no hay pruebas estándar establecidas para medir los títulos de anticuerpos en perros y gatos (Hall et al., 2012).

4.12 Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas.

La validación consiste en la evaluación de un proceso a fin de determinar su idoneidad para un uso particular, es posible validar una prueba para uno o varios propósitos mejorando las características de su realización en cada caso.

Las variables que pueden afectar a la realización o la capacidad diagnóstica de un ensayo son:

- a. La muestra.



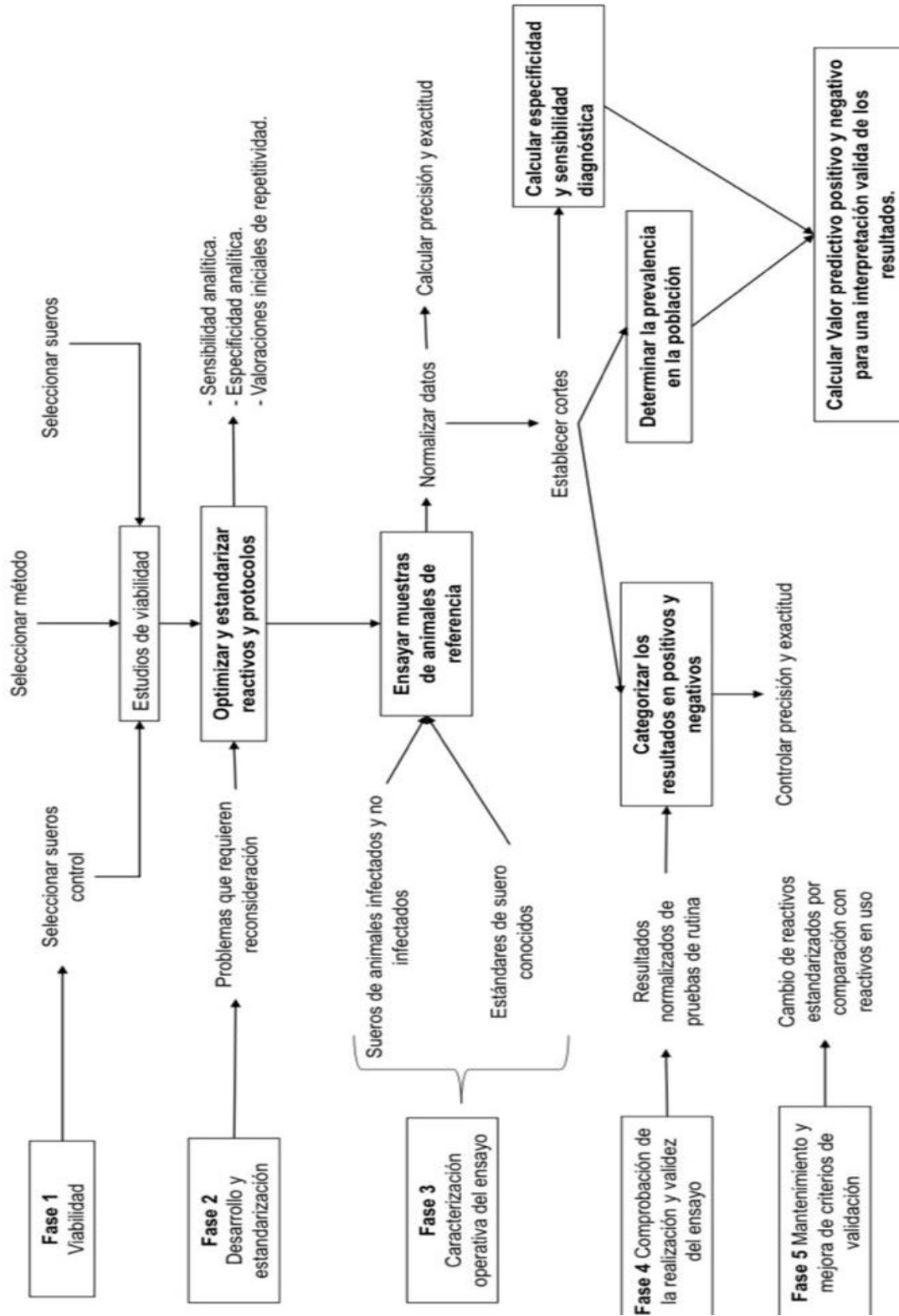
- b. El sistema de ensayo (factores físicos, químicos, biológicos y técnicos que afectan la capacidad de la prueba para detectar en la muestra un componente específico).
- c. Resultado de la prueba.

Los factores que influyen en la capacidad del resultado de una prueba para predecir de forma precisa la infección o el nivel de un componente analizado en el hospedador se encuentran descritos en la figura N° 1.

La capacidad del resultado positivo o negativo de una prueba para predecir de forma precisa el estado de un animal o población con respecto a una infección es la consideración más importante para la validación de un ensayo, esta capacidad no solo depende de un ensayo preciso y muy fiable, y de estimaciones cuidadosamente obtenidas acerca de la sensibilidad y la especificidad de diagnóstico, sino que también está influenciada por la prevalencia de la infección en la población sometida a análisis o por la probabilidad de que un animal está infectado según criterios clínicos.

Figura 1. Fases consecutivas del proceso de validación de un ensayo.

Fuente: (OIE, 2004).



CAPÍTULO V: MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se analizaron 62 muestras de heces mediante hisopado rectal de perros independientemente de su sexo y raza, de edad entre 2 y 6 meses que presentaron signos clínicos compatibles con la Parvovirus canina como: fiebre, anorexia, emesis diarrea y deshidratación en un porcentaje igual o mayor al 8%.

A continuación, se muestra un esquema del procedimiento que se llevó a cabo.

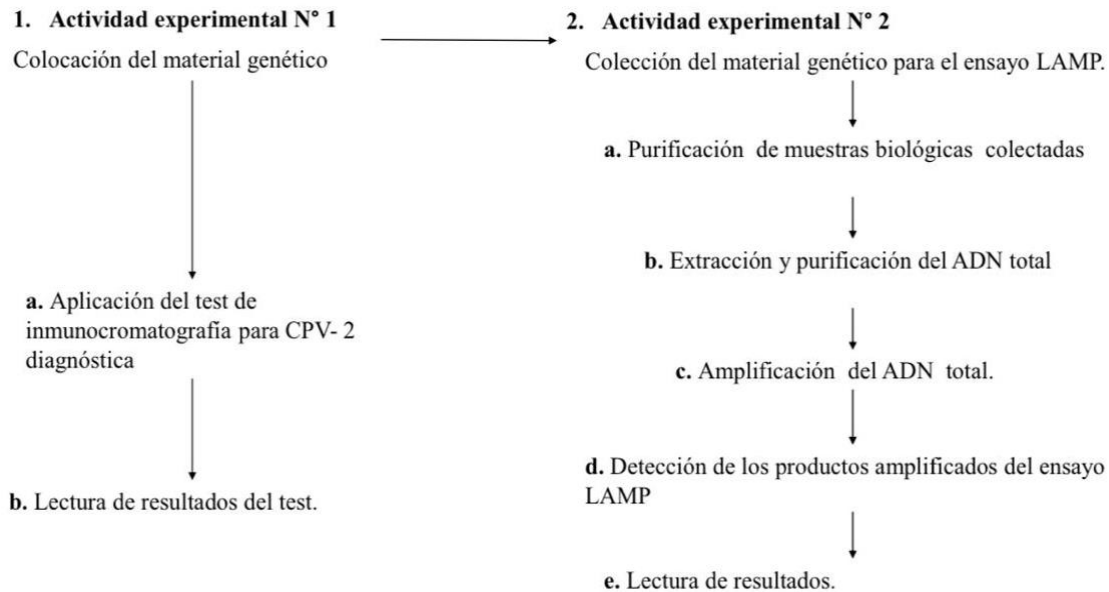


Figura 2. Actividades realizadas dentro de la estrategia de trabajo que se siguió para determinar la presencia de ADN de CPV-2 en heces de perros con signología clínica.

Fuente: Autor.

5.1. Materiales para la toma de muestra de heces para la aplicación del test de inmuncromatografía diagnóstica para CPV -2 (Actividad experimental número 1).

Biológicos:

- Heces de animales con signología clínica compatible con CPV-2.



Laboratorio:

- Test de diagnóstico por inmunocromatografía de CPV-2.

Equipos y otros materiales:

- Estetoscopio pediátrico.
- Termómetro de Mercurio
- Guantes de látex.
- Mesa de examinación.
- Fichas clínicas.

5.2 Métodos para la aplicación del test de inmunocromatografía diagnóstica para CPV – 2 (Actividad experimental número 1).

PASO 1: Identificación del paciente en la ficha clínica (ANEXO 1), se procedió a realizar un examen clínico al paciente para verificar su estado de salud, basándose en el cuadro de parámetros fisiológicos adjuntado (ANEXO 2).

PASO 2: Se recogieron las muestras de heces usando hisopos estériles a perros con signología clínica compatible con la infección por CPV-2.

PASO 3. Se introdujo el hisopo en el tubo de 1ml de diluyente de análisis.

PASO 4. Se extrajo el cassette de su empaque metalizado, sosteniendo la botella de la muestra en posición vertical y, sobre la ranura de muestra que se encuentra en el cassette, se depositó tres gotas (120 - 150 μ l) de muestra diluida.

PASO 5. Cuando la prueba comenzó a trabajar, se observó el movimiento en la ventana del resultado en el centro del dispositivo.

5.2.1 Interpretación de la prueba de inmunocromatografía.

En la sección izquierda de la ventana de resultados apareció la banda control y, la sección derecha de la ventana de resultados indicó los resultados.

- Resultado negativo: se observó la presencia de una sola banda en la ventana de resultados.



- Resultado positivo: se observó la presencia de dos bandas a color (“T” y “C”) en la ventana de resultados, sin importar cuál aparezca primero.

Para iniciar el ensayo LAMP primero se realizó el control de proceso a fin de no cometer errores en la interpretación de los resultados finales y poder validar las muestras.

5.3 Materiales para la extracción y purificación de ADN de la vacuna de CPV-2 que fue usada como control positivo.

Biológicos:

- Vacuna Puppy DP (Distemper canino y CPV-2).

Equipos y otros materiales:

- Gel refrigerante.
- Cooler para transporte de muestras.
- Material de cristalería.
- Micropipetas (10, 100 y 1000 ug).
- Puntas para micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Vórtex.
- Microcentrífuga.
- Baño María.
- Balanzas.
- Refrigerador (4°C).

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, S3014, S3089, 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.: 278475).



- Etanol absoluto al 70% (Sigma, Cat. No.: E7148 y W4502).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502).

5.4 Métodos para la extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico de la vacuna Puppy DP que se usó como control positivo para el ensayo LAMP.

PASO 1. Se incorporó la parte liofilizada de la vacuna Puppy DP con el diluyente.

PASO 2. Se colocó 200 µl de la vacuna Puppy DP, agua destilada estéril 200 µl, 250 µl de Solución de lisis 2X, y 250 µl de la solución de Proteinasa K.

PASO 3. Se agitó en el vórtex por 5 a 10 segundos y se incubó la muestra por una hora a 56°C.

PASO 4. Se colectó la solución de lisis (500 µl), luego fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le adicionó un volumen de 400 µl de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1.

PASO 5. Las muestras fueron mezcladas en el vórtex por 5 a 10 segundos y para separar las fases se centrifugaron a 14,000 x *g* (gravidades por minuto) durante 10 minutos a 4°C.

PASO 6. Una vez concluida la centrifugación, se colectó la fase acuosa 400 µl, se colocó en un tubo eppendorf nuevo de 2.0 ml, y se le adicionó 0.6 volúmenes de Isopropanol o 2.5 volúmenes de etanol absoluto que precipitaron el ADN total, las muestras se mezclaron por inversión 5 a 6 veces.

PASO 7. Las muestras se centrifugaron por 10 segundos a 14,000 x *g* a 4°C para formar una pastilla con el ADN precipitado.

PASO 8. Una vez generada la pastilla, se retiró por decantación el sobrenadante y se adicionó 500 µl de etanol al 70%.



PASO 9. Se centrifugó 5 segundos por $14,000 \times g$ a 4°C nuevamente en las condiciones antes descritas, para posteriormente eliminar el etanol al 70% por decantación.

PASO 10. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente protegidas del polvo y de la luz directa.

PASO 11. Una vez secas las pastillas de ADN total, éstas fueron re suspendidas en 10 - 15 μl de agua grado biología molecular y almacenada a -20°C .

5.5 Materiales para la toma, transporte, almacenamiento y purificación de las muestras para el ensayo LAMP (Actividad experimental número 2).

Biológicos:

- Heces de perros.

Laboratorio:

- Hisopos estériles.
- Tubos vacutainer de tapa roja.

Equipos y otros materiales:

- Gel refrigerante.
- Cooler para transporte de muestras.
- Material de cristalería.
- Micropipetas (10, 100 y 1000 μL).
- Puntas para micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Vórtex.
- Microcentrífuga.
- Baño María.
- Balanzas.
- Refrigerador (4°C).
- Ultra congelador (-80°C).



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, S3014, S3089, 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.: 278475).
- Etanol absoluto al 70% (Sigma, Cat. No.: E7148 y W4502).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. No.: W4502).

PASO 1. Se usaron las muestras de heces obtenidas de la actividad experimental número 1.

PASO 2. Las muestras colectadas se colocaron en un tubo vacutainer estéril rotulado.

PASO 3. Las muestras se conservaron en refrigeración hasta ser llevarlas al lugar de almacenamiento final.

PASO 4. El material colectado fue transportado en un cooler con gel refrigerante, y fueron almacenadas en un Ultra congelador a -80°C en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

5.6 Métodos para el procesamiento de las muestras biológicas colectadas, extracción y purificación del ácido desoxirribonucleico total de (CPV-2 y la especie animal de estudio para el ensayo de LAMP.

PASO 1. Se colocó en el tubo que contenía los hisopos con las muestras biológicas 200 μl de agua destilada estéril, 250 μl de Solución de lisis 2X, y 50 μl de la solución de Proteinasa K.



PASO 2. Se agitó en el vórtex por 5 a 10 segundos y se incubó la muestra por una hora a 56°C.

PASO 3. Una vez concluido el periodo de incubación, se retiró cuidadosamente el hisopo, presionándolo en las paredes del tubo para liberar lo más pronto posible la solución de lisis.

PASO 4. Se colectó la solución de lisis (500 µl), luego fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le adicionó un volumen de 400 µl de Fenol/Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1.

Se repitieron los pasos descritos en la sección 5.4 del (Paso 5 al 11).

5.7 Materiales para la amplificación del ADN de CPV-2 mediante el ensayo LAMP.

Biológicos:

- ADN total extraído de las muestras de heces.

Materiales químicos o reactivos:

- Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).
- Buffer de amplificación 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM de (NH₄)₂SO₄; 10 mM de HCL; 2 mM de MgSO₄ y 0,1% de Triton x-100) y enzima *Bsm* ADN polimerasa (Thermo scientific, No.: cat.: 61962-50G).
- Solución de Betaína 4 M (Sigma, No. cat.: 61962-50G).
- Solución de dNTP´s a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).
- Solución del oligonucleotido FIP (F1c + F2), BIP (B1c + B2), F3, B3, LF, LB específica para la detección de material genético de caninos.

5.8 Métodos para la amplificación de la prueba control mediante el ensayo LAMP.

PASO 1. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de control con todos los reactivos antes descritos en la sección anterior con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (12 μ l de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total:

Reactivo	Concentración		Volumen	
	Inicial	Final	Premezcla	por reacción
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	111 μ l	1.275 μ l
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	50 μ l	1,25 μ l
Solución dNTP`s	10 Mm	1.4 mM	0,7 μ l	35 μ l
Oligonucleótido FIP	100 μ M	1.6 μ M	8 μ l	0.40 μ l
Oligonucleótido BIP	100 μ M	1.6 μ M	8 μ l	0.40 μ l
Oligonucleótido F3	25 μ M	0.2 μ M	4 μ l	0.20 μ l
Oligonucleótido B3	25 μ M	0.2 μ M	4 μ l	0.20 μ l
Betaina	4 M	800 mM	100 μ l	5.00 μ l
Muestra de ADN total			160 μ l	400 μ l
Volumen final	-----	-----	480 μ l	12.00 μl

Tabla 1. Premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN.

PASO 2. La premezcla preparada se llevó al vórtex por 4 a 6 segundos, y fue colectada por centrifugación a 14,000 x g durante 15 a 20 minutos

PASO 3. Se marcaron los tubos de PCR de (200 μ l) y se les colocó 8 μ l de la premezcla y se les adicionó 4 μ l de la muestra de ADN total correspondiente.

PASO 4. Los tubos con las reacciones de amplificación (12 μ l) se colocaron en el termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la

desnaturalización del ADN total y el alineamiento de los oligonucleotidos a la secuencia diana de control a amplificar:

Paso	Desnaturalización:	Alineamiento:
Tiempo:	5´	5´
Temperatura:	94°C	4°C

Tabla 2. Tiempo y temperatura de desnaturalización del ADN.

PASO 5. Culminado este tiempo de incubación, se sacaron los tubos de PCR con las reacciones (12 µl) del termociclador y se añadió la enzima *Bsm* ADN polimerasa para que suceda la amplificación del material genético:

Reactivo:	Concentración		Volumen por reacción
	inicial:	final:	
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ µl	0.32 U/ µl	0.4 µl
Volumen final:	-----	-----	10 µl

Tabla 3. Cantidad de enzima utilizada por reacción para la amplificación del ADN.

PASO 6. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el termociclador o en baño María.

Paso:	Extensión	Inactivación
Tiempo:	60´	10´
Temperatura:	60°C	80°C

Tabla 4. Extensión e inactivación de la mezcla en el termociclador.

5.9 Materiales para la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

Materiales Biológicos:

- Productos amplificados mediante el ensayo de LAMP.



Materiales químicos y 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).
- Solución con el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat no: 15628050).

Materiales de laboratorio y equipos:

- Micropipetas (10, 100 y 1000 μ l).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vórtex.
- Cámara de electroforesis.
- Balanza analítica.
- Potenciómetro (pHmetro).
- Transiluminador.
- Fotodocumentador.
- Computadora de escritorio.

5.10 Método de detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel al 1.5% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

Para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis del ensayo LAMP se utilizó el siguiente procedimiento:



PASO 1. Se pesó 1.08 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 90 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 en la solución TAE se dejó enfriar y se adicionó 3 μ l de una Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, y la mezcla se vació en el molde para el gel y se colocó inmediatamente dos peines para formar dos filas de pozos.

PASO 3. Una vez gelificada la solución de agarosa, el gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se adicionó la cantidad de Solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.

PASO 4. Posteriormente se cargó 3 μ l de la Solución buffer de carga para ADN 6X de cada una de las muestras en cada pocillo del gel, y en uno de los pocillos de cada fila se colocó 6 μ l del marcador de peso molecular de ADN (500 ng totales).

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

PASO 6. Una vez separado o resueltos los productos de LAMP, se visualizó en el transiluminador y con ayuda del fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.

PASO 7. En el caso del ensayo LAMP se consideró muestra positiva aquella en la que se observó el patrón de segmentos de ADN milimétrico de CPV-2 amplificado.

Para el diagnóstico de CPV-2 se siguieron los mismos pasos que en el control de proceso, con la única diferencia de los oligos fueron específicos para CPV-2.

Para el proceso de validación del ensayo se realizó el siguiente procedimiento descrito en la figura 3.

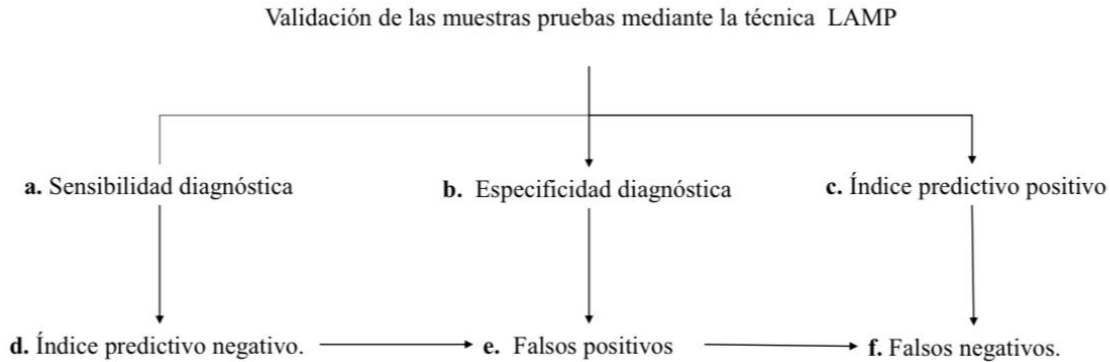


Figura 3. Pasos para validar el ensayo LAMP.

Fuente: Autor.

Para la presentación de la información colectada se utilizaron tablas de contingencia entre las variables Test Aplicados, en lo cual se establecieron valores tanto numéricos como porcentuales. Adicionalmente se incluyeron valores de Sensibilidad y Especificidad diagnóstica de la Prueba calculados como probabilidades con el objetivo de determinar la capacidad de detección del virus en las muestras, además de los valores respectivos de falsos positivos y negativos, así como los índices Predictivos Negativos y Positivos. Para una descripción inferencial, con los porcentajes se procedió a determinar intervalos de confianza al 95%.

Para los diferentes indicadores, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} \quad (1)$$

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} \quad (2)$$

$$\% \text{ Falsos Negativos} = (1 - \text{Sensibilidad}) * 100 \quad (3)$$



$$\% \text{ Falsos Positivos} = 1 - \text{Especificidad}) * 100 \quad (4)$$

$$\text{Indice Predictivo Positivo} = \frac{NP}{VP+FP} \quad (5)$$

$$\text{Indice Predictivo Negativo} = \frac{VN}{FN+VN} * 100 \quad (6)$$

En donde:

VP= Valores positivos reales; FN= Falsos negativos; VN= Valores negativos reales;

FP= Falsos positivos. Para las fórmulas anteriormente descritas se utilizó la tabla de contingencia de 2X2, la misma que determinó los casos positivos y negativos con las dos pruebas.

CAPÍTULO VI: RESULTADOS

Una vez realizada la prueba de inmunocromatografía y el ensayo de LAMP se obtuvieron los siguientes resultados:

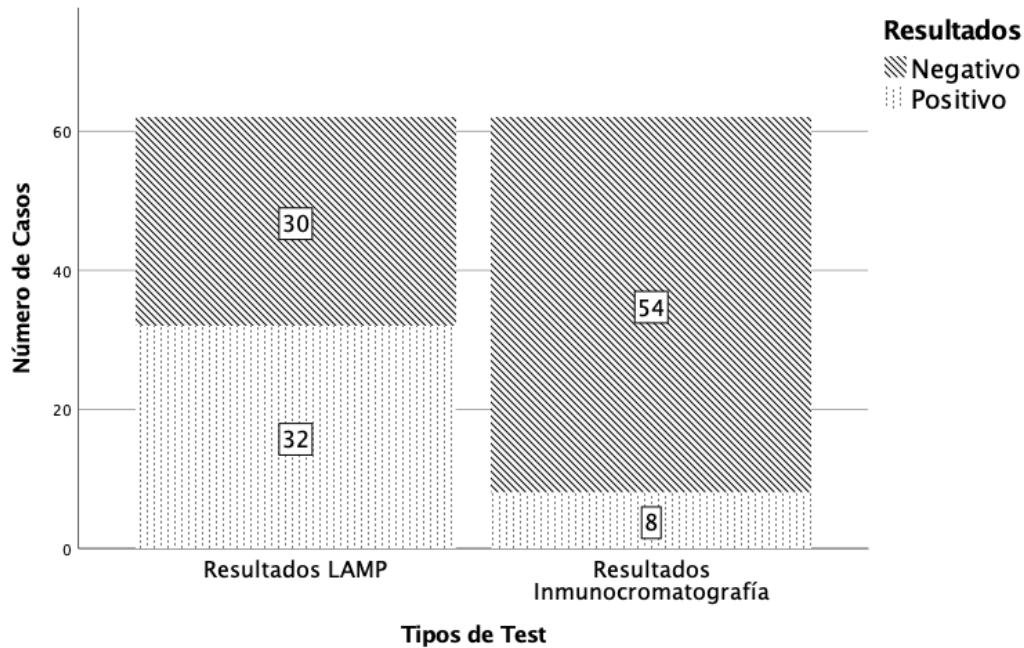


Figura 4. Número de pruebas positivas y negativas según el tipo de prueba utilizado.

En la figura 4 se observa que en las muestras de heces tomadas a perros con signología clínica de parvovirus canina, la prueba de inmunocromatografía detectó menor cantidad de muestras positivas a CPV-2 que el ensayo LAMP. Del 100% de pruebas realizadas con el ensayo LAMP se observó que ligeramente la mayor parte, es decir el 52% ($32/(30+32)$) corresponde a resultados positivos, lo cual es mucho mayor que el test de Inmunocromatografía con la que se consiguió apenas el 4% ($8/62$).



Con los resultados de casos positivos y negativos, se procedió a obtener los porcentajes de sensibilidad, especificidad, falsos positivos y negativos detallados en la tabla (Tabla 5).

		Ensayo LAMP			
		Positivo	Negativo	Total	
Prueba de Inmunocromatografía	Positivo	# de casos	5/62	3/62	8/62
		%	8.07%	4.84%	12.9%
	Negativo	# de casos	27/62	27/62	54/62
		%	43.55%	43.55%	87.1%
Total casos	# de casos	32	30	62	
	%	51.6%	48.4%	100%	

* % incluidos corresponden a los porcentajes al total de la fila según la operación mostrada en paréntesis.

Tabla 5. Tabla de contingencia que expresa el número y porcentaje de los casos positivos, casos negativos, la sensibilidad y especificidad diagnóstica con el ensayo LAMP, en comparación con la prueba de inmunocromatografía.

En la Tabla 5 se observa el número y porcentaje de muestras positivas a CPV-2, el ensayo LAMP obtuvo la mayor cantidad, al igual que los valores más altos de los porcentajes de sensibilidad, especificidad, falsos positivos y negativos en comparación con la prueba de inmunocromatografía.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		
		Positivo	Negativo	Total
Resultado de la prueba diagnóstica LAMP	Positivo	5	27	32
	Negativo	3	27	30



	Total	8	54	62
		95 % I.C.		
		Límite inferior	Límite superior	
Prevalencia de la enfermedad	12,90%	6,13%	24,40%	
Pacientes correctamente diagnosticados	51,61%	38,68%	64,34%	
Sensibilidad	62,50%	25,89%	89,76%	
Especificidad	50,00%	36,25%	63,75%	
Valor predictivo positivo	15,63%	5,90%	33,55%	
Valor predictivo negativo	90,00%	72,32%	97,38%	
Cociente de probabilidades positivo	1,25	0,69	2,28	
Cociente de probabilidades negativo	0,75	0,29	1,91	

Tabla 6. Capacidad predictiva de una prueba diagnóstica de LAMP.

En la Tabla 6 se refleja que de la sensibilidad del ensayo LAMP es de 62.5%, que estadísticamente al 95% de confianza puede encontrarse entre el 25.9% y 89.76% de sensibilidad, es decir, a nivel poblacional. Esta misma interpretación se puede generalizar para la Especificidad y los Valores Predictivos Positivo y Negativo, los cuales muestran resultados favorables para la sensibilidad y especificidad del ensayo LAMP.



CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN

En la presente investigación el número de pruebas positivas a CPV-2 por la prueba de inmunocromatografía se asemeja con un estudio realizado por Cho et.al, en el (2006), en el cual analizaron 50 muestras fecales sospechosas de CVP-2 mediante la prueba de inmunocromatografía y el ensayo LAMP dando como resultado que el ensayo LAMP tiene una alta sensibilidad analítica en comparación con el ensayo de inmunocromatografía.

Para la sensibilidad diagnóstica se pudo calcular que el ensayo LAMP obtuvo un valor de 62.5%, valor inferior a lo citado por Cho et. al., en el año (2006), quien señala que la técnica LAMP para detectar ADN de CPV-2 obtuvo 100 veces más sensibilidad diagnóstica que otras pruebas moleculares como PCR, ELISA, etc, lo cual puede deberse al medio de transporte que usaron en dicho estudio, para preservar y conservar mejor la muestra, para realizar el aislamiento viral de manera más eficaz. Mukhopadhyay et. al., en el año (2012) reporta una sensibilidad diagnóstica del 74,28%, valor superior al encontrado en la presente investigación y que puede estar relacionado con la pérdida del virus durante la etapa del aislamiento viral de ADN de CPV-2 en las muestras de heces fecales. Arunrut et. al., (2011) confirma a través de su estudio denominado "*In vitro cultivation of shrimp Taura syndrome virus (TSV) in a C6/36 mosquito cell line*" que el ensayo LAMP es más sensible que PCR, además de ser de aplicación más fácil para la detección de patógenos clínicos.

Por otro lado, en un estudio realizado Kaneko et. al., (2005) menciona que la sensibilidad del ensayo LAMP para HSV-1 y HSV-2 fue 10 veces mayor que la de



los ensayos de PCR esto debido a que el ensayo LAMP detecta de forma temprana la presencia de ADN viral.

Kaneko et al., (2005) e Ihira et al., (2007), señalan que el ensayo LAMP se comporta como una herramienta molecular diagnóstica similar a PCR en tiempo real, en términos de sensibilidad y especificidad.

La especificidad del ensayo LAMP en esta investigación fue de un 50%, lo cual es menor a un estudio realizado por Sun et. al., (2014) en donde reportan una especificidad del 83%, la menor especificidad obtenida en esta investigación puede estar relacionado con lo descrito por Mukhopadhyay et. al., (2012), quienes señalan que la especificidad está en relación con la diseminación del virus secundario a una vacunación reciente del paciente en estudio, mutaciones en las regiones fuera de la proteína VP2, fallo en la especificidad o a la reactividad cruzada de los cebadores con otros patógenos como Coronavirus canino, Distemper canino, Adenovirus tipo 1 y *Leptospira icterohemorrhagiae*. Por otro lado, Zúñiga (2017) reporta una especificidad del 95,2%, de igual forma los intervalos de confianza se establecieron como se observan en la Tabla N°6, lo cual no concuerda con lo referido por Zúñiga (2017), en el cual menciona que el rango del intervalo de confianza de la sensibilidad fue de 20%, lo cual explica que pudo deberse a la carga parasitaria que contenía la muestra analizada.

En relación a estudios en humanos sobre el ensayo LAMP, Ihira et. al., (2007) mencionan que la sensibilidad de LAMP fue de un 95,5% en su estudio denominado "*Detección directa del ADN del virus del herpes humano- 6 en suero mediante el método de amplificación isotérmica mediada por bucle LAMP*"; mientras que Zúñiga,



(2017), señala que el ensayo LAMP detectó 4 veces más individuos infectados con malaria en comparación con la microscopía debido a su alta sensibilidad diagnóstica en su estudio “*Diseño de una técnica de amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP) en el gen AMA-1 para la detección de Plasmodium vivax*” y que en las muestras con infecciones a *Plasmodium spp.* LAMP tuvo una sensibilidad de 92.1% (88.1% - 95.1%) y 92.5% (88.4% - 95.5%) en comparación con qPCR-PgMt y qPCR-18S respectivamente; comparando LAMP a la técnica de qPCR-18S, la detección de *P. falciparum* tuvo una sensibilidad del 75.8% (57.7% - 88.9%), mientras que para *P. vivax* fue del 88.3% (83.1% - 92.4%).

El índice predictivo positivo en esta investigación fue del 15,63% lo cual no coincide con lo demostrado por Zúñiga (2017), que refiere un valor predictivo positivo de LAMP del 91.8%; mientras que el índice predictivo negativo del 91.9% en el estudio realizado por Zúñiga (2017), coincide con lo reportado en esta investigación, que demuestra un valor del 90%, por lo que podría deberse al número de muestras utilizadas en los ensayos.



CAPÍTULO VIII: CONCLUSIONES

Con este estudio realizado se concluye que la técnica de LAMP podría ser utilizada como prueba diagnóstica temprana en infecciones producidas por CPV-2, a partir de una muestra de heces, esto debido a que se pudo obtener material genético de perros con signología clínica compatible con CPV-2, y además se demostró que la técnica LAMP en términos de reproductibilidad, se puede utilizar como prueba confiable, siendo una nueva alternativa a la prueba de inmunocromatografía, para una detección temprana de infección, lo que permite proporcionar un tratamiento inmediato de apoyo al paciente infeccioso.

CAPÍTULO IV: RECOMENDACIONES

En esta investigación se ha propuesto una nueva alternativa de diagnóstico para la detección temprana de CPV-2 ADN mediante el ensayo de LAMP, sin embargo, es importante empezar a trabajar en investigaciones que brinden mayor información sobre los tipos y de CPV-2 y su prevalencia en la ciudad de Cuenca, con el fin de realizar diagnósticos específicos de las enfermedades infecciosas que existen en nuestra ciudad.

Además, daría la oportunidad a los profesionales médicos veterinarios, diagnosticar en fases tempranas de la enfermedad y así empezar con apoyo vital al paciente.

Se debe incrementar el número de muestras para tener respaldo científico sobre la eficiencia de LAMP en el diagnóstico de infecciones por CPV-2.



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Angulo, S. M. (2013). *Medicina Pediátrica en pequeños animales*.
- Arunrut, N., Phromjai, J., Gangnonngiw, W., Kanthong, N., Sriurairatana, S., & Kiatpathomchai, W. (2011). *In vitro* cultivation of shrimp Taura syndrome virus (TSV) in a C6/36 mosquito cell line. *Journal of Fish Diseases* 2, 805 - 810.
- Brito, L. V. E. *Determinación de las variantes antigénicas del Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en caninos de la ciudad de Quito.* , 2 § (2017).
- Cárdenas, J. W. A., García-díaz, J. R., & Quiñonez-ramos, R. (2015). *Factores de riesgo asociados a la Parvovirus Canina en el Cantón.* 37(3), 183–190.
- Carmichael, L. E. (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *J Vet Med*, 303 - 311.
- Castro, R. F. (1987). *Parvovirus canina y aspectos de inmunización*. México: *Ciencia Veterinaria*: Laboratorios Litton de México S,A de C.V.
- Cho, H. -S., Kang, J. -I., & Young, P. N. (2006). Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *Vet Diagn Invest*, 81 - 84.
- Cotmore, S. F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J. A., Mukha, D. V., Pintel, D. J., Qiu, J., . . . Davison, A. J. (2014). The family Parvoviridae. *J Virol*. 1239 - 1247.
- Cureton, D. K., Harbison, C. E., Cocucci, E., Parrish, C. R., & Kirchhausen, T. (2012). Limited transferrin receptor clustering allows rapid diffusion of Canine parvovirus into clathrin endocytic structures. *J Virol*. 5330-5340.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M., ... Buonavoglia, C. (2006). Characterisation of the Canine parvovirus type 2 variants using minor



groove binder probe technology. *J viromet*, 133(1), 92–99.

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.026>

Díaz Rojas, C., Correa, J., & Vera Alfonso, V. (2008). Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. *Rev. Med. Vet*, (15), 57–65. <https://doi.org/10.19052/mv.1455>

Flores, R. (1987). parvovirus canina y aspectos de inmunización. *Ciencias Vet*, 131-159.

Gutiérrez, M., & López, S. (2010). Mecanismos de entrada de virus: Una manera de conocer la célula . *Rev Esp en Ciencias QQ-BB*, 26-34.

Goddard, A., & Leisewitz, A. L. (2010). Canine Parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 40(6), 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>

Hafenstein, LM, P., VA, K., C, X., MC, M., CD, N., . . . MG, R. (2007). Asymmetric binding of transferrin receptor to parvovirus capsids. *J Virol*, 6585-6589.

Hall, E. J., Simpson, J. W., & Williams, D. A. (2012). *Manual de Gastroenterología en pequeños animales*. Barcelona: Lexus.

Horiuchi, M., Goto, H., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (1994). 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*, 1319 - 1328.

Hueffer, K., & Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol*, 392- 398.

Hueffer, K., Parker, J. S., Weichert, W. S., Geisel, R. E., Sgro, J.-Y., & Parrish, C. R. (2003). The natural host range shift and subsequent evolution of Canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J Virol*, 1718- 1726.



Hurtado, D. (07 de Enero de 2012). Nueva perspectiva de la parvovirus canina en el sur del Valle de Aburra. Obtenido de repository.lasallista:

http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/690/1/NUEVA_PERSPECTIVA_PARVOVIRUS_CANINO_SUR_VALLEDEABURRA.pdf

Ihira, M., Akimoto, S., Miyake, F., Sugata, A. F., Suga, S., Ohashi, M., . . . Yoshikawa, T. (2007). Direct detection of human Herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol*, 6 - 22.

Judge, P. (2015). Management of the patient with Canine parvovirus enteritis. *Vet Education*, 5–11.

Kaneko, H., Iida, T., Aoki, K., S. O., & Suzutani, T. (2005). Sensitive and rapid detection of Herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol*, 3290 - 3296.

Kelly, W. R. (1978). An enteric disease of dogs resembling feline panleucopaenia. *Aust Vet J*, 54: 593.

Lamm, C. G., & Rezabek, G. B. (2008). Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 38(4), 837–850.
<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008>

Mokhtari, A., Farmani, N., & Rajabi, M. (2018). Detection of Canine parvovirus by PCR and its association with some of risk factors. *Rev MVZ*, 23(2), 6607–6616.
<https://doi.org/10.21897/rmvz.1334>

Mukhopadhyay, H. K., Amsaveni, S., Matta, S. L., Antony, P. X., Thanislass, J., & Pillai, R. M. (2012). Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification



assay for rapid and sensitive detection of Canine parvovirus DNA directly in faecal specimens. *Lett Appl Microbiol*, 202–209. [https://doi.org/10.1111/j.1472-](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03284.x)

765X.2012.03284.x

Ohshima, T., Hisaka, M., Kawakami, K., Kishi, M., Tohya, Y., & Mochizuki, M. (2008).

Chronological analysis of Canine parvovirus type 2 isolates in Japan. *J Vet Med Sci*, 765-775.

OIE. (2004). Manual del a OIE sobre animales terrestres. Obtenido de <https://www.oie.int/doc/ged/D6508.PDF>

Palermo, L. M., Hafenstein, S. L., & Parrish, C. R. (2006). 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*, 8482- 8492.

Parthiban, M., Divya, K. C., Kumanan, K., & Bargavi, D. S. (2012). A rapid and highly reliable field-based LAMP assay of Canine parvovirus. *J Vet Med Sci*. 71–74. <https://doi.org/10.4149/av>

Pérez, R., Bianchi, P., Calleros, L., Francia, L., Hernández, M., Maya, L., ... Zoller, S. (2012). Recent spreading of a divergent Canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population. *Vet Microbio*, 155(2–4), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.017>

Pollock, R. V. H., & Coyne, M. J. (1993). Canine parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 23(3), 555–568. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50305-4](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50305-4)



- Prittie, J. (2004). Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention. *DACVIM (Internal Medicine), DACVECC, 14(3), 167–176.*
<https://doi.org/10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x>
- Ramirez, F. D. (2018). *Enfermedades en perros y gatos*. Bogotá: Grupo latino.
- Reed, A. P., Jones, E. V., & Miller, T. J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol, 266 - 276.*
- Schmitz, S., Coenen, C., König, M., Thiel, H.-J., & Neiger, R. (2009). Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection tests with electron microscopy and polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest, 344-345.*
- Smith, A. E., & Helenius, A. (2004). How viruses enter animal cells. *Science, 237-242.*
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., & Vuento, M. (2003). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology, 267-280.*
- Sun, Y. L., Yen, C. -H., & Tu, C. -F. (2014). Visual detection of Canine parvovirus based on Loop-mediated isothermal amplification combined with enzyme-Linked Immunosorbent assay and with lateral flow dipstick. *J Virol, 509 - 516.*
- Tabor, B. (2011). Canine parvovirus. *Vete Tech, 32(5), 1–10.*
<https://doi.org/10.1201/b19719-81>
- Xu, J., Guo, H.-C., Wei, Y.-Q., Shu, L., Wang, J., Li, J.-S., . . . Sun, S.-Q. (2015). Phylogenetic analysis of Canine parvovirus isolates from sichuan and gansus provinces of China on 2011. *Transbound Emerg Dis, 91 - 95.*
- Zúñiga, A. W. (2017). Desempeño de la técnica de Amplificación Isotérmica Mediada. Obtenido de <http://repositorio.unp.edu.pe/>:



[http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/2650/T030_\(73812620\)_T.pdf?isAllowed=y&sequence=1](http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/URP/2650/T030_(73812620)_T.pdf?isAllowed=y&sequence=1)



Anexo 1. Ficha clínica de campo.

Historia Clínica # _____

Propietario:
Nombre del
paciente:

Dirección:
Fecha de nacimiento:

Raza:
Sexo:

Telf.:
Mail.

Vacunaciones:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Fecha:
Desparasitación:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Fecha:
Tipo de dieta:	Casera <input type="checkbox"/> Balanceado <input type="checkbox"/> Mixto <input type="checkbox"/>
Desde cuando tiene este animal:	Fecha:
Medicaciones actuales:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Tipo:
Enfermedades padecidas anteriormente:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Fecha:

SISTEMA TEGUMENTARIO	Lesiones en piel:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	SISTEMA ESQUELETICO		SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Cabeza:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			Tipo:
	Cuello:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Anormalidades al caminar:	Miembro afectado:
	Tronco:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Cojera:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Extremidades:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Constante:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Cola:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
	Prurito:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			

SISTEMA RESPIRA-TORIO	Tos:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Productiva: SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Estornudos:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Descarga Nasal:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Tipo:
	Disnea:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

SISTEMA DIGESTIVO	Apetito:	Norma <input type="checkbox"/> Selectivo <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/>
	Ingesta de agua:	Normal <input type="checkbox"/> Disminuida <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/>
	Vómito:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>



	Frecuencia Deyecciones:	Normal <input type="checkbox"/> Aumentada <input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/>
	Estreñimiento:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Flatulencia:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Deglución:	Normal <input type="checkbox"/> Con dolor <input type="checkbox"/> No come <input type="checkbox"/>

SISTEMA GENITO URINARIO	Hematuria:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Poliuria:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Polaquiuria:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Disuria:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Oliura:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	OVH o Castración:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Estro:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Gestante (hembra):	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Pseudocias:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Descarga vaginal:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Tipo:

SISTEMA NERVIOSO	Comportamiento anormal:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	OJOS	Descarga ocular:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Tipo:
	Ataxia:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Blefaroespasmos:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Dismetria:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Opacidad corneal:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Copnea:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>		Ceguera:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Paresis:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			
	Convulsiones:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>			

OIDOS	Descarga:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/> Tipo:
	Se rasca:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Olor fétido:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
	Sordera:	SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

**Examen físico:**

PARAMETRO A VALORAR	DATO
Peso (kg)	
CC.	
T°	
FC	
FR	
MM	
TLLC	
LN	
%D	Normal <input type="checkbox"/> L. <input type="checkbox"/> M. <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> G. <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>
RT	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>
RD	Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/>

Anexo 2. Parámetros normales de las constantes fisiológicas del perro.

PARAMETROS A VALORAR	ABREVIATURA	UNIDAD DE MEDIDA
Peso	Peso	0,2 – 4 Kg.
Condición corporal	CC.	1-5
Temperatura rectal	T°	J= 38,5-39,5°C
Frecuencia cardíaca	FC	J= 110-120 lpm
Frecuencia respiratoria	FR	J= 18-20 rpm
Membranas mucosas	MM	Rosadas
Tiempo de llenado capilar	TLLC	2 Segundos
Ganglios linfáticos o linfonodos	LN	Normal, agrandados
Porcentaje de deshidratación	%D	Normal <5% (no detectable). Leve 5-6%. Moderada 6-8%. Severa 8-10%. Grave 10-12%. Fatal 12-15%.
Reflejo tusígeno	RT	Positivo Negativo
Reflejo deglutorio	RD	Positivo Negativo

Anexo 3 Fotografías.



Foto 1: Perro con signología clínica compatible con CPV -2 y test de inmunocromatografía que empezó a correr.



Foto 2: Test de inmunocromatografía con resultado negativo a CPV-2.



Foto3: Test de inmunocromatografía con resultado positivo a CPV-2.

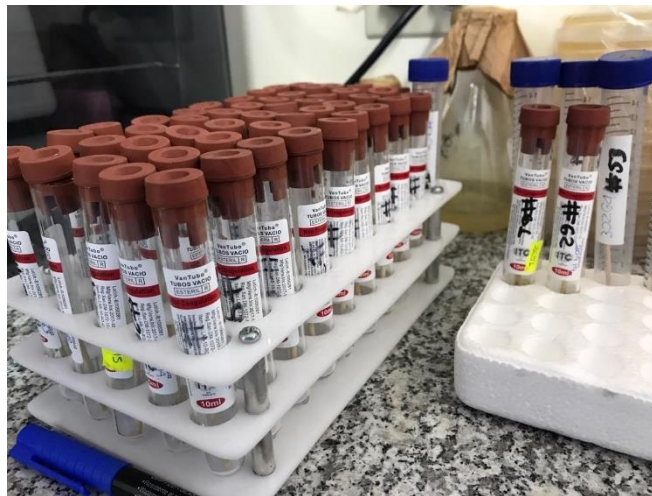


Foto 4: Muestras de heces de perros con signología clínica de CPV -2.



Foto 5: Muestras de heces de perros con signología clínica de CPV- 2 rotuladas y listas para su procesamiento.



Foto 6: Muestras de heces con agua destilada, solución de lisis y solución de proteinkinasa K.



Foto 7: Muestra en el vórtex durante 10 segundos.



Foto 8: Liberación de la solución de lisis del hisopo con muestra de heces.



Foto 9: Solución de Fenol/ Cloroformo/A. Isoamílico 25:24:1.



Foto 10: Muestras en la centrifuga.

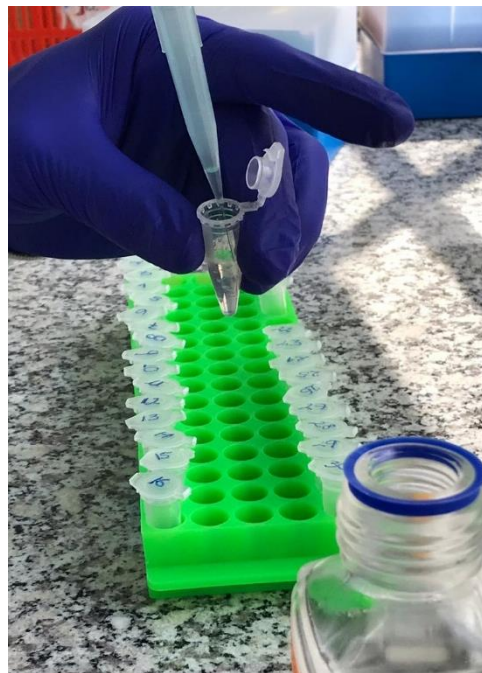


Foto 11: Adición de etanol absoluto.



Foto 12: Muestras al aire libre para su respectivo secado.



Foto 13: Preparación del gel de agarosa.



Foto 14. Adición del bromuro de etidio en el gel de agarosa.

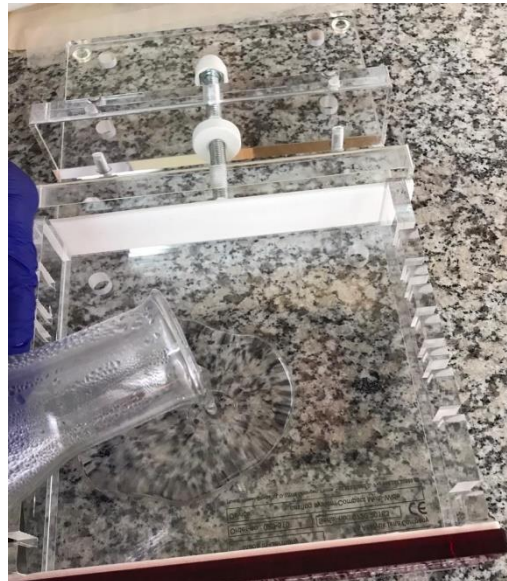


Foto 15: Colocación del gel en el molde y se colocó dos peines para formar dos filas de pozos.



Foto 16: Termociclador con las muestras cargadas

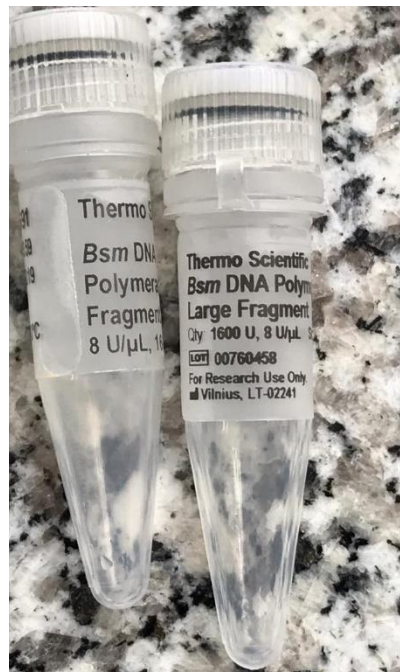


Foto 17: Enzima Bsm ADN polimerasa.

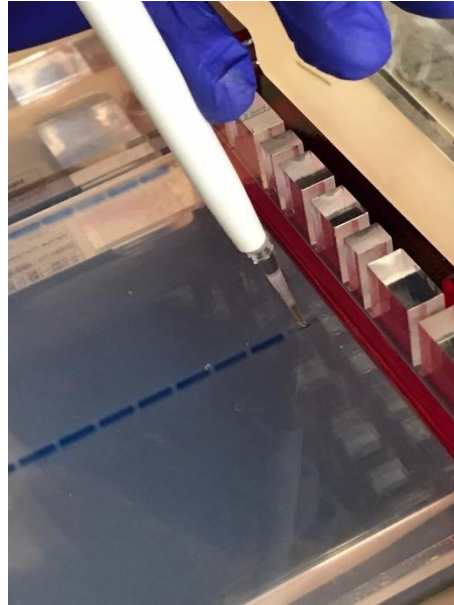


Foto 18: Muestras y marcador de peso carados.

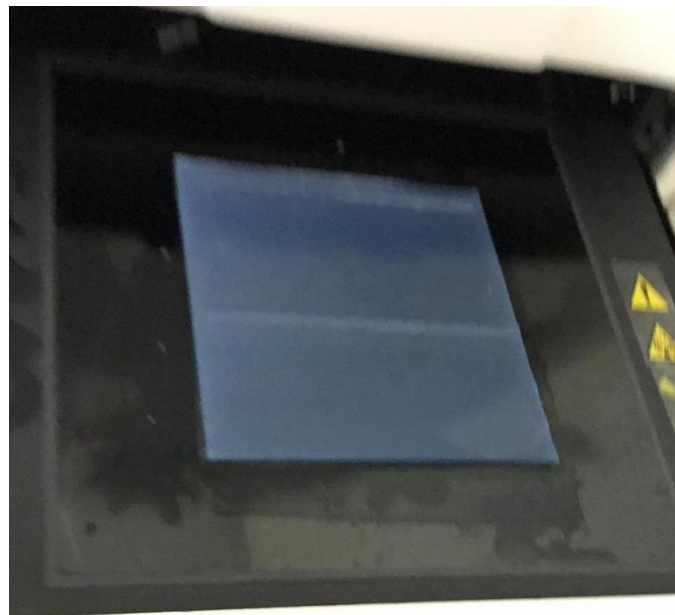


Foto 19: Gel en el transiluminador.

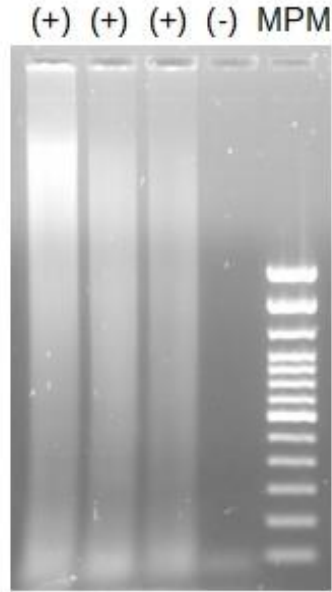


Foto: 20 Tres muestras positivas junto con una negativa con los respectivos controles positivos y negativos. MPM: 100 bp (Trackit 100 bp DNA Ladder; Invitrogen, Cat. no.: 10488058). Se pueden observar el patrón de escalera que indica la presencia de ADN de CPV-2 en las muestras de heces analizadas.

Anexo 4. Cálculo de las variables de rendimiento diagnóstico en perros con CPV-2 del ensayo LAMP para la detección de material genético de CPV-2 en muestras de heces de perros.

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{VP}{VP+FN} = \frac{5}{5+3} = 62.5\% \quad (1)$$

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{VN}{VN+FP} = \frac{27}{27+27} = 50\% \quad (2)$$

$$\% \text{ Falsos Negativos} = \frac{N^{\circ} \text{ casos Negativos LAMP}}{N^{\circ} \text{ casos Positivos Test Comercial}} * 100 = \frac{FN}{VP+FN} = \frac{3}{5+3} = 37.5\% \quad (3)$$

$$\% \text{ Falsos Positivos} = \frac{N^{\circ} \text{ casos Positivos LAMP}}{N^{\circ} \text{ casos Negativos Test Comercial}} * 100 = \frac{FP}{VN+FP} = \frac{27}{27+27} = 50\% \quad (4)$$

$$\text{Indice Predictivo Positivo} = \frac{VP}{VP+FP} = \frac{5}{5+27} = 15.63\% \quad (5)$$

$$\text{Indice Predictivo Negativo} = \frac{VN}{FN+VN} * 100 = \frac{27}{3+27} = 90\% \quad (6)$$

**Anexo 5.** Estudio de la capacidad predictiva de una prueba diagnóstica.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PREDICTIVA DE UNA PRUEBA DIAGNÓSTICA				
		Verdadero diagnóstico o criterio de referencia		Total
		Positivo	Negativo	
Resultado de la prueba diagnóstica	Positivo	5	27	32
	Negativo	3	27	30
	Total	8	54	62

				95 % I.C.	
			Límite inferior	Límite superior	
Prevalencia de la enfermedad	12,90%		6,13%	24,40%	
Pacientes correctamente diagnosticados	51,61%		38,68%	64,34%	
Sensibilidad	62,50%		25,89%	89,76%	
Especificidad	50,00%		36,25%	63,75%	
Valor predictivo positivo	15,63%		5,90%	33,55%	
Valor predictivo negativo	90,00%		72,32%	97,38%	
Cociente de probabilidades positivo	1,25		0,69	2,28	
Cociente de probabilidades negativo	0,75		0,29	1,91	