

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Evaluación *post mortem* de la diseminación de las variantes del
Protoparvovirus carnívoro 1 en perros afectados por Parvovirus canina**

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista


Autores:

Silvia Jimena Morocho Sandoval

José Luis Pacheco Atariguana

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2023-10-12

Resumen

La infección en perros (*Canis lupus familiaris*) causado por el *Protoparvovirus carnivoru 1* (PPVC-1) y sus variantes antigénicas (PVC-2a- 2b y 2c) pueden diseminarse por todos los tejidos y manifestarse de forma gastroentérica, cardíaca y nerviosa. Esto se debe al tropismo del virus por las células mitóticamente activas que favorecen su replicación. Con estos antecedentes, el presente estudio se direccionó a identificar la presencia de material genético del PPVC-1 y evaluar la frecuencia de las variantes antigénicas en los tejidos de sistema nervioso central y cardíaco de perros que murieron con diagnóstico de Parvovirus canina. Se colectaron un total de 108 muestras; hisopados rectales (n = 27), fragmentos de tejido intestinal (n = 27), cardíaco (n = 27) y nervioso (n = 27). El ADN total obtenido de las muestras se sometió a dos ensayos de PCR, uno como control de proceso y otro para la identificación de material genético del PPVC-1. Fue posible amplificar material genético del PPVC-1 en el 87,5 % de hisopados procesados, confirmando la infección en 21 perros. También se identificó la infección en tejidos del corazón y cerebro, pero no en intestino. Veinte muestras de tejido nervioso (74,1 %) y nueve de tejido cardíaco (42,9 %) dieron positivo al PPVC-1 de las cuales se seleccionaron 20 amplicones para la secuenciación. Del análisis de secuencias, se logró identificar satisfactoriamente a la variante antigénica PVC-2a en el 100 % de amplicones de origen nervioso (n = 16) y cardíaco (n = 4).

Palabras clave: parvovirus canino, variantes, PCR, replicación viral, tejido



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Infection in dogs (*Canis lupus familiaris*) caused by *Protoparvovirus carnivore 1* (PPVC-1) and its antigenic variants (2a, 2b and 2c) can spread through all tissues and manifest gastroenteric, cardiac and nervous. This is due to the tropism of the virus for mitotically active cells that favor its replication. With this background, the present study aimed to identify the presence of PPVC-1 genetic material and to evaluate the frequency of antigenic variants in the central nervous system and cardiac tissues of dogs that died with a diagnosis of canine Parvovirus. A total of 108 samples were collected; rectal swabs (n = 27), intestinal (n = 27), cardiac (n = 27) and nervous (n = 27) tissue fragments. The total DNA obtained from the samples was subjected to two PCR assays, one as a process control and the other for identification of PPVC-1 genetic material. It was possible to amplify PPVC-1 genetic material in 87.5% of processed swabs, confirming infection in 21 dogs. Infection was also identified in heart and brain tissues, but not in intestine. Twenty nervous tissue samples (74.1%) and nine cardiac tissue samples (42.9%) were positive for PPVC-1 from which 20 amplicons were selected for sequencing. From sequence analysis, the PVC-2a antigenic variant was successfully identified in 100 % of amplicons of nervous (n = 16) and cardiac (n = 4) origin.

Keywords: canine parvovirus, variants, PCR, tissues, viral replication, tissue



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	13
Objetivos.....	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
2.3. Pregunta de investigación	15
Revisión de literatura	16
3.1. Generalidades	16
3.2. Taxonomía	16
3.3. Estructura del virión del PPVC-1.....	17
3.4. Origen y evolución genética de la PVC-2 subespecie del PPVC-1	18
3.5. Variantes antigénicas del PVC-2 (PPVC-1)	19
3.5.1. Variante PVC-2a	19
3.5.2. Variante PVC-2b	19
3.5.3. Variante PVC-2c	19
3.6. Distribución de las variantes antigénicas del PVC-2 (PPVC-1).....	20
3.7. Severidad de la infección por las variantes antigénicas del PPVC-1.....	21
3.8. Patogenia de la infección por el PPVC-1	21
3.9. Formas de presentación clínica	22
3.9.1. Forma entérica.....	23
3.9.2. Forma cardíaca.....	23
3.9.3. Forma nerviosa	24
3.10. Hallazgos patológicos.....	25
3.11. Diseminación de las variantes del PVC-2 en órganos internos	26
3.12. Diagnóstico.....	27
3.13. Tratamiento paliativo ante la infección por el PVC-2.....	28
Materiales y métodos.....	30
4.1. Descripción del estudio.....	30
4.2. Actividades experimentales	30
4.2.1. <i>Actividad experimental No. 1: Colecta, conservación, transporte y almacenamiento del material biológico</i>	30
4.2.2. <i>Actividad experimental No. 2: Procesamiento de las muestras y purificación del ADN total</i>	31
4.2.3. <i>Actividad experimental No. 3: Ensayo de PCR de control de proceso para validación de las muestras de hisopados rectales y de tejido</i>	34

4.2.4. <i>Actividad experimental No. 4:</i> Visualización de los productos de PCR de control de proceso para validación de las muestras de hisopados rectales de tejido intestinal, cardíaco y del SNC	35
4.2.5. <i>Actividad experimental No. 5:</i> Detección del ADN del PPVC-1 de las muestras positivas al control de proceso (PCR de diagnóstico)	37
4.2.6. <i>Actividad experimental No. 6:</i> Visualización de los productos de las reacciones de PCR para la identificación del material genético del PVC-2 en las muestras validadas de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos cardíaco y del SNC.	38
4.2.7. <i>Actividad experimental No. 7:</i> Secuenciación de los productos de PCR obtenido de los tejidos cardíaco y del SNC para la identificación de las variantes del PVC-2.....	39
4.2.8. <i>Actividad experimental No. 8.</i> Análisis estadístico.....	39
Resultados y discusión	40
5.1. Colecta de muestras.....	40
5.2. Control de proceso para la validación (detección del material genético del paciente) de las muestras hisopados rectales y muestras de tejidos	42
5.3. Detección del ADN del PPVC-1 en hisopados rectales y las muestras de los tejido validadas con el control de proceso.....	42
5.4. Diseminación de la infección del PPVC-1 en pacientes afectados por Parvovirus canina.....	44
5.5. Identificación de las variantes del PVC-2 (PPVC-1) en muestras de tejido cardíaco y del SNC positivas a la infección viral	45
5.6. Contraste de los aspectos clínicos de los cadáveres caninos muestreados con los datos de la diseminación de la infección del PVC-2.....	49
Conclusiones	52
Recomendaciones	53
Referencias.....	54
Anexos.....	61

Índice de figuras

Figura 1. Proceso evolutivo del PVC-2, subespecie del PPVC-1.....	20
Figura 2. Distribución mundial de las variantes antigénicas del PVC-2 en perros domésticos.....	20
Figura 3. Lesiones macroscópicas en el intestino... ..	26
Figura 4. Lesiones macroscópicas en el corazón.....	26
Figura 5. Imágenes representativas de la resolución de las reacciones de PCR para la evaluación de la viabilidad del ADN total obtenido de las muestras de hisopados rectales colectadas de los pacientes caninos afectados por Parvovirus e identificación de material genético del PPVC-1.....	40
Figura 6. Frecuencia de la presencia de material genético del PVC-2 (PPVC-1) en hisopados rectales y fragmentos de tejido intestinal, cardíaco y del SNC.. ..	44
Figura 7. Presencia del PPVC-1 (PVC-2) en muestras de cadáveres caninos afectados por Parvovirus canina.....	45

Índice de tablas

Tabla 1. Taxonomía del Protoparvovirus carnívoro 1.	17
Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción para los ensayos de PCR de control de proceso	35
Tabla 3. Perfil de temperatura empleada en el ensayo de PCR para el control de proceso	35
Tabla 4. Resultado de los ensayos de PCR (control de proceso y diagnóstico) del total de muestras analizadas post mortem procedentes de perros con Parvovirus canina.	41
Tabla 5. Alineamiento de las secuencias de los productos de PCR obtenidos de las muestras de los tejidos de los pacientes caninos afectado por Parvovirus canina. Se indican las variantes identificadas por comparación con las secuencias reportadas en el GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).	46
Tabla 6. Análisis de frecuencias de las muestras sometidas a los ensayos de PCR del control (Detección de ADN de la especie canina) y PCR de diagnóstico (ADN del PPVC-1).	61
Tabla 7. Relación entre los datos de los pacientes en estudio con los hallazgos en el PCR de diagnóstico del PPVC-1 y el estudio de secuenciación.	62
Tabla 8. Datos generales de los pacientes incluidos en el estudio.	63

Agradecimientos

Al culminar este trabajo se me es grato agradecer al Dr. Antonio Vallecillo, tutor de esta investigación. Gracias por compartir su experiencia y amplio conocimiento sobre biología molecular, cuya información fue de suma utilidad para comprender las técnicas y procesos que requerían llevarse a cabo en la investigación. Gracias también, por habernos proporcionado los medios suficientes para cumplir con las actividades propuestas, y a su vez, gracias por las extensas conversaciones en temas varios que hicieron las visitas al laboratorio más amenas.

Un agradecimiento especial a mí compañero y amigo de tesis, el Dr. José Pacheco, por el gran apoyo y la disponibilidad prestada para el desarrollo exitoso de esta investigación.

El agradecimiento también se extiende para los doctores de las clínicas veterinarias, así como para los tutores de las mascotas fallecidas, quienes nos facilitaron los cadáveres para la toma de muestras.

Por último, pero no menos importante, gracias a mi familia humana y perruna por acompañarme a lo largo de esta vida universitaria.

Silvia Jimena

Agradecimientos

Tras recorrer los estudios universitarios, llega el culminar de una etapa misma que me formó con sus oportunidades y dificultades, me es grato agradecer muy profundamente a mi tutor Dr. Antonio Vallecillo por la amistad, dedicación, paciencia y las conversaciones precisas para lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por esa guía y los consejos que siempre estarán presentes en mi futuro profesional.

Agradezco a mis padres y hermanos que siempre me han sido ese soporte material, económico y aun teniendo sus propias dificultades nunca se rindieron hasta lograr verme culminar los estudios.

Que fuera de la vida sin amigos que sin darnos cuenta formamos lazos de amistad y confianza, por lo cual agradezco de manera especial a mi compañera de tesis Dra. Jimena Morocho (María) quien fue ese pilar para lograr los objetivos de este proyecto. ¡Se recorrió este camino y lo logramos!

Por último, agradezco a los docentes y personas que estuvieron formando parte de mi vida universitaria y que de algún modo supieron aportar en mi formación personal y académica.

José Pacheco

Dedicatorias

Dedico este trabajo de arduo esfuerzo, en primera instancia, a mi familia, especialmente a mi mamá, la Sra. Carmita Sandoval; a mi padre, el Sr. Silvio Morocho, y a mis tres queridos hermanos, Richard, Joel y Cristian; quienes me brindaron su cariño y amor, además de haber aportado de una u otra forma en beneficio de mi formación personal y profesional.

En segunda instancia, dedico este trabajo a mis mascotas, China, Choco, Tigre y Siete, quienes hasta la fecha me siguen brindando su alegría y compañía, además de haber contribuido significativamente en mi formación como veterinaria, cuando aún cursaba la carrera. También, dedico a la memoria de Scooby, Viky, Bigotes y Ámbar, perritos que me acompañaron durante mi niñez y adolescencia.

En última instancia, la dedicatoria va dirigida a la niña que jugaba a ser doctora y que ahora, con la culminación de este trabajo de tesis, cumplió parte de ese sueño.

Silvia Jimena

Dedicatorias

Del sufrimiento logramos hacernos más fuertes, la paciencia y el tiempo nos llevó a cumplir esa promesa de llegar a la meta afrontando las adversidades. Dedicó de manera especial este trabajo a la Dra. Tatiana Sigüenza quien de manera incondicional y con su inmenso cariño estaba presente en cada objetivo que me planteaba y fue testigo del logro de mis metas.

El batir de las alas, la mirada imponente y la fuerza de una rapaz nos llevó a ver la verdadera grandeza, la libertad y ser conscientes que no somos dueños de la naturaleza sino parte de ella.

José Pacheco

Listado de abreviaturas

Abreviatura:	Significado:
PPVC-1	<i>Protoparvovirus carnívoro tipo 1</i>
PVC-2	<i>Parvovirus canino tipo 2</i>
VP2	Principal proteína estructural de la cápside viral
ORFs	Marcos de abierto lectura
TfR	Receptor celular de transferrina
FPV	Virus de la Panleucopenia felina
RPV	Parvovirus del mapache
MEV	Virus de la enteritis del visón
BFPV	Parvovirus del zorro azul
VP2	Proteína estructural de la cápside viral
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Glu	Glutamato
Bp	Pares de bases
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
ICC	Insuficiencia cardíaca congestiva
CIV	Coagulación intravascular diseminada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
HR	Hisopados rectales
TC	Tejido cardíaco
SNC	Sistema nervioso central

Introducción

La Parvovirus canina es una enfermedad vírica altamente transmisible, con tasas de letalidad que oscilan alrededor del 90 % en cachorros, el grupo más susceptible (1). Esta patología infecciosa es causado por una subespecie del *Protoparvovirus carnívoro 1* (PPVC-1, por sus siglas del Inglés *Carnívoro protoparvovirus 1*), llamada *Parvovirus canino tipo 2* (PVC-2). El PVC-2, tras un período de incubación de 4 a 14 días, induce un cuadro gastrointestinal característico que incluye emesis y diarrea hemorrágica, con la consecuente deshidratación, choque y muerte (2, 3), esto en consecuencia de la atrofia y necrosis de las criptas y vellosidades intestinales (4). Adicional a la afectación gastrointestinal, se ha descrito el daño cardíaco y del tejido del sistema nervioso central (SNC), como dos formas adicionales de presentación clínica de la enfermedad (5, 6). A nivel cardíaco se genera insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) y muerte súbita producto de una miocarditis necrosante (7, 8), mientras que en el SNC se presenta leucoencefalomalacia y encefalitis relacionadas por las múltiples alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares, como la deshidratación, hipoglucemia, hipoxia, o coagulación intravascular diseminada (CID), por citar algunas (9, 10).

Con el transcurso de los años el PVC-2 se diseminó mundialmente y a su vez evolucionó, dando lugar a tres variantes antigénicas (PVC-2a, PVC-2b y PVC-2c) que al parecer pueden replicarse y propagarse con mayor facilidad en los perros susceptibles. Las variantes son definidas por el cambio de aminoácido en la posición 426 de la proteína VP2 del PVC-2 (7, 11). Por lo antes descrito, distintos autores han direccionado sus investigaciones a secuenciar ADN viral para identificar la variante causal de la infección y sobre todo a estimar el predominio de una de ellas en la población de perros infectados con esta subespecie del PPVC-1. Así, entre los años 2009 a 2015 Zhou *et al.* (12) determinaron a nivel global una prevalencia superior de la variante antigénica PVC-2a (49,7 %) sobre PVC-2b y PVC-2c. En Ecuador, tres estudios han mostrado la circulación de las variantes antigénicas del PVC-2 con una variación en la frecuencia con la que están presentes en las zonas evaluadas. Inicialmente se identificó con mayor frecuencia la variante PVC-2c (54,7 %) en los casos estudiados por Aldaz *et al.* (13) en la ciudad de Guaranda. Sin embargo, en investigaciones más actuales efectuadas en Quito y Cuenca por Erazo (14) y Clavijo (15) respectivamente, se mostraron una mayor frecuencia de la variante antigénica PVC-2a en las poblaciones caninas evaluadas.

El PPVC-1 emplea de células mitóticamente activas para replicarse de manera eficiente, por ello las criptas intestinales y los órganos linfoides son su principal blanco tisular (4, 16). Sin embargo, el PVC-2 y sus variantes antigénicas pueden diseminarse ampliamente por todos los tejidos (incluyendo el cerebro), como ha sido demostrado por Decaro *et al.* (17) y Zhao

et al. (16) en estudios con muestras colectadas *post mortem*. En este contexto, se han demostrado las variantes antigénicas del PVC-2 en tejido intestinal, cardíaco y del SNC, lo cual tiene concordancia con la presentación clínica de la enfermedad. Tras estudios con empleo de secuenciación para la identificación de las variantes del PVC-2 en muestras de tejidos intestinales colectados en Italia (2006), se identificó en mayor proporción la variante PVC-2c (17), mientras que en China entre los años 2009 a 2012 se encontró cantidades virales superiores de la variante PVC-2a (16). De igual forma a lo encontrado en el segmento intestinal por Decaro *et al.* (17) en Italia, la variante PVC-2c también se encontró en tejidos del corazón; por otro lado en una investigación llevada a cabo en Brasil en el 2020 se reportó la presencia de la variante PVC-2b en tejido cardíaco (8). A su vez en tejidos del SNC se ha notificado la presencia de las variantes antigénicas PVC-2c (17, 18) y PVC-2a (9, 19) sobre todo cuando existen infecciones sistémicas.

En consecuencia, de acuerdo a las tres formas de presentación clínica de la Parvovirus canina descritas en la literatura y considerando que hasta el momento en el Ecuador se cuenta únicamente con tres estudios de caracterización molecular de las variantes del PVC-2 anteriormente citados, en el presente trabajo se planteó efectuar un estudio en la ciudad de Cuenca para identificar y evaluar la diseminación de las variantes antigénicas principalmente en muestras de tejido cardíaco y del SNC obtenidas *post mortem* de perros que sufrieron ésta enfermedad viral y que desafortunadamente los llevó a la muerte.

Objetivos

2.1. Objetivo general

Evaluar la diseminación de las variantes del *Protoparvovirus carnívoro 1* en tejidos cardíaco y del sistema nervioso central de cadáveres de perros afectados por Parvovirus canina.

2.2. Objetivos específicos

- Establecer la infección por el *Protoparvovirus carnívoro 1* mediante la identificación del material genético viral por PCR, en hisopados rectales colectados de cadáveres de perros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canina.
- Identificar la presencia de material genético del *Protoparvovirus carnívoro 1* en muestras de tejido gastrointestinal, cardíaco y de sistema nervioso central colectados de cadáveres de perros afectados por Parvovirus canina.
- Identificar las variantes del *Protoparvovirus carnívoro 1* presentes en tejidos cardíaco y sistema nervioso central mediante la secuenciación del material genético viral amplificado.

2.3. Pregunta de investigación

¿Es posible el aislamiento de las variantes antigénicas del *Protoparvovirus carnívoro tipo 1* en muestras de tejido gastrointestinal, cardíaco y nervioso, de igual forma como lo han documentado estudios realizados alrededor del mundo?

Revisión de literatura

3.1. Generalidades

La Parvovirus canina es una de las enfermedades virales infecto-transmisible de mayor letalidad en perros jóvenes, el periodo de mayor susceptibilidad se encuentra entre las de 6 semanas a 6 meses de edad (5); sin embargo, la enfermedad también puede presentarse en perros adultos no vacunados o parcialmente inmunizados (7). Las tasas de letalidad en cachorros y adultos no vacunados consecuencia del proceso infeccioso rondan un 90 % y 10 % respectivamente (20, 21).

El agente etiológico responsable es el *Protoparvovirus carnívoro 1* (PPVC-1, por sus siglas del Inglés *Carnivore protoparvovirus 1*); un virus altamente transmisible que afecta principalmente el sistema digestivo de los perros, ocasionando emesis, diarrea, deshidratación e inmunosupresión, tales signos clínicos llevan a la muerte de la mascota si no recibe tratamiento de soporte oportuno y adecuado (2, 22). La Parvovirus canina también posee una presentación clínica miocárdica y nerviosa, adicional a la forma entérica clásica (5, 6).

Todos los perros domésticos independientemente de la edad, raza o sexo tienen probabilidades de infectarse por el PPVC-1. Sin embargo, dado que el título de anticuerpos (Ac) de origen materno contra el virus tiende a disminuir pasados los 10 primeros días del nacimiento, los cachorros en el intervalo de edad previamente descrito tienden a ser más susceptibles a contraer la infección (23). En determinadas razas como el Labrador Retriever, Pastor Alemán, Dóberman Pinscher, Pit Bull Terrier Americano, Rottweiler y Springer Spaniel Inglés, se ha evidenciado un alto riesgo de desarrollar un cuadro clínico grave en relación a los perros mestizos, dicha afectación se atribuye a un componente genético (1, 22). También, se ha descrito que los machos enteros con edades superiores a los 6 meses poseen el doble de probabilidades de presentar un cuadro gastroentérico por el PPCV-1 que las hembras en la misma condición (23). Otros factores adicionales a la falta de inmunidad protectora, como la presencia de parásitos intestinales, el hacinamiento y el estrés, predisponen a los cachorros a la infección por el PPVC-1 (5, 23).

3.2. Taxonomía

La familia *Parvoviridae* está integrada por dos subfamilias: *Densovirinae* y *Parvovirineae*. Las especies virales de la subfamilia *Densovirinae* infectan a invertebrados, mientras que las de la subfamilia *Parvovirineae* infectan a varios hospederos vertebrados como, humanos, cerdos, ganado bovino, roedores, carnívoros domésticos y silvestres (24 - 26). Recientemente, se ha revisado la nomenclatura y la clasificación (Taxonomía) de los virus

de la subfamilia *Parvovirinae*, en especial del *Parvovirus canino tipo 2* (PVC-2), el cual ha sido incluido dentro del género *Protoparvovirus* como una subespecie del PPVC-1 (12, 27), junto con el virus de la Panleucopenia felina (FPV), el Parvovirus del mapache (RPV), el virus de la Enteritis del visón (MEV), y el Parvovirus del zorro azul (BFPV) (22, 25), Ver *Tabla 1*. Particularmente, el FPV y el PVC-2 comparten un 98 % de homología en la secuencia de ADN, razón por la cual son considerados como la misma especie viral, diferenciándose en tan solo dos aminoácidos (aa) de la proteína VP2 componente de la cápside viral (4, 10, 11).

Tabla 1. Taxonomía del *Protoparvovirus carnívoro 1*.

Dominio	Monodnaviria
Reino	Shotokuvirae
Filo	Cossaviricota
Clase	Quintoviricetes
Orden	Piccovirales
Familia	Parvoviridae
Subfamilia	Parvovirinae
Género	Protoparvovirus
Especie	<i>Protoparvovirus carnívoro 1</i> (<i>Parvovirus canino tipo 2</i> y <i>Virus de panleucopenia felina</i>)

3.3. Estructura del virión del PPVC-1

El PPVC-1 es un virus pequeño, de simetría icosaédrica, sin envoltura lipídica, con un diámetro de 25 nm. Contiene un genoma de ADN monocatenario lineal con 5.200 nucleótidos, que codifica dos marcos abiertos de lectura (ORFs, del Inglés Open reading frame). Un ORF codifica para las proteínas no estructurales, NS1 y NS2, y el otro ORF para las proteínas estructurales VP1 y VP2 (1, 11, 12, 24).

La NS1 es una fosfoproteína nuclear pleiotrópica que juega un papel esencial en la replicación del ADN viral. También, regula la expresión génica, organiza el ADN en el interior de la cápside e induce y controla el proceso de muerte celular por apoptosis una vez que culmina el proceso de replicación viral. Por otro lado, la proteína NS2 participa ensamblando y regulando la expresión génica (23, 25, 28).

VP2 es la principal proteína antigénica capaz de inducir anticuerpos protectores, es la que por otro lado determina el tropismo tisular, el intervalo de hospederos a los que afecta el PPVC-1, en resumen, es la proteína que media la interacción virus-hospedero (29). El ingreso del virión al interior de la célula susceptible se efectúa mediante la interacción de la VP2 con el receptor de Transferrina (TfR) (16, 25). Por cambios leves en la secuenciación

de aminoácidos de la VP2, el grado de afinidad por el TfR varía, alterando la capacidad infectiva y el intervalo de hospedadores; de esta manera se explica la aparición de diferentes variantes de la subespecie PVC-2. Mientras que la proteína VP1 controla el transporte nuclear de los componentes virales (23, 28).

La cápside viral se encarga de empacar, proteger y mediar el proceso adherencia e invasión de las células diana para continuar con la siguiente etapa de replicación. También es la estructura hacia donde se dirigen los anticuerpos capaces de neutralizar el virus y juega un rol decisivo en el intervalo de hospederos a los que afecta (11, 26). Esta estructura de la partícula viral está compuesta por 60 subunidades proteicas o capsómeros constituidos con 5-6 copias de VP1, 54-55 copias de VP2, esta última corresponde aproximadamente al 90 % de las proteínas de la cápside (30). Las características de la superficie de la cápside incluyen un área elevada (punta) que rodea el eje de simetría triple una depresión (hoyuelo) que abarca el eje de simetría doble y un área más deprimida (cañón) que rodea el eje de simetría quántuple de la cápside (1, 22).

La carencia de envoltura lipídica hace que el PVC-2 sea extremadamente resistente a la inactivación por desinfectantes o detergentes, además de soportar temperaturas de 56 °C por más de una hora en un ambiente con valores de pH de 3 a 9. Esto explica la viabilidad del virus que puede mantener durante largos períodos (más de 5 meses o del año), en el ambiente o en fómites (prendas de vestir, comederos, bebederos, etc), favoreciendo con ello la transmisión a perros susceptibles (4). Entre los desinfectantes que resultan eficaces contra el PPVC-1 se incluyen los que tienen como principio activo el Hipoclorito de Sodio, Dióxido de Cloro, Peróxido de Hidrógeno y el Peroximonosulfato de Potasio (1, 7, 10).

3.4. Origen y evolución genética de la PVC-2 subespecie del PPVC-1

El PVC-2, subespecie del PPVC-1 se identificó por primera vez a mediados del año de 1970 y se le denominó así para distinguirlo del Virus diminuto canino (MVC), otro Parvovirus capaz de infectar a los perros (12, 25, 31). Es probable que el PVC-2 surgiera a partir de una variante del FPV, al seleccionarse mutaciones que le permiten unirse al TfR, es decir un salto de hospedador, de felinos a cánidos (16, 20), *Ver Figura 1*. Por tanto el TfR desempeña un rol importante en la susceptibilidad de las células a la infección por este virus (22, 30).

Bastaron únicamente tres cambios en los aminoácidos de la proteína VP2, en la posición 93 (Lys a Asn), 103 (Val a Ala) y 323 (Asp a Asn), para que el ahora PVC-2 adquiriera la capacidad de unirse al TfR canino. Aunque esto también implicó la pérdida de la capacidad infectiva en hospedadores felinos debido a cambios adicionales de los residuos de VP2 80 (Lys a Arg), 564 (Asn a Ser) y 568 (Ala a Gly). Mediante esta exitosa transferencia viral

entre especies, el PVC-2 pudo adaptarse, infectar y originar una pandemia en los cánidos (perros, lobos y coyotes) (22, 30).

3.5. Variantes antigénicas del PVC-2 (PPVC-1)

El PVC-2 en su proceso evolutivo, mutó y fue reemplazado paulatinamente por tres variantes antigénicas (PVC-2a, PVC-2b y PVC-2c) que al parecer resultan más virulentas para el hospedador que la variante original (7), *Ver Figura 1*. La evolución viral mantuvo la secuencia de nucleótidos idénticos en más del 99%, con solo un número limitado (<40) de sustituciones que se vuelven fijas o generalizadas (32). Principalmente, el cambio en la posición 426 de la proteína VP2 afectó una de las regiones antigénicas de las variantes, permitiendo la replicación y propagación del virus de forma eficaz en poblaciones de perros susceptibles (11, 25). En dicha posición se muestra el aminoácido Asparagina (Asn) en PVC-2a, Aspartato (Asp) en PVC-2b, y Glutamato (Glu) en PVC-2c (8, 31).

3.5.1. Variante PVC-2a

Entre los años de 1979 y 1982 en varios países como Estados Unidos, Japón, Bélgica y Australia, el PVC-2 original fue gradualmente sustituido por la variante antigénica PVC-2a (25, 30). Esta variante difiere de la original en tan sólo 6 cambios de aminoácidos en la secuencia proteica de la VP2, los cuales corresponden a los residuos 87 (Met a Leu), 101 (Ile a Thr), 103 (Val a Ala), 300 (Ala a Gly), 305 (Asp a Tyr) y 555 (Val a Ile). Debido a cambios específicos en los residuos 87, 300 y 305, PVC-2a incrementó su infectividad y recuperó la capacidad de replicación en felinos domésticos y salvajes, además de mostrar capacidad de infectar a otros carnívoros (22, 30).

3.5.2. Variante PVC-2b

La variante PVC-2b fue identificada por primera vez en 1984 en los Estados Unidos, se diferencia de la PVC-2a en tan sólo dos cambios de aminoácidos en la cadena proteica de la VP2, los cuales corresponden a las posiciones 426 (Asn a Asp) y 555 (Ile a Val). La sustitución del residuo 555 representó una restauración de la posición de la secuencia original del PVC-2, y únicamente el cambio en el residuo 426 representó al epítipo alterado como exclusivo para PVC-2b. PVC-2b muestra capacidad para infectar felinos y carnívoros salvajes (22, 30).

3.5.3. Variante PVC-2c

La identificación de la variante PVC-1c fue notificada en Italia alrededor del año 2000 (4, 25), sin embargo, en otra investigación se evidenció que esta variante ya se encontraba circulando en Alemania desde 1996, años antes de haberse reportado en Italia (17). PVC-2c cuenta con la presencia Ala y Val en las posiciones 297 y 555 respectivamente, y se

diferencia de las variantes anteriores por la presencia del aminoácido Glu en el residuo 426 de la proteína VP2 de la cápside viral (22, 25).

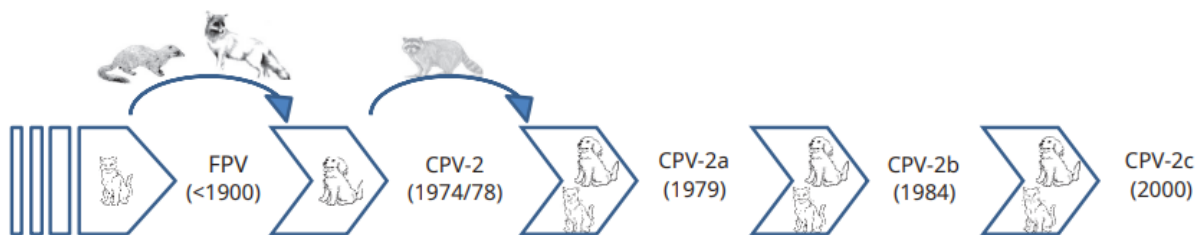


Figura 1. Proceso evolutivo del PVC-2, subespecie del PPVC-1. Fuente: Miranda et al. (22).

3.6. Distribución de las variantes antigénicas del PVC-2 (PPVC-1)

Actualmente, las tres variantes del PVC-2 circulan globalmente en la población canina, siendo reportado en 42 países de los cinco continentes (12). Sin embargo, la frecuencia de distribución varía entre países, así por ejemplo, en 37 países se ha evidenciado la presencia de la variante PVC-2a, en 31 países la PVC-2b y finalmente en 21 países la variante PVC-2c (22), Ver Figura 2.

Variante PVC-2a



Variante PVC-2b



Variante PVC-2c



Figura 2. Distribución mundial de las variantes antigénicas del PVC-2 en perros domésticos. Fuente: Miranda et al. (22).

Diferentes estudios epidemiológicos muestran la predominancia de la variante PVC-2a en la mayoría de países asiáticos y en Australia. Mientras que en muchos países de Europa como, Reino Unido, Irlanda, Alemania, Italia, así como en Estados Unidos y ciertos países

de África, se encuentra que las variantes antigénicas PVC-2b y PVC-2c son las más frecuentes (29). Por otro lado, la variante antigénica PVC-2c se ha evidenciado que circula frecuentemente en la población canina de países de América del Sur (Uruguay, Argentina, Brasil, Ecuador) (16, 28).

Específicamente para el caso de Ecuador, tres estudios de caracterización molecular muestran una heterogénea circulación de las variantes antigénicas del PVC-2. En el primer estudio, Aldaz *et al.* (13) notificaron una mayor frecuencia (54,7 %) de la variante PVC-2c en perros de la ciudad de Guaranda, en contraste a la 2a (41,5 %) y 2b (3,8 %). Mientras que en los dos últimos estudios efectuados en Quito y Cuenca por Erazo (14) y Clavijo (15) respectivamente, se mostró una prevalencia superior de PVC-2a (55,7 %; 47,6 %) seguida de la variantes PVC-2c (33,3 %; 38,1 %) y PVC-2b (8,3 %; 14,19 %) en los perros que formaron parte del estudio.

3.7. Severidad de la infección por las variantes antigénicas del PPVC-1

La heterogeneidad genética de las variantes del PPVC-1 ha llevado a la especulación sobre una mayor o menor virulencia de las variantes antigénicas; sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha demostrado de manera consistente y sólida una asociación entre las variantes antigénicas y la severidad de la infección, salvo en ciertos estudios en los que se ha reportado de manera eventual (24). En este contexto, Zhao *et al.* (16) señala que las variantes PVC-2a y PVC-2b pueden causar una enfermedad más grave en los perros, respecto a la variante original. Mientras que Moon *et al.* (33) reportaron altas tasas de letalidad en perros infectados con la variante PVC-2a, evidenciando una mayor virulencia por parte de esta variante si le compara con la variante PVC-2b. Por otro lado, en el estudio realizado por Spibey *et al.* (34) la mitad de los perros infectados gravemente por PVC-2c debieron ser sacrificados, lo que sugiere signología clínica más grave y alta letalidad por esta variante. Con la misma tendencia, Decaro *et al.* (17) informaron una enfermedad menos grave en los cachorros infectados con la variante PVC-2c, los cuales se recuperaron en pocos días. Adicionalmente, Markovich *et al.* (31) no evidenciaron que la variante PVC-2c genere una enfermedad más grave al comparar con perros infectados con PVC-2b.

3.8. Patogenia de la infección por el PPVC-1

La infección se adquiere por la vía oro-nasal a través del contacto directo con partículas virales excretadas en el vómito o en las heces de los perros enfermos, o por contacto indirecto con fómites contaminados (4, 20). Los insectos así como los roedores pueden funcionar como vectores mecánicos para transmitir el virus (7). Usualmente el PPVC-1

puede excretarse en fases tempranas de la infección, alcanzando un pico máximo a los 7 días y mostrando una disminución a partir del día 10 *post* infección; sin embargo, la eliminación del ADN viral se ha evidenciado que puede prolongarse hasta 50 días *post* infección (17, 23, 35).

Para causar una infección productiva, el PPVC-1 requiere que las células hospedera adicional a la alta actividad mitótica, que expresen el TfR (7). El TfR media la adherencia del virión del PPVC-1 mediante la cápside viral y la invasión viral vía endocitosis, sucediéndose así el ingreso del virus al interior de la célula diana (30) y su posterior replicación en el núcleo celular de tejidos mitóticamente activos, como es el caso del tejido linfoide, intestinal y de la médula ósea (4, 16). Sin embargo, las células cardíacas y cerebrales también muestran susceptibilidad a la infección por el PPVC-1.

El PPVC-1 inicia su replicación en las células de los nódulos linfáticos orofaríngeos y mesentéricos, además del timo. Se continua con una viremia que lleva a la diseminación por todo el cuerpo a través de la vía hematógena, esta viremia se produce en 1 a 5 días *post* infección (7, 22). Después de un período de incubación, que puede variar de 4 a 14 días, la diseminación del virus conlleva el inicio de los signos clínicos entéricos, como emesis y diarrea hemorrágica. Estos signos se explican por el colapso, atrofia y acortamiento de las vellosidades intestinales, y por la mala absorción de nutrientes junto con el agua, derivado de la infección del epitelio germinal de las criptas intestinales (23). Junto con el daño generado a nivel de las criptas del epitelio intestinal, el PPVC-1 causa alteraciones en los epitelios de la cavidad oral, en la médula ósea y miocardio principalmente; aunque también pueden verse afectados órganos como, pulmones, bazo, hígado, riñones y cerebro (7, 22). Adicionalmente, la infección provoca la destrucción y el colapso de la corteza tímica, la destrucción de los precursores de leucocitos en la médula ósea, e incrementa el riesgo de una bacteremia (4).

Por lo tanto, la falla del sistema inmune (linfopenia, panleucopenia) conjuntamente con el cuadro hipovolémico y la bacteremia secundaria, llevan al paciente canino a presentar choque, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, falla multiorgánica, coagulación vascular diseminada (CID) y muerte, si no recibe tratamiento de soporte adecuado. Estos sucesos en conjunto contribuyen significativamente a la severidad y letalidad de la enfermedad (4, 24).

3.9. Formas de presentación clínica

La Parvovirus canina clínicamente se presenta en tres formas: entérica, cardíaca y neurológica. Usualmente las formas entérica y cardíaca, rara vez se presentan juntas, pero en ocasiones se ha informado una infección generalizada por PPVC-1 con lesiones

neurológicas (21). A su vez, la severidad de los signos clínicos dependerá mucho de factores como la edad, la variante antigénica y la inmunidad del hospedador; esta última se ve afectada por factores estresantes como el destete, el hacinamiento, y por la cantidad de anticuerpos maternos adquiridos (4).

3.9.1. Forma entérica

La forma entérica se describe como la presentación clínica más común de la Parvovirus canina, ya que el epitelio intestinal se regenera activamente incluso en animales de cualquier edad (9, 36). En particular, el destete como factor estresante contribuye a que los cachorros de entre 6 semanas y 6 meses de edad adquieran la infección, debido a que en esta etapa se producen cambios tanto en la dieta como en la microbiota intestinal, haciendo que los enterocitos de las criptas intestinales incrementen aún más su índice mitótico, volviéndose el blanco perfecto por el virus (23).

Los perros infectados en un principio muestran signos inespecíficos como hipertermia/hipotermia, letargia, depresión, inapetencia, anorexia, y dolor abdominal (31). Posteriormente, se evidencia signos clínicos entéricos como emesis y diarrea de tipo mucoide que evoluciona a hemorrágica maloliente (4); la consecuente pérdida de líquidos y proteínas genera un cuadro grave de deshidratación que en muchos de los casos termina en un choque hipovolémico. A su vez el daño intestinal por el PPVC-1 incrementa el riesgo de translocación bacteriana y la subsecuente septicemia por coliformes (Ej. *Escherichia coli*), ocasionando una respuesta inflamatoria sistémica, un choque séptico y en última instancia, la muerte del paciente (22, 23).

3.9.2. Forma cardíaca

La segunda forma de presentación clínica de la infección por el PPVC-1 es la miocarditis o síndrome cardíaco (37). Generalmente, cuando los cachorros nacen, la síntesis de ADN en los cardiomiocitos se eleva y conforme van creciendo dicha síntesis se reduce; es por ello que se favorece la infección y la replicación del PPVC-1 en los cardiomiocitos de cachorros menores a los 3 meses de edad (21); destacándose un periodo de mayor susceptibilidad para la infección del miocardio, hasta las 2 primeras semanas de edad del cachorro (8). También es común que los cachorros adquieran la infección cuando estos aún se encuentran en el útero materno, debido a la falta de inmunidad de la progenitora (7).

La infección de los cardiomiocitos por el PPVC-1 causa una miocarditis necrosante que consecuentemente lleva a la presentación de una insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) o a la muerte súbita del cachorro (24). Se describen dos tipos de insuficiencia cardíaca, una insuficiencia cardíaca aguda que generalmente ocurre en cachorros de entre 4 y 8 semanas

de edad, y una insuficiencia cardíaca subaguda que usualmente afecta a cachorros mayores de 8 semanas. Según estudios, de una camada infectada es muy probable que el 70 % de los cachorros muera por ICC a las 8 semanas de vida, mientras que el 30 % restante tenga cambios patológicos que conducirán a la muerte del perro meses o años después (37).

Aunque los cardiomiocitos tienden a infectarse en etapas tempranas (> 2 semanas *post* parto), los signos clínicos de daño miocárdico pueden retrasarse hasta los 2 meses de edad. Clínicamente, los cachorros suelen estar taquipneicos o disneicos, especialmente cuando hacen ejercicio. También pueden tener un aumento de los ruidos pulmonares como resultado de la ICC. Asociado al choque séptico se muestra taquicardia o bradicardia, obnubilación mental, y pulso débil, además de arritmias. No suele evidenciarse episodios de diarrea ya que el virus invade rápidamente el miocardio inmaduro sin alcanzar a infectar el epitelio intestinal (7, 37).

La muerte, en la mayor parte de casos con miocarditis parvoviral, se atribuye a un choque cardiogénico y generalmente ocurre 24 horas posteriores a la aparición de los signos clínicos; aunque si el cachorro sobrevive es probable que presente complicaciones cardiovasculares crónicas en el futuro. En el cachorro agonizante se aprecia mucosas pálidas, hipotermia, respiraciones pausadas o convulsiones fulminantes. En otros casos la muerte ocurre de forma súbita, particularmente cuando los cachorros tienen una edad aproximada de 3 o 4 semanas (4, 37).

3.9.3. Forma nerviosa

Una tercera forma de presentación y poco estudiada de la Parvovirus canina, es la afectación nerviosa. Durante los primeros días de vida de los cachorros es común encontrar lesiones cerebrales por la infección del PPVC-1, debido a que el SNC experimenta una activa síntesis de ADN, volviéndose blanco de múltiples patógenos (en este caso viral) que interfieren en el proceso de migración celular de la capa germinal y en la adecuada formación de células nerviosas. Usualmente las células de la capa germinal externa del cerebelo se dividen hasta las 10 semanas *post* nacimiento en caninos y felinos, hecho que evidencia neurogénesis conforme los órganos nerviosos se desarrollan (19, 22). Así también, se ha demostrado la replicación del PPVC-1 en las células de Purkinje del cerebelo en gatos, ratones y perros. Las células de Purkinje pueden expresar el TfR que facilita la entrada viral tanto del PVC-2 como del FPV (9).

Se suele encontrar, leucoencefalomalacia y encefalitis en el SNC, como lesiones principales generadas por la infección del PPCV-1 en estos tejidos. La leucoencefalomalacia ha sido un hallazgo bastante frecuente en la sustancia blanca periventricular, debido a que esta zona

es poco vascularizada y demanda mayores requerimientos de Oxígeno cuando el perro aún es cachorro (6). También se ha descrito hipoplasia cerebelosa secundaria a una infección viral intrauterina, aunque este es un hecho poco común en los perros infectados por el PVC-2, pero sí bastante frecuente en gatitos con FPV (7, 9, 10). El FPV al destruir la capa celular externa, que da origen a las células granulares del cerebelo, provoca la atrofia o hipoplasia notable y difusa del mismo (19).

Sin embargo varios autores convergen en que la mayor parte de las lesiones cerebrales se atribuyen a las masivas alteraciones cardiovasculares y gastrointestinales ocasionadas por la infección viral por el PVC-2. Por lo general, la miocarditis necrosante conduce a un estado hipóxico - isquémico ocasionando degeneración neuronal y axonal, cicatrices gliales, pérdida de mielina y necrosis licuefactiva en el cerebro (6, 9). Así mismo, la falta de absorción de nutrientes por los enterocitos, la bacteremia secundaria y la falta de reservas suficientes de Glucógeno hepático y muscular, como parte de la afección entérica conducen a una hipoglucemia significativa con neurogluopenia y desarrollo de convulsiones (4).

Los signos clínicos neurológicos varían en severidad y suelen evidenciarse cuando adquieren la infección entre la segunda y tercera semana de vida de los cachorros, antes de que se inicie el calendario de vacunación, lo que sugiere además una infección perinatal o intrauterina como se describe en el gato (9). Entre los signos evidenciados por Schaudien *et al.* (9) se incluyen, temblores musculares de las extremidades y caminar tambaleante en los casos más leves de Parvovirus canina, e incapacidad para desplazarse, beber y alimentarse en los cachorros severamente afectados, además de apreciarse una baja condición corporal. Adicionalmente, la afectación cerebral conlleva cambios de comportamiento como la ansiedad o la agresión provocada por el miedo (20).

3.10. Hallazgos patológicos

Las lesiones macroscópicas en los pacientes, provocados por la infección del PPVC-1 son muy variables y relativamente inespecíficas.

En la forma entérica se puede observar, enteritis con engrosamiento de la pared intestinal y hemorragia serosa o congestión en los segmentos afectados. Al inicio del proceso infeccioso las porciones proximales del intestino delgado muestran lesiones, mientras que el intestino grueso no suele verse afectado, sin embargo no se descarta su afección. El intestino puede contener heces líquidas que varían de amarillentas a hemorrágicas. También los nódulos linfáticos abdominales se encuentran agrandados y edematosos (7, 38). *Ver Figura 3.*

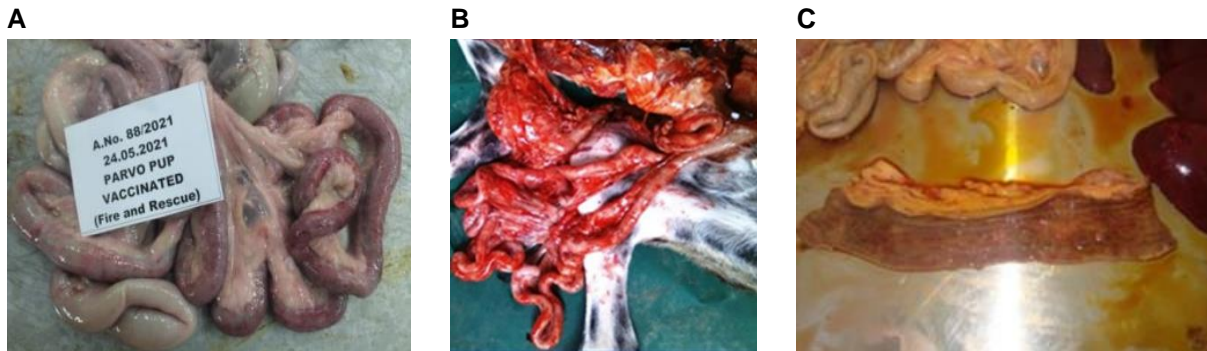


Figura 3. Lesiones macroscópicas en el intestino. **A.** Hemorragia difusa en la superficie serosa del Yeyuno. **B.** Intestino delgado hiperémico. **C.** Intestino delgado con líquido hemorrágico y congestión lineal. Fuentes: Mahaprabhu *et al.* (38); Kumari *et al.* (36); Behera *et al.* (39).

En la forma miocárdica, las lesiones macroscópicas incluyen un agrandamiento cardíaco con dilatación prominente del lado izquierdo (aurícula y ventrículo), viéndose afectado con mayor frecuencia el ventrículo izquierdo. Además se describe la presencia de líneas pálidas o blanquecinas en el miocardio, asociadas a la presencia de un infiltrado celular (1, 37). Ver *Figura 4*.

Mientras que en la forma neurológica se ha evidenciado lesiones que incluyen encefalitis y leucomalacia (6).

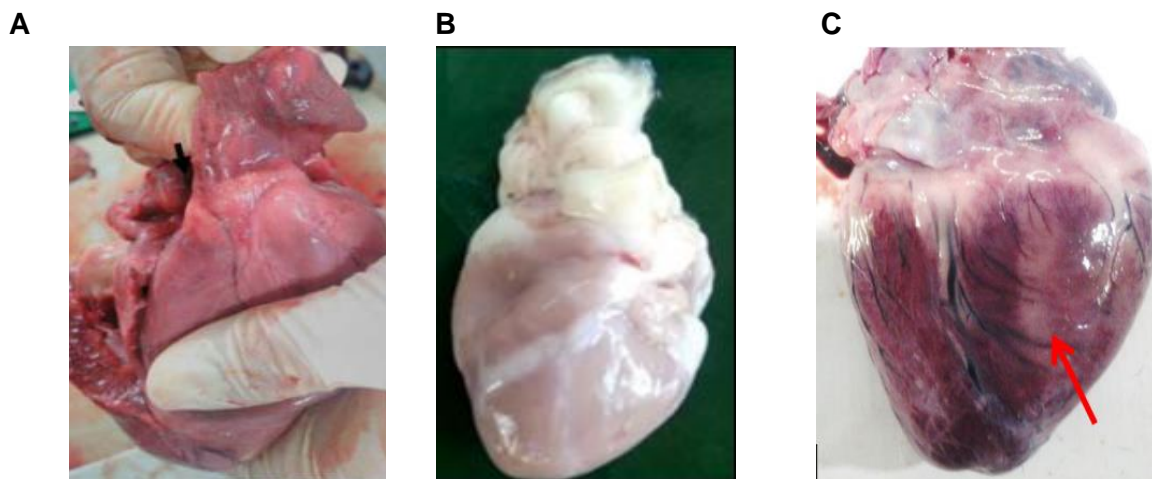


Figura 4. Lesiones macroscópicas en el corazón. **A.** Placa blanquesina e irregular en la superficie capsular del surco coronario. **B.** Aspecto pálido del corazón. **C.** Necrosis miocárdica con rayas pálidas en el miocardio. Fuente: Ain *et al.* (5); Kumari *et al.* (36); Fagbohun *et al.* (40).

3.11. Diseminación de las variantes del PVC-2 en órganos internos

Las investigaciones efectuadas por Decaro *et al.* (17) y Zhao *et al.* (16), así como algunos reportes de casos realizados por Fagbohun *et al.* (40), Kumari *et al.* (36), Ain *et al.* (5), demuestran una amplia distribución de las variantes antigénicas del PVC-2 en todos los tejidos evaluados *post mortem* de pacientes con Parvovirus canina; es importante

destacar que en el primer estudio mencionado (17) se evidenció cargas virales más altas en los órganos internos en relación a las encontradas en muestras fecales. Entre los órganos muestreados en éstas investigaciones se incluyen: Nódulos linfáticos (retrofaríngeos, mesentéricos), Timo, Pulmones, Corazón, Hígado, Bazo, Riñones, Vejiga Urinaria, Duodeno, Yeyuno, Íleon, Colon, Recto, Cerebro y Médula ósea.

3.12. Diagnóstico

La anamnesis (edad, estado vacunal, etc), el examen físico general y los signos clínicos del paciente constituyen un punto de partida para el diagnóstico presuntivo de la Parvovirus canina. Sin embargo, la Parvovirus canina puede confirmarse con la aplicación de diferentes pruebas clínicas o de laboratorio, como el: Ensayo de Inmunocromatografía (IC), Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzima para muestras fecales (ELISA [por las siglas en Inglés de Enzyme-linked immunosorbent assay] tipo *sándwich*), Hemaglutinación, Inhibición de la Hemaglutinación, Microscopía electrónica y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por las siglas en Inglés de Polymerase chain reaction) (4).

La Inmunocromatografía es la prueba más utilizada en la práctica clínica veterinaria, al ser sencilla y rápida. Sin embargo, requiere altas cantidades del antígeno viral en muestra colectada para arrojar un resultado confiable, es por ello que su sensibilidad diagnóstica no supera el 50 % al compararla con las pruebas moleculares (41). Otra prueba de diagnóstico rápido y eficaz es el ELISA de captura o tipo *sándwich*, que presenta alta sensibilidad y especificidad diagnóstica de intermedia a baja, al compararla con la PCR (42). Además en otro formato, el ELISA indirecto permite identificar anticuerpos tipo IgM específicos para el PPVC-1, que suelen encontrarse en fases tempranas de la infección y desaparecer entre la segunda y tercera semana *post* infección (4).

La Hemoaglutinación es simple y rápida para detectar el PPVC-1 en muestras fecales utilizando Eritrocitos porcinos, debido a la capacidad de los viriones para aglutinar los eritrocitos de esta especie, sin embargo es menos sensible que las pruebas moleculares. Mientras que la Inhibición de la hemaglutinación resulta ser más específica a nivel diagnóstico, debido al uso de ciertos anticuerpos contra el antígeno viral. Sin embargo, las dos pruebas anteriormente citadas están disponibles limitadamente en laboratorios especializados (31).

Por otro lado, la PCR ha demostrado ser la prueba más sensible y específica para diagnosticar la infección por el PPVC-1. Se han descrito ensayos de PCR convencional que muestran una sensibilidad diagnóstica del 93,15 % en relación con una qPCR (PCR cuantitativa o en tiempo real) como prueba de referencia (3). Este ensayo de biología molecular requiere tan sólo una cantidad mínima de ADN para ser viable la amplificación, en

un periodo de tiempo de entre 2 a 4 horas, y con ello hacer evidente el material genético viral presente en la muestra y por tanto considerarse como un caso positivo a la infección. La PCR es sobre todo una prueba de elección en pacientes negativos a otras pruebas diagnósticas, pero con claros signos clínicos de la enfermedad, sin embargo no está disponible de inmediato en la clínica por el alto costo que implica (4, 43).

3.13. Tratamiento paliativo ante la infección por el PVC-2

El tratamiento de la Parvovirus canina se orienta únicamente a combatir o reducir la intensidad de los signos clínicos que exhibe el paciente. Por tal motivo, la primera medida terapéutica consiste en instaurar fluidoterapia y con ello compensar las pérdidas de líquido intersticial, restaurar el volumen de líquido intravascular y mantener el estado de hidratación. La fluidoterapia concomitante con la aplicación de terapias farmacológicas complementarias en las que se incluyen, antieméticos, antimicrobianos, analgésicos, protectores gástricos y una adecuada nutrición, ayudan notablemente a mejorar el pronóstico del cachorro. Esto se logra con el establecimiento de un acceso vascular periférico (Cefálica) o central (Yugular), para ello el catéter debe colocarse con estricta asepsia debido al riesgo por el concomitante deterioro inmunológico del cachorro (4, 10, 18).

La terapia profiláctica antimicrobiana impide que las bacterias intestinales translocadas lleven al desarrollo de una bacteremia, sobre todo cuando existe inmunosupresión (Leucopenia, Neutropenia, Linfopenia). Una combinación de fármacos de tipo β -Lactámico, como las Aminopenicilinas o Cefalosporinas con Aminoglucósidos o Fluoroquinolonas, ha demostrado tener un adecuado espectro antimicrobiano para combatir estos patógenos. Sin embargo, se debe considerar que los Aminoglucósidos (Ej. Amikacina, Gentamicina, Kanamicina) son nefrotóxicos y las Fluoroquinolonas (Ej. Enrofloxacin) están asociadas con daños en el cartílago de crecimiento en cachorros de rápido desarrollo. Debido a ello los autores sugieren únicamente un tratamiento de Aminopenicilinas (Ej. Ampicilina, Amoxicilina) con Cefalosporinas de tercera generación (Ej. Cefotaxima, Cefazolina, Ceftiofur), que propocionan una cobertura farmacológica amplia contra los patógenos bacterianos en la enteritis parvoviral (7, 40).

El intenso cuadro gastroentérico de la Parvovirus canina, lleva al paciente a experimentar dolor abdominal con el riesgo de agravarse por el desarrollo de Íleo paralítico e intususcepción intestinal, resultando indispensable una terapia analgésica de rescate. Se recomienda los opioides agonistas parciales por los receptores μ (Mu) del SNC (Ej. Buprenorfina), porque tienen menores efectos negativos en el vaciado gástrico y en la motilidad del tracto gastrointestinal, sin embargo no están disponibles de forma inmediata

en la clínica por su uso controlado. Optando por utilizar otros fármacos como la Dipirona o Metamizol, que actúa sobre los receptores μ , efecto espasmolítico y que provee buena analgesia visceral ante el dolor abdominal. Así también, la Lidocaína en infusión continua o en bolos promueve la motilidad gastrointestinal y proporciona cierto grado de analgesia. También el uso de Citrato de Maropitant induce analgesia visceral (4, 23).

Adicionalmente, el uso de fármacos antieméticos como el Citrato de Maropitant, la Metoclopramida y el Ondansetrón han demostrado tener similar efectividad al reducir los episodios de emesis, controlando con ello la pérdida de líquidos y favoreciendo la ingesta de alimento de manera temprana (23). La nutrición enteral o parenteral en el paciente con Parvovirus canina se debe instaurar tan temprano como sea posible, con el objetivo de evitar que los enterocitos y las criptas intestinales se atrofien, y lograr una adecuada recuperación del epitelio intestinal al disminuir la permeabilidad de la pared intestinal ante bacterias y toxinas. En varios estudios se ha demostrado que la nutrición enteral temprana reduce significativamente la tasa de letalidad, que se traduce en una pronta recuperación del paciente y menor tiempo de hospitalización, en comparación con la restricción de alimento hasta el cese del cuadro emético (4).

Materiales y métodos

4.1. Descripción del estudio

Se recolectaron muestras (hisopados rectales; tejido intestinal, cardíaco, y del SNC) de un total de 27 cadáveres de caninos (*Canis lupus familiaris*) que fallecieron con un diagnóstico presuntivo/confirmado de Parvovirus canina, independientemente del sexo, raza, o edad. Se consideró posible detectar en al menos un cadáver de un total 25 la variante antigénica menos frecuente del PVC-2; de acuerdo a lo reportado por Clavijo (15), quien encontró las siguientes frecuencias, variante 2a con 47,6 %; 2c con 38,1 % y finalmente 2b con el 14,3 %.

El material biológico (cadáveres) así como la historia clínica del paciente se obtuvo de distintas Clínicas Veterinarias de la región previo consentimiento informado. Posteriormente, se efectuó el respectivo análisis molecular de las muestras colectadas en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCCA) de la Universidad de Cuenca.

4.2. Actividades experimentales

4.2.1. Actividad experimental No. 1: Colecta, conservación, transporte y almacenamiento del material biológico

4.2.1.1. Materiales

4.2.1.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- Guantes
- Equipo de disección
- Hisopos estériles
- Tubos vacutainer con tapa lila (EDTA)
- Tubos Falcon estériles
- Rotulador
- Cooler
- Gel refrigerante no tóxico (cadena de frío)
- Set de micropipetas
- Caja térmica
- Cristalería de laboratorio
- Refrigerador (4°C)
- Ultracongelador (-80°C)
- Platina de calentamiento y agitación magnética
- Potenciómetro (pH metro)

- Autoclave
- Equipo de filtración (\varnothing 0.22 nm).
- Vórtex
- Balanza analítica

4.2.1.1.2. Materiales biológicos

- Cadáveres de caninos con diagnóstico presuntivo o establecido mediante ensayos de flujo lateral (*test* rápido) de Parvovirus canina, *Ver Anexo B*.

4.2.1.1.3. Reactivos y/o soluciones

- Solución de Conservación (Solución al 80 % de Etanol, con 10 mM de Tris-HCl (Sigma, Cat. No.: T4661) pH 8.0, 1 mM de EDTA (Sigma, Cat. No.: EDS) y 2.5 % de Glicerol (Sigma, Cat. No.: G5516)).

4.2.1.2. Colecta de hisopados rectales

Pasos a seguir:

Paso 1. Con un hisopo estéril se tomó muestras de heces del recto de los cadáveres y luego se introdujo el mismo en un tubo vacutainer previamente rotulado.

Paso 2. Los hisopados fueron transportados en un cooler con gel refrigerante no tóxico hacia el Laboratorio de Biología Molecular, donde se almacenaron en un ultracongelador a -80 °C hasta procesarlos y obtener el material genético.

4.2.1.3. Colecta de tejido intestinal, cardíaco y nervioso

Pasos a seguir:

Paso 1. Previo a la realización de la necropsia se colocó 9 ml de la solución de conservación en tubos tipo Falcon (10 ml).

Paso 2. Para acceder a los tejidos colectados se procedió a realizar la necropsia siguiendo el procedimiento descrito por Benavides *et al*, (44), *Ver Anexos C, D y E*. Luego se tomó la cantidad necesaria de tejido intestinal, cardíaco y del SNC, para cubrir 1 ml y obtener un volumen total de 10 ml.

Paso 3. Las muestras se transportaron en una caja térmica hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, lugar donde fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C. Tanto la solución de conservación como la refrigeración permitieron que los tejidos se mantengan viables por 6 a 8 meses.

4.2.2. Actividad experimental No. 2: Procesamiento de las muestras y purificación del ADN total

4.2.2.1. Materiales

4.2.2.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- Guantes
- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Microtubos Eppendorf de varios volúmenes
- Caja térmica
- Cristalería de laboratorio
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (- 20 °C)
- Ultracongelador (- 80 °C)
- Platina de calentamiento y agitación magnética
- Potenciómetro (pH metro)
- Autoclave
- Equipo de filtración (Ø 0.22 µm)
- Vórtex
- Baño María
- Microcentrífuga refrigerada

4.2.2.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de hisopados rectales almacenados en congelación (- 80 °C)
- Muestra de tejido intestinal, cardíaco y del SNC almacenado en la solución de conservación y mantenidas en refrigeración (4 °C)

4.2.2.1.3. Reactivos y/o soluciones

- 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 Isopropanol (Sigma, Cat. no.: 278475)
- Etanol al 70 % (Sigma, Cat. no.: E7148 y W4502)
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502)
- Solución TE 10:1 1X (Solución a 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM de EDTA).

4.2.2.2. Procesamiento de los hisopados rectales y purificación del ADN total

Pasos a seguir:

Paso 1. En cada tubo que contenía el hisopado rectal se añadió: 200 µl de agua destilada estéril, 250 µl de Solución de lisis 2X y 50 µl de Solución de Proteinasa K. Los tubos se agitaron en el vórtex por 5 a 10 segundos y se incubaron por una hora a 56 °C.

Paso 2. Concluido el periodo de incubación se retiró el hisopo de cada uno de los tubos, realizando presión sobre las paredes del tubo para liberar la mayor cantidad de la Solución de lisis, la misma que se tomó y colocó en un tubo Eppendorf, y se le adicionó un volumen (\pm 500 µl) igual de la solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1. Posteriormente cada uno de los tubos se mezcló en el vórtex por 10 a 15 segundos.

Paso 3. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 10 min a 4 °C para favorecer la separación de las fases. La fase acuosa (\pm 400 µl) se colectó en un nuevo tubo Eppendorf de 2,0 ml y le fue adicionado 2,5 volúmenes de Etanol al 100 % frío. Para favorecer el mezclado se invirtieron los tubos por 8 a 10 veces aproximadamente.

Paso 4. La mezcla obtenida se centrifugó a 12,000 x g por 10 min a 4 °C para precipitar la pastilla de ADN total y posteriormente se procedió a retirar el sobrenadante. Para continuar, se adicionó 500 µl de Etanol al 70 %, se centrifugó en las condiciones antes descritas y se eliminó por completo la solución de Etanol al 70 %.

Paso 5. Las pastillas de ADN obtenidas se secaron a temperatura ambiente por 8 a 12 horas, protegidas tanto del polvo como de la luz solar directa. Una vez secas las pastillas fueron resuspendidas en 20 µl de agua grado biología molecular y almacenadas a - 20 °C hasta utilizarse en los procesos de amplificación o PCR para el control de proceso y de ser viable el ADN total, la detección de material genético del PVC-2.

4.2.2.3. Procesamiento de los tejidos intestinales, cardíacos y del SNC, y purificación del ADN total

Pasos a seguir:

Paso 1. Se tomó de manera aséptica una cantidad aproximada de 100 mg de tejido (intestino, cardíaco, SNC), cada porción de tejido se colocó el tejido sobre papel absorbente estéril para eliminar por evaporación la mayor parte de la Solución de conservación.

Paso 2. Cada una de las muestras de tejido fueron colocadas en tubos Eppendorf y se le adicionó 200 µl de agua destilada estéril, 250 µl de la Solución de lisis 2X y 50 µl de la Solución de Proteinasa K. La preparación se mezcló en el vórtex y se incubó en baño María a 56 °C por 12 a 14 horas, aproximadamente.

Paso 3. Una vez finalizado el proceso de incubación, se agregó 500 µl de la Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1. La solución fue agitada vigorosamente en el vórtex durante 20 a 30 segundos.

Paso 4. Se continuó con los pasos 3, 4 y 5 descritos en el procesamiento de los hisopados rectales (Sección 4.2.2.2.). Salvo que en el paso 5, las pastillas de ADN fueron re-suspendidas en 50 µl de la Solución Buffer TE 10:1 1X, pH 8.0.

4.2.3. Actividad experimental No. 3: Ensayo de PCR de control de proceso para validación de las muestras de hisopados rectales y de tejido

4.2.3.1. Materiales

4.2.3.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- Guantes
- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Microtubos Eppendorf de varios volúmenes
- Caja térmica
- Cristalería de laboratorio
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (- 20 °C)
- Cabina de PCR
- Vórtex
- Picofuga
- Termociclador

4.2.3.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de ADN total previamente obtenido (Sección 4.2.2.) del material biológico colectado

4.2.3.1.3. Reactivos y/o soluciones

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).
- Enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen, Cat. No.: 10966-033) con la Solución Buffer de amplificación 10X y la Solución a 50 mM de MgCl₂.
- Solución de dNTP's 10 mM de cada uno (dNTP's set, Thermo-scientific, Cat. No.: R0182).
- Oligonucleotidos sentido DOGCyB-For (AATTGAATAGGGCCATGAA) (Invitrogen) y oligonucleotido antisentido DOGCyB-Rev (CTCCTCTTGTGTTTTAGTTAAGTTAATATG) (Invitrogen). Estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR de 808 bp (15).

4.2.3.2. Proceso de amplificación del control de proceso para validar la viabilidad del ADN total obtenido de los hisopados rectales, de los tejidos intestinal, cardíaco y del SNC

Pasos a seguir:

Paso 1. De acuerdo al número de muestras que se sometieron al proceso de amplificación en el ensayo de PCR de control de proceso, se elaboró una mezcla (*Ver Tabla 2*), para

llegar alcanzar un volumen final de reacción de 25 µl por cada muestra. La premezcla se agitó en el vórtex por 4 a 6 segundos y luego se centrifugó a máxima velocidad por 15 a 20 segundos en una picofuga.

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

Reactivo:	Concentración		Volumen por reacción:
	inicial:	final:	
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	18.65 µl
Buffer Amplificación 10X	10 X	1 X	2.5 µl
dNTP's	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.25 µl
MgCl ₂	50 mM	1.5 mM	1 µl
Oligonucleótido DOGCy8-For	100 µM	0.8 µM	0.2 µl
Oligonucleótido DOGCy8-Rev	100 µM	0.8 µM	0.2 µl
Enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0.05 U/µl	0.2 µl
Volumen final premezcla	---	---	23 µl
Muestra de ADN total	---	---	2 µl
Volumen final mezcla	---	---	25 µl

Paso 2. De la premezcla elaborada se tomaron 23 µl y se colocaron en tubos para PCR (200 µl) y se le adicionaron 2 µl de cada una de las muestra de ADN total y se llevaron al termociclador.

Paso 3. En el termociclador las muestras se sometieron por dos horas aproximadamente siguiendo el perfil de temperatura programado, *Ver Tabla 3.*

Tabla 3. Perfil de temperatura empleada en el ensayo de PCR para el control de proceso

Etapa	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura °C	94	94	55	72	72
Tiempo (min:seg)	5:00	0:30	0:25	0:45	5:00

4.2.4. Actividad experimental No. 4: Visualización de los productos de PCR de control de proceso para validación de las muestras de hisopados rectales de tejido intestinal, cardíaco y del SNC

4.2.4.1. Materiales

4.2.4.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- Guantes
- Set de micropipetas y sus puntas estériles
- Microtubos Eppendorf de varios volúmenes

- Caja térmica
- Cristalería de laboratorio
- Refrigerador (4 °C)
- Congelador (- 20 °C)
- Vórtex
- Pico fuga
- Cámara de electroforesis horizontal
- Horno de microondas.
- Transiluminador UV
- Fotodocumentador UV
- Computadora de escritorio con impresora

4.2.4.1.2. Materiales biológicos

- Reacciones de PCR previamente sometidas al proceso de amplificación

4.2.4.1.3. Reactivos y/o soluciones

- 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 de ADN (Invitrogen, Cat. no.: 15628050)

4.2.4.2. Resolución de las reacciones de PCR del control de proceso para la validación de las muestras de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos intestinal, cardíaco y del SNC

Pasos a seguir:

Paso 1. Esta etapa experimental se inició con la preparación de gel de agarosa-TAE al 1,2 %, teñido con Bromuro de etidio, para lo cual en una probeta se colocó 30 ml (8,2 X 10,5 cm) o 90 ml (23,9 X 20 cm) de la Solución buffer TAE 1X y se le adicionó la cantidad necesaria de agarosa (Ej. Gel de 23,9 X 20 cm al 1,2 %, 1,08 g).

Paso 2. Posteriormente se llevó al horno de microondas para disolver totalmente la agarosa, calentando la mezcla, retirándola del horno y agitándola manualmente hasta observa la completa disolución. Finalmente, se dejó enfriar y se añadió el Bromuro de etidio (1 µl/30 ml de la Solución del gel).

Paso 3. Posteriormente, se vertió la mezcla en el molde del gel e inmediatamente se colocaron los peines necesarios para formar los pocillos. Concluido el proceso de

gelificación (20 min aproximadamente), se traspasó el gel a la cámara de electroforesis y luego se agregó una cantidad necesaria de la Solución buffer TAE 1X para cubrir completamente el gel.

Paso 4. Acto seguido se prepararon las reacciones de PCR de la *Actividad experimental No. 3* (Sección 4.2.3.) a resolver, para lo cual se adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga ADN 6X en cada tubo y luego se centrifugó en la picofuga para colectar el volumen total de la mezcla.

Paso 5. Posteriormente se procedió a depositar 10 µl de cada mezcla del paso anterior (Paso 2) en los pocillos respectivos del gel. Así también en pocillos respectivos se colocaron reacciones de PCR's controles, tanto negativos como positivos y finalmente se agregó en un último pocillo el Marcador de Peso Molecular de ADN previamente preparado.

Paso 6. Finalmente se cerró la cámara de electroforesis con la tapa y los fragmentos se resolvieron a 90 V por el tiempo necesario (45 a 60 min) de acuerdo a la longitud del gel.

Paso 7. Posteriormente los productos de PCR resueltos, se visualizaron en un transiluminador y con un fotodocumentador se capturaron y analizaron las imágenes obtenidas.

Paso 8. Se interpretó como positivas las reacciones de PCR del control de proceso de amplificación realizado a cada una de las muestras de ADN total obtenido sí, el amplicón o producto de PCR que se observó de forma clara mostró un tamaño de ± 808 bp tanto para los hisopados rectales como para las muestras de tejido. Todas las muestras positivas para el ensayo de PCR del control de proceso fueron sometidas al ensayo de PCR para la detección de material genético del PVC-2 (PPVC-1).

4.2.5. Actividad experimental No. 5: Detección del ADN del PPVC-1 de las muestras positivas al control de proceso (PCR de diagnóstico)

4.2.5.1. Materiales

4.2.5.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- La misma descrita en la sección 4.3.4.1.1.

4.2.5.1.2. Materiales biológicos

- Muestras de ADN total validadas (que contenían ADN viable de ser amplificado mediante PCR) con el ensayo de PCR del control de proceso

4.2.5.1.3. Reactivos y/o soluciones

- La misma descrita sección 4.2.4.1.3., con la excepción de que en este caso se emplearon los siguientes oligonucleotidos:

Oligonucleótido sentido CPVCodGFor (GTTAATACTATGAGTGAGTTGC) (Invitrogen) y antisentido CPVCodGRev (GTATTAAATATATTAGTATAGTTAATTCC) (Invitrogen), diseñados

por el Dr. Antonio J. Vallecillo y descritos en el trabajo de Clavijo, 2020 (15). Estos oligonucleótidos amplifican un producto de PCR con un tamaño de 962 bp, que incluyen la región entre el aminoácido Val129 al Asn449, y además permite detectar el cambio en la posición 426 de la VP2, la cual corresponde a Asn (N⁴²⁶) para el PVC-2a, Asp (D⁴²⁶) para el PVC-2b y Glu (E⁴²⁶) para PVC-2c.

4.2.5.2. Ensayos de PCR para la identificación del material genético del PVC-2 en las muestras validadas de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos cardíaco y del SNC

Pasos a seguir:

Se elaboró la premezcla descrita en la *Actividad experimental No. 3* (sección **4.2.3.**) sustituyendo los Oligonucleótidos por CPVCodGFor y CPVCodGRev (*Ver Tabla 2*) y ajustando el tiempo de extensión (*Ver Tabla 3*) para obtener 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, se procedió a identificar la presencia de material genético del PVC-2 en las muestras de ADN ya validadas en el control de proceso.

4.2.6. Actividad experimental No. 6: Visualización de los productos de las reacciones de PCR para la identificación del material genético del PVC-2 en las muestras validadas de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos cardíaco y del SNC.

4.3.6.1. Materiales

4.3.6.1.1. Materiales físicos y/o equipos de laboratorio

- La misma descrita sección **4.2.4.1.1.**

4.2.6.1.2. Materiales biológicos

- Reacciones de PCR para la identificación del material genético del PVC-2 en las muestras validadas de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos cardíaco y del SNC.

4.2.6.1.3. Reactivos y/o soluciones

- La misma descrita sección **4.2.4.1.3.**

4.2.6.2. Resolución de las reacciones de PCR para la identificación del material genético del PVC-2 en las muestras validadas de ADN total de los hisopados rectales, de los tejidos cardíaco y del SNC

Pasos a seguir:

Se procedió de la misma manera que lo descrito en la sección **4.3.4.2.**, sin embargo, se interpretó como positivas las reacciones de PCR en donde se observó un producto de PCR

con un tamaño de ± 962 bp, concordante con el tamaño esperado y lo visualizado en la reacciones de PCR de los controles positivos.

4.2.7. Actividad experimental No. 7: Secuenciación de los productos de PCR obtenido de los tejidos cardíaco y del SNC para la identificación de las variantes del PVC-2

Para la identificación de las variantes del PVC-2 (subespecie del PPVC-1) se seleccionaron a conveniencia (las muestras para las cuales los amplicones obtenidos fueron claros y abundantes) reacciones de PCR de las muestras de ADN total obtenido de los tejidos cardíaco y del SNC, para ser sometidas a secuenciación capilar tipo Sanger (Macrogen Korea. 0F, 254 Beotkkot-ro Geumcheon-gu, Seoul 08511, Rep. of Korea).

Con los datos generados en la secuenciación de los productos de PCR correspondientes a la región de la VP2 del PVC-2, se efectuó el análisis bioinformático (BioEdit, ver.7.2 [<https://bioedit.software.informer.com/7.2/>], Clustal X ver2.1 [<http://www.clustal.org/clustal2/#Download>]) para alinear las secuencias y permitir la identificación de las variantes antigénicas, las que corresponden al residuo de Asn (N⁴²⁶) para el PVC-2a, Asp (D⁴²⁶) para el PVC-2b y Glu (E⁴²⁶) para PVC-2c.

4.2.8. Actividad experimental No. 8. Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para mostrar los porcentajes de muestras válidas obtenidas en los ensayos de PCR del control de proceso, los porcentajes de muestras positivas al ensayo PCR para la detección de material genético del PPVC-1 en las muestras viables (validadas) de los hisopados rectales y de los tejidos colectados (cardíaco, SNC). Así como para, mostrar la presencia y proporción de las tres variantes antigénicas del PVC-2 en los tejidos cardíacos y del SNC.

Adicionalmente, los datos de los pacientes obtenidos a través de las historias clínicas se contrastaron con los resultados de los análisis moleculares (PCR y secuenciación de los amplicones). Para la presentación de los datos de la edad se clasificaron en dos grupos: 1) De 0 a 3 meses y, 2) Pacientes mayores a 3 meses. Para la clasificación fenotípica se analizó en dos grupos raza pura o mestizo. El estado vacunal en cuatro grupos: 1) Perros “No vacunados”, 2) perros con “Vacunas completas”, 3) perros con “Vacunas incompletas”, y 4) Perros con un calendario de vacunación “Desconocido”. Como variable complementarias, si el diagnóstico clínico de la Parvovirus canina se acompañó de un “Test rápido” complementario o en base a la signología clínica del paciente, es decir “Sintesis”. Y finalmente, se consideró si los pacientes presentaron “Signos clínicos gastrointestinales”, junto con la observación de encefalitis y miocarditis como “Hallazgos macroscópicos *post mortem*”.

Resultados y discusión

5.1. Colecta de muestras

En la presente investigación se colectó un total de 108 muestras *post mortem* procedentes de 27 perros con antecedentes de signos clínicos de enteritis causados el PPVC-1. De cada cadáver se obtuvo un hisopado rectal, un fragmento de tejido intestinal, cardíaco y del SNC, de los cuales se obtuvo ADN total, que posteriormente fue empleado en dos ensayos de PCR. La primera PCR con el objetivo de validar la viabilidad del material genético para ser amplificado (control de proceso) se dirigió a identificar ADN de la especie *Canis lupus familiaris*, la segunda PCR estuvo orientada a identificar la presencia de material genético del PPVC-1 en las muestras validadas, con ello en primer lugar diagnosticar la infección por el PVC-2 (hisopados) y la diseminación del virus (tejidos). Ver Figura 5 y Tabla 4.

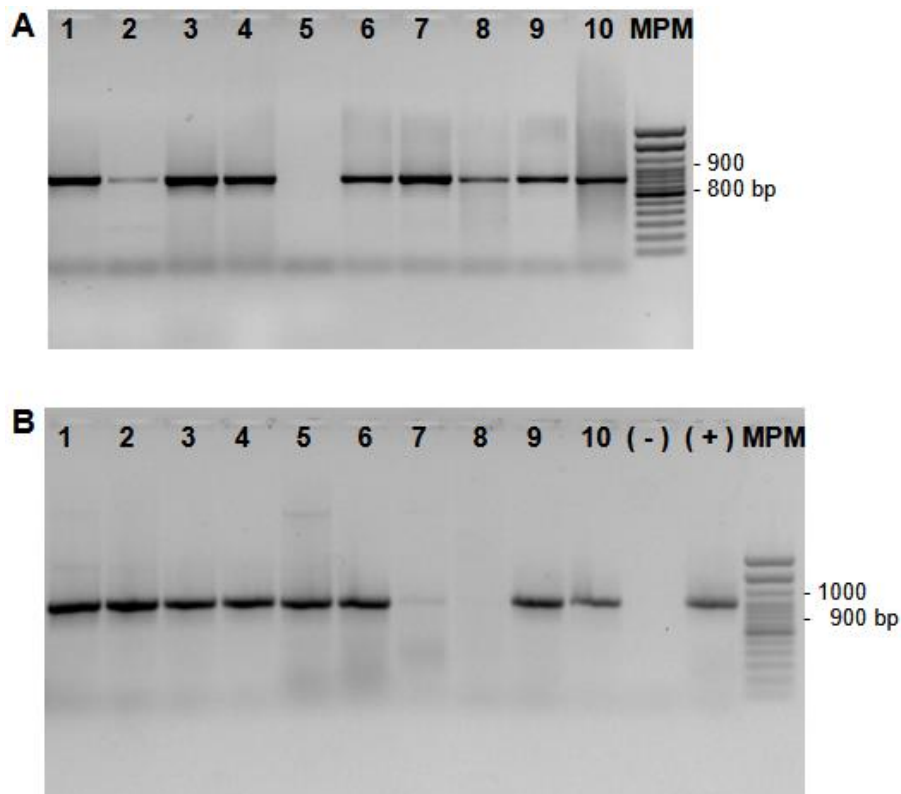


Figura 5. Imágenes representativas de la resolución de las reacciones de PCR para la evaluación de la viabilidad del ADN total obtenido de las muestras de hisopados rectales colectadas de los pacientes caninos afectados por Parvovirus e identificación de material genético del PPVC-1. **A.** Productos de las reacciones PCR con ADN total obtenido de las muestras de hisopados rectales viables (Carriles 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, y 10), no viable (Carril 5) resueltos en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio. Carril MPM, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Cat. no.: 15628050). **B.** Electroforesis de los productos de PCR de muestras positivas a la detección de ADN del PPVC-1 de muestras validadas (Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, y 10), negativa (Carril 8); controles negativo (-) y positivo (+). Carril MPM, marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Cat. no.: 15628050).

Tabla 4. Resultado de los ensayos de PCR (control de proceso y diagnóstico) del total de muestras analizadas *post mortem* procedentes de perros con Parvovirus canina.

Número de cadáver:	Muestras:							
	Hisopo rectal		Intestino		Tejido cardíaco		Tejido de SNC	
	CP	Dx	CP	Dx	CP	Dx	CP	Dx
1	+	+	-		+	+	+	+
2	+	+	-		+	+	+	+
3	+	+	-		+	+	+	+
4	+	+	-		+	-	+	-
5	+	+	-		+	+	+	-
6	+	+	-		+	-	+	-
7	+	+	-		-		+	+
8	+	+	-		+	+	+	+
9	+	+	-		+	+	+	+
10	-		-		-		+	+
11	+	+	-		+	-	+	+
12	+	+	-		+	-	+	+
13	+	±	-		+	+	+	-
14	+	±	-		+	-	+	+
15	+	+	-		-		+	-
16	+	+	-		+	-	+	+
17	-		-		+	+	+	+
18	+	+	-		+	-	+	+
19	+	+	-		+	-	+	-
20	+	+	-		+	-	+	+
21	+	+	-		+	-	+	+
22	+	+	-		+	-	+	-
23	+	+	-		+	-	+	+
24	-		-		+	+	+	+
25	+	-	-		-		+	+
26	+	+	-		-		+	+
27	+	+	-		-		+	+

Notas: CP, PCR del control de proceso; Dx, PCR de diagnóstico; (-), Negativo; (+), Positivo; (±), Resultado no consistente.

5.2. Control de proceso para la validación (detección del material genético del paciente) de las muestras hisopados rectales y muestras de tejidos

Los resultados de los ensayos de PCR del control de proceso aplicado a los hisopados rectales mostraron en 24 de las 27 (88,9 %) de muestras a la presencia de ADN de la especie canina viable de ser amplificado. Para el caso de las muestras de intestino no fue posible obtener material genético viable (0 %), caso contrario para las muestras de SNC, en donde del 100 % de ellas se obtuvo ADN viable de ser amplificado. Por otro lado, de las 27 muestra de tejido cardíaco se obtuvo un 77,8 % de muestras de ADN válidas (21/27). Ver *Figura 6*.

Si bien la PCR proporciona una rápida y sensible detección de patógenos infecciosos, ésta puede verse comprometida por sustancias presentes en el material a amplificar generando resultados inexactos o, falsos negativos debido a la inhibición de las ADN polimerasas empleadas en estos ensayos (7). Dichas sustancias pueden derivar del propio organismo del que procede el ADN, o bien de los reactivos utilizados para su aislamiento (45). Entre algunos de los inhibidores que pueden estar presentes en muestras de tejido, sangre o heces se encuentran al grupo hemo, la heparina, los lípidos, el tiocianato de guanidina, (46), sales biliares, Urea, anticuerpos (Inmunoglobulina G), subproductos bacterianos y polisacáridos complejos, entre otros (47). Por lo tanto, la existencia de algunos de estos inhibidores en las muestras de heces afecta los resultados de los ensayos de PCR y explica el hecho de no haber obtenido el 100 % de las muestra con presencia de ADN viable de ser amplificado mediante PCR.

5.3. Detección del ADN del PPVC-1 en hisopados rectales y las muestras de los tejido validadas con el control de proceso

Se incluyó a las muestras validadas (con ADN viable de ser amplificado) mediante el ensayo de PCR del control de proceso, para identificar la presencia de ADN del PVC-2 en cada una de ellas; por tanto se descartó a las muestra de tejido intestinal. Como resultado se obtuvo que en las muestras de hisopados rectales fue posible detectar claramente material genético del PPVC-1 en 21 de las 24 (87,5 %) y en 2 de ellas, resultados no consistentes, sin embargo al encontrarse la infección en al menos uno de los tejidos analizados, se consideraron como positivas. En tejido cardíaco, 9 de las 21 muestras validadas resultaron positivas a la presencia del PPVC-1, y en el caso de las muestras de tejido de tejido nervioso, 20 de las muestras (74,1 %) resultaron positivas. Ver *Figura 6*.

En el trabajo realizado por Clavijo (15), mediante PCR se evidenció un 93,7 % de positividad la presencia de PVC-2 en muestras de hisopados rectales colectados *ante mortem*, en dicho ensayo se utilizó los mismos *primers* u oligonucleotidos empleados en

esta investigación. Por su parte, Ain *et al.* (5) y Doyle *et al.* (10) identificaron un 100 y 77,5 %, respectivamente, casos positivos al PPVC-1 con la PCR aplicada a muestras fecales colectadas durante la necropsia. Estos datos de la frecuencia de la presencia de material genético del PPVC-1 en muestras fecales de los pacientes caninos, sugiere una extensa excreción del virus en las heces como se describe en la literatura, y que es posible identificarla mediante la PCR.

Aunado a la amplificación del ADN viral a partir de heces, también fue posible hacerlo a partir de los tejidos, potencialmente por la amplia diseminación del PPVC-1 vía hematogena a todos los órganos, incluyendo a los tejidos del SNC; incluso se ha descrito que las cargas virales que suelen ser superiores en tejidos que las encontradas en muestras fecales (16, 17). Es por ello que era esperable encontrar ADN del PVC-2 en las muestras de tejido intestinal, uno de los órganos blanco por su alta actividad mitótica, sin embargo en esta investigación no fue posible identificar la presencia del virus en este tejido; podría esto explicarse debido al efecto de inhibidores de la ADN polimerasa, más abundantes en consecuencia del proceso destructivo que se está sucediendo en estos tejidos, o que este mismo proceso impida la obtención de material genético integro, viable para ser amplificado, como se evidenció en la incapacidad para validar las muestras.

Consecuencia del tropismo viral, los cardiomiocitos son el segundo tipo de células blanco para el PPVC-1, especialmente cuando el cachorro seronegativo tiene una edad menor a las 2 semanas (48). En el estudio retrospectivo (2007-2015) de Ford *et al.* (21), utilizando una PCR convencional se logró detectar ADN del PPVC-1 en 12/40 (30 %) tejidos cardíacos fijados en formalina e incluida en parafina (FFPE); mientras que una PCR cuantitativa acoplada a una reacción de transcripción reversa (RT-qPCR) dirigida a amplificar la secuencia codificante de la proteína VP2, identificó ARNm viral en los 12 casos. A su vez, la presencia del PPVC-1 en el miocardio se asoció significativamente a la presencia de lesiones miocárdicas como necrosis, inflamación y/o fibrosis. Nho *et al.* (2) y Fagbohun *et al.* (40) por su parte notificaron la detección de ADN del PPVC-1 en tejidos cardíacos de 9/25 (36 %) y 2/2 (100 %) cachorros, respectivamente; empleando la PCR como prueba diagnóstica. Al contrastar los resultados previamente descritos con los encontrados en la presente investigación (9/21 (42,8 %) muestras de tejido cardíaco positivas) se evidencia una frecuencia relativamente baja de infecciones naturales con afección cardíaca por el PPVC-1, debido a que la mayor parte de cachorros pudieron estar protegidos por anticuerpos maternos (inmunidad pasiva).

Finalmente, se ha descrito que la infección y replicación del PPVC-1 en células nerviosas del SNC es posible. Decaro *et al.* (17) sometieron a un ensayo de PCR en tiempo real diferentes muestras de tejidos de 12 caninos infectados naturalmente con PPVC-1,

detectándose ADN viral en cerebro, cerebelo y bulbo cerebral con títulos medios superiores a 10^6 copias de ADN/10 μ l de muestra en todos los casos. En otro estudio con RT-qPCR para la detección de transcritos de ARN generados durante el proceso de replicación del PPVC-1, Elia *et al.* (49) encontraron una tasa de replicación viral sumamente alta en tejidos del SNC, como cerebro y cerebelo, con títulos que oscilaron entre $3,43 \times 10^2$ y $2,18 \times 10^2$ copias de ARNm/ μ l de muestra. Por su lado, Schaudien *et al.* (9) empleando ensayos de PCR convencional encontraron un 100 (PCR No. 1) y 98 % (PCR No. 2) de similitud de los amplicones obtenidos de muestras de cerebros de 5 perros que padecían el síndrome del cachorro sacudidor con ADN del PPVC-1, también se evidenció una leucoencefalopatía a la par con la infección parvoviral. Estos resultados en conjunto con los aquí descritos (20/27 (74,1 %) tejidos de SNC positivos) evidencian una notable frecuencia de afectación del SNC por el PVC-2.

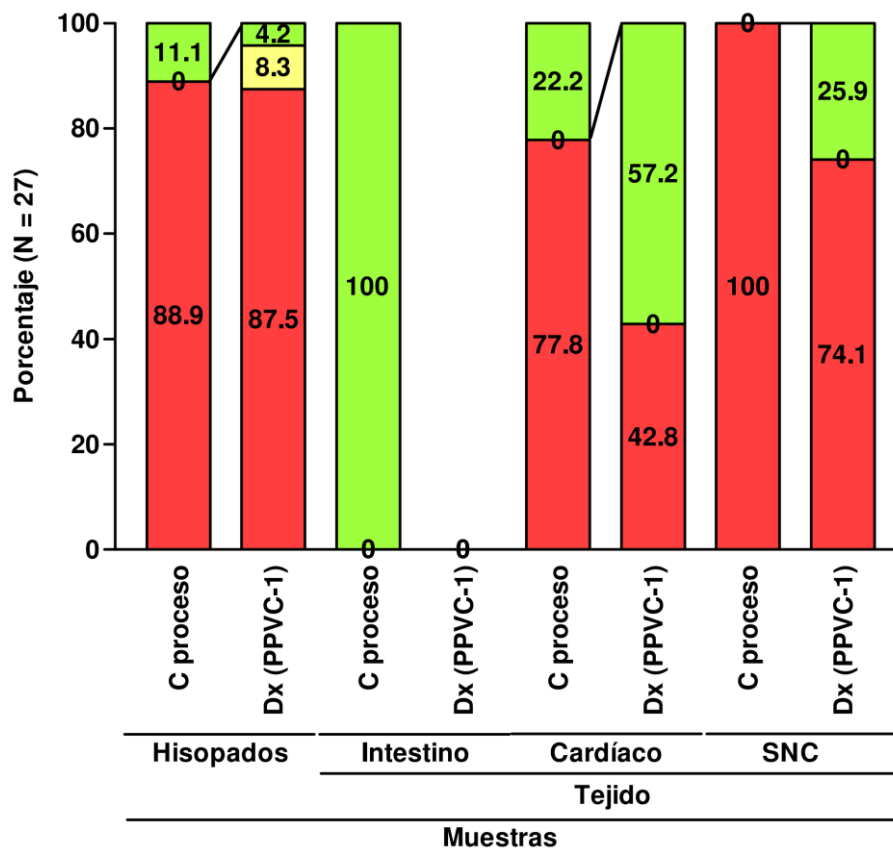


Figura 6. Frecuencia de la presencia de material genético del PVC-2 (PPVC-1) en hisopados rectales y fragmentos de tejido intestinal, cardíaco y del SNC. Porcentaje de muestras validadas (C proceso: PCR control de proceso para ADN de Canis lupus familiaris) positivas (■) a la presencia de material genético del PPVC-1 (Dx), en las que no fue posible tener un resultado consistente (■) y muestras negativas (■).

5.4. Diseminación de la infección del PPVC-1 en pacientes afectados por Parvovirus canina

Se analizó la presencia de material genético del PPVC.1 en las muestras de los tejidos cardíaco y del SNC colectadas de los pacientes caninos en donde se demostró la presencia de la infección (23 de 24 muestras de hisopados validadas (95,8 %)), en 21 de ellas forma confiable y en 2 de manera poco certera. Se encontró ADN del PVC-2 en 7 (30,4 %) muestras de tejido cardíaco de pacientes afectados por Parvovirus canina, de los cuales en 5 (21,7 %) de ellos se demostró adicionalmente la infección en tejidos del SNC. En las muestras de tejidos del SNC fue posible detectar con mayor frecuencia la presencia del PVC-2 en los perros afectados por Parvovirus canina, en 16 (69,7 %) de ellas se evidenció la presencia de ADN del PVC-2. Ver Figura 7.

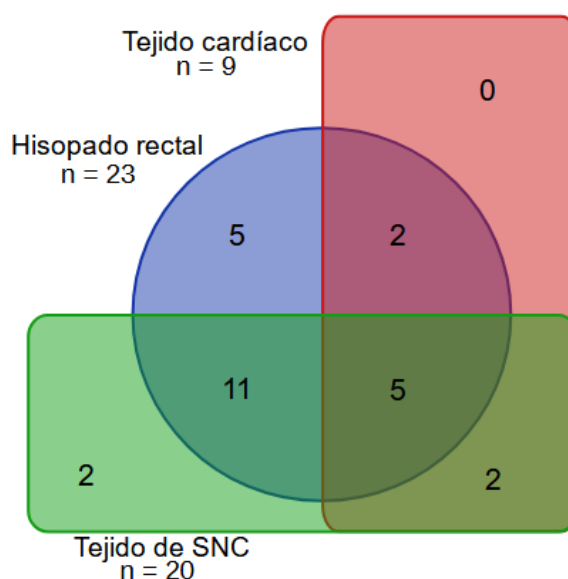


Figura 7. Presencia del PPVC-1 (PVC-2) en muestras de cadáveres caninos afectados por Parvovirus canina. En 23 (95,8 %) de las 24 muestras de hisopados fue posible detectar ADN del PVC-2, en 7 (30,4 %) muestras de tejido cardíaco colectadas de éstos animales infectados con el PVC-2 fueron positivas a la presencia del PVC-2 y 16 (69,7 %) de estos pacientes adicionalmente presentaron infección en SNC de los cuales en 5 (21,7 %) de ellos se identificó la infección en tejido cardíaco.

Finalmente, es importante destacar que en el caso de los 4 pacientes de los 27 muestreados, en donde no fue posible validar o demostrar de la presencia de la infección mediante el análisis molecular, si se demostró la presencia material genético del PVC-2 en 2 de ellos tanto en tejido cardíaco como del SNC, y los otros 2 únicamente en las muestras colectadas del SNC. Por lo que el SNC fue el tejido en donde fue posible con mayor frecuencia evidenciar la infección por el PVC-2 (20/27) en contraste con el tejido cardíaco (9/27), encontrándose ADN del PVC-2 en un 74,1 y 33,3 % de las muestras, respectivamente. Ver Figura 7.

5.5. Identificación de las variantes del PVC-2 (PPVC-1) en muestras de tejido cardíaco y del SNC positivas a la infección viral

Para la identificación genética de las variantes del PVC-2 presente en algunas muestras positivas se seleccionaron a conveniencia 20 de ellas. Se sometieron a secuenciación tipo Sanger 20 productos de PCR de muestras de tejido cardíaco y del SNC positivas para el PPVC-1. Dichas muestras fueron seleccionadas por compartir una positividad conjunta en los ensayos de PCR del control de proceso y diagnóstico de los hisopados rectales, así también se dio preferencia a las muestras del SNC y se completó el número a secuenciar con muestras de tejido cardíaco. Tras dicho análisis se logró tener lecturas confiables en todas las muestras sometidas a secuenciación, identificándose prácticamente en su totalidad a la variante genética 2a y una posible coinfección con la variante 2b. Ver *Tabla 5* y *Anexo G*.

Tabla 5. Alineamiento de las secuencias de los productos de PCR obtenidos de las muestras de los tejidos de los pacientes caninos afectado por Parvovirus canina. Se indican las variantes identificadas por comparación con las secuencias reportadas en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Muestra Nº:	Paciente Nº / Tejido:	5'---3'	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
1	1 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
2	2 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
3	3 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
4	7 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
5	8 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
6	9 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
7	11 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
8	12 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
9	14 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
10	16 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
11	18 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
12	20 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
13	21 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
14	23 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAAT
15	26 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT ⁵
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
16	27 / SNC	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
17	1 / Cardiacio	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
18	2 / Cardiacio	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
19	5 / Cardiacio	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
20	13 / Cardiacio	Sen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT
		Antisen	AACGCCTGAG	AGATTACAT	ACATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT

Variante :	ID GenBank:	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
PVC-2a	MF177277.1	AACACCTGAG	AGATTACAT	ATATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT	RT
		T P E R F T Y I A H Q D T G R Y P E G D W I Q N I N F N L P V T N										
PVC-2b	MF177280.1	AACACCTGAG	AGATTACAT	ATATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT	GAT
		T P E R F T Y I A H Q D T G R Y P E G D W I Q N I N F N L P V T D										
PVC-2c	MF177286.1	AACACCTGAG	AGATTACAT	ATATAGCACA	TCAAGATACA	GGAAAGATACC	CAGAAGGAGA	TTGGATTCAA	AATATTAAC	TTAACCTTCC	TGTAACAAT	GAT
		T P E R F T Y I A H Q D T G R Y P E G D W I Q N I N F N L P V T E										

N = Asn⁴²⁶; Asparagina
 D = Asp⁴²⁶, Acido aspartico o Aspartato
 E = Glu⁴²⁶, Acido glutámico o Glutamato

El PVC-2a ha estado circulando en todo el mundo durante más de 30 años, prevaleciendo en ciertos países de Europa, Asia, África, Oceanía y en América. Específicamente, en América del sur la variante se ha encontrado en países como Argentina, Brasil, Uruguay y Ecuador (13). Zhao *et al.* (16) amplificaron la variante 2a en 29/31 (93,5 %) muestras de heces provenientes de cachorros infectados experimentalmente. De manera similar, en perros infectados de manera natural la variante 2a fue la responsable de la enfermedad clínica en el 55,6 y el 47,6 % de los casos evaluados por Erazo (14) y Clavijo (15), respectivamente. A su vez, Moon *et al.* (33) demostraron una patogenia más severa en los cachorros infectados con la variante 2a, resultado de ello se cuantificó una tasa de letalidad en un 80 %. Sin embargo en la investigación de Markovich *et al.* (31) no se identificó la variante 2a en ninguna de las muestra analizadas, pero sí sobresalió la variante 2c en el 73,5 % (25/34) de hisopados rectales.

Tanto la variante 2a como el PVC-2 (Subespecie del PPVC-1) original se han demostrado capaces de replicarse en cardiomiocitos de perros susceptibles (38). Fagbohun *et al.* (40) basándose en la presencia de Asparagina (Asn) en la posición 426 de la proteína VP2 revelaron secuencias de la variante 2a en tejidos del órgano cardíaco, así como en los del timo, intestino, riñón, hígado, bazo y vejiga. En otras investigaciones, los análisis de secuencia de tejidos cardíacos llevaron al aislamiento de otras variantes. Decaro *et al.* (17) mediante secuenciación encontraron la variante 2a en el corazón, la cual mostró títulos más altos que las variantes 2b y 2c, pero esta diferencia no fue significativa. Por otro lado, Spera *et al.* (8) a partir de un fragmento de tejido cardíaco de un zorro cangrejero (*Cerdocyon cerdoyon*) secuenciaron nucleótidos (nt) del PVC-2, determinando con ello una alta identidad (99,8% nt) con la variante 2b.

El presente trabajo aporta una evidencia adicional a que el ADN del PPVC-1 se puede identificar en muestras de tejido cerebral canino, como ya lo han documentado otros estudios. Marenzoni *et al.* (50) estudiaron con dos ensayos de PCR, el cerebro de un cachorro de 4 meses que murió con signos nerviosos, lo que culminó en la identificación de la presencia de la variante 2a con la PCR en tiempo real. De manera similar, Schaudien *et al.* (9) secuenciaron ADN viral identificado el cerebelo de cachorros, mostrando una homología del 100 % con las variantes 2a, 2b y 2c con un primer ensayo de PCR y un 98 % de homología con las 2a y 2b en una segunda PCR. Schatzberg *et al.* (19) por su parte confirmaron la presencia de ADN del PVC-2 compatible para las variantes 2a y 2b en perros con hipoplasia cerebelosa. Por la estrecha relación del PVC-2 con el FPV (en la actualidad considerados subespecies del PPVC-1), no es raro encontrar casos de hipoplasia cerebelar consecuente al proceso infeccioso; sin embargo, es más frecuente esta lesión en gatos que en perros, debido a que el FPV destruye la capa celular externa del cerebelo, dando lugar a

hipoplasia de este órgano (19). Nivy *et al.* (18) tras la PCR identificaron la presencia de ADN de la variante 2c en un cachorro con meningoencefalitis bacteriana secundaria (*Escherichia coli*) por PPVC-1, hecho que se puede atribuir a la infección generalizada. La variante PPVC-1c también se ha notificado en el cerebro, cerebelo y bulbo raquídeo (17).

Complementando a los ensayos de la PCR para la identificación y posterior genotipificación del PVC-2, Aungpriyono *et al.* (6) en muestras de tejidos de ventrículos (izquierdo-derecho) y del tabique interventricular revelaron degeneración miocárdica difusa severa y necrosis con mineralización masiva. Además se describieron cardiomiocitos degenerados que incluían cuerpos de inclusión, que resultaron fuertemente inmunopositivos para el PPVC-1. Por otro lado, Nho *et al.* (2) utilizaron la hibridación *in situ* (ISH) para detectar las poblaciones de células diana específicas que facilitan la replicación el PPVC-1 en muestras de tejido de 25 perros infectados naturalmente. La reactividad de la ISH indicó un 36 % de muestras cardíacas infectadas por PVC-2, y de estas tan solo el 24 % de perros mostró positividad de infección en los cardiomiocitos y negatividad en los demás tejidos analizados. Por otra parte, Meunie *et al.* (50) mediante la inoculación experimental del virus, de forma oral, por contacto e intraperitonealmente; evidenciaron un 44,4 % de células miocárdicas con infección viral, un 100 % de inflamación intersticial en el miocardio, un 77,7 % de fibrosis intersticial miocárdica y un 55,5 % de cardiomiocitos con cuerpos de inclusión. La infección por contacto se desarrolló con menor severidad, mostrando en la necropsia inflamación y fibrosis intersticial.

Por otro lado, mediante inmunohistoquímica (IHC), Marenzoni *et al.* (50) revelaron una marcada inmunoreacción citoplasmática por la presencia del PPVC-1 en células dispersas de las capas subependimales en asociación con inflamación no supurativa del diencéfalo, el acueducto mesencefálico y el cuarto ventrículo; además el antígeno del PVC-2a se evidenció en el citoplasma de las células dispersas en las capas subependimales y en el epitelio del plexo coroideo, hechos que se relacionan con una encefalitis periventricular. Por su parte, Url y Schmitz (52) estudiaron la corteza cerebral, el hipocampo, el núcleo geniculado lateral y el cerebelo de 40 perros mediante microscopía óptica, concluyendo que el 27,5 % presentaba contracción de las neuronas con palidez y desintegración del pericario, así como la vacuolización del neuropilo, siendo evidente en el área del núcleo geniculado lateral. También, Schaudien *et al.* (9) demostraron tanto por inmunohistoquímica como por ISH, el antígeno y material genético del PPVC-1 en el cerebelo (células de la capa granular externa e interna) y en el hipocampo (células de la circunvolución dentada) de dos camadas de cachorros, que evidenciaron signos neurológicos notables a las 2 semanas de vida. Por su parte, Agungpriyono *et al.* (6) encontraron lesiones cerebrales que se distribuyeron de manera difusa y bilateral, en la corteza frontal, temporal y occipital, tálamo,

hipocampo, protuberancia y cerebelo. En la sustancia blanca cerebral, evidenciaron necrosis licuefactiva difusa de moderada a severa; mientras que las células endoteliales se mostraban hipertróficas y los capilares congestionados. Sin embargo, la inmunohistoquímica no identificó inclusiones virales, sugiriendo lesiones cerebrales inducidas indirectamente por la infección viral grave del miocardio, que llevaba a producir hipoxia y/o isquemia prolongadas en los tejidos del SNC. Indudablemente estos estudios demuestran la gran capacidad del PVC-2 para infectar varios tipos celulares de los cachorros en etapas tempranas de su desarrollo, resultando útil no descartar a la Parvovirus canina como la causal de leucoencefalopatías y cardiomiopatías en perros jóvenes.

5.6. Contraste de los aspectos clínicos de los cadáveres caninos muestreados con los datos de la diseminación de la infección del PVC-2

Los resultados de la PCR aplicada para la identificación de material genético del PPVC-1 en los hisopados rectales evidenciaron en forma clara la infección por el PVC-2 en 21 perros (y en 2 muestras adicionales), así como la afectación nerviosa en 16 de ellos, por la variante PVC-2a. Gran parte de estos perros afectados eran machos (20/23, 86,9 %), de raza pura (16/23, 69,6 %), tenían una edad de 0 a 3 meses (17/23 73,9 %) y con un calendario de vacunación desconocido (16/23, 69,6 %). Además, todos los pacientes mostraron signos clínicos de tipo gastrointestinal, en los que se destaca la presencia de diarrea hemorrágica, episodios de emesis, inapetencia, caquexia y letargia. *Ver Anexo A: Tablas 7 y 8.*

En lo que respecta a la edad, Pedroza *et al.* (28) y Gainor *et al.* (35) reportaron que el 67 (16/24) y el 89 % (57/64) respectivamente, de los casos de enteritis por el PPVC-1 se encontraban en una edad menor a los 6 meses. Markovich *et al.* (31) por su parte indicaron que 25 de 56 (44,6 %) perros infectados por el PVC-2, estaban en una edad menor a los 4 meses al momento de la exploración clínica inicial. Tanto en los estudios anteriormente citados como en la presente investigación, se evidencia notablemente que los perros se encontraban en el periodo de mayor susceptibilidad para contraer la infección.

En la investigación de Behdenna *et al.* (20) se demuestra que la implementación de intensos protocolos de vacunación reduce sustancialmente la probabilidad de infección por PPVC-1 en perros domésticos, pero no la elimina en su totalidad. Considerando, que la mayor parte de perros incluidos en el presente estudio tenían un calendario de vacunación desconocido, es muy probable que dichos cachorros no hayan contado con ninguna vacuna, y por lo tanto se explica la infección adquirida. Este estudio así como varias investigaciones efectuadas alrededor del mundo, también demuestran que los perros de raza pura tienden a adquirir una infección más grave por el PPVC-1 que los perros de razas

mixtas; sin embargo todas las razas e independientemente del sexo son susceptibles a la enfermedad, más aún si no cuentan con protección (22).

Al relacionar los métodos de diagnóstico, se evidenció que la mayor parte de perros evaluados compartían un resultado positivo tanto en el *test* rápido de inmunocromatografía como en el ensayo de PCR para la identificación de material genético del PPVC-1. Obteniéndose así, un 82,6 % (19/23 muestras) de concordancia de la positividad del *test* rápido con el ensayo de PCR para la detección del material genético del PVC-2 en los hisopados rectales, mientras que la concordancia con respecto a la presencia del PVC-2 en tejido cardíaco fue de un 77,8 % (7/9 muestras). De igual forma, al contrastar el resultado de los ensayos de PCR aplicado a las muestras de tejido nervioso con el *test* rápido se encontró un 75 % (15/20 muestras) de concordancia. *Ver Anexo A: Tablas 7 y 8.*

En el estudio de Gainor *et al.* (35), 32 de 39 muestras seleccionadas para la PCR dieron positivas para el PPVC-1; de las cuales únicamente 17 coincidieron en un resultado positivo con la prueba rápida (Snap parvo test, IDEXX), mientras que las 15 muestras restantes fueron negativas al *test* rápido y positivas a la PCR. Por su lado, Markovich *et al.* (31) determinaron que 33 de 42 hisopados rectales resultaron positivos al PVC-2 tras un ensayo de PCR convencional, y únicamente 27 de 42 hisopados rectales arrojaron resultados positivos tanto en el ELISA (detección de antígenos del PVC-2) como en la PCR convencional; en este último estudio, se empleó la misma muestra de heces para efectuar el ELISA y la PCR. Destacando con ello, una sensibilidad considerable del ensayo PCR frente a las pruebas tradicionales para obtener un diagnóstico más confiable de la infección por el PVC-2.

Por otro lado, durante la toma de muestras se pudo evidenciar de manera general a nivel macroscópico, enteritis, mucosa intestinal pálida en algunos casos, mientras que en otros, se evidenciaba hemorragias dispersas a lo largo del intestino delgado *Ver Anexo 9.3.* También se observó miocarditis, vasos cardíacos severamente congestionados, y en ciertos perros el miocardio mostraba zonas pálidas, hemorrágicas o necróticas *Ver Anexo 9.4.* Además de encefalitis, congestión notable en vasos cerebrales, así como hemorragias difusas en las porciones parietales del cerebro *Ver Anexo 9.5.*

Muchos de estos hallazgos coinciden con los descritos en estudios de casos. Así por ejemplo, en una cachorra Gran danés de 3 meses aproximadamente, Ain *et al.* (5) observaron una mucosa intestinal engrosada y hemorrágica, y líneas blanquecinas en el surco coronario. Por su parte, Fagbohun *et al.* (40) encontraron un agrandamiento moderado del corazón conjuntamente con rayas pálidas en el mismo, así como una mucosa del intestino delgado hemorrágica, gruesa, revestida por una membrana diftérica maloliente, esto en dos perros de 7 semanas y 4 meses de edad. De igual forma, en un perro

Doberman, Mahaprabhu *et al.* (38) describieron la mucosa yeyunal engrosada y congestionada, además de un contenido intestinal de color marrón, y un miocardio con líneas pálidas y vasos sanguíneos congestionados. Mientras que en un perro mestizo de 4 meses, Behera *et al.* (39), los cambios macroscópicos de duodeno y yeyuno mostraron un grado de moderado a severo de congestión y hemorragia. Estos exámenes *post mortem* también describen lesiones en otros órganos como, congestión de los pulmones, más exudado espumoso; hepatomegalia y consistencia friable; vesícula biliar distendida; bazo, riñones y nódulos linfáticos mesentéricos congestionados e incrementados de tamaño.

Conclusiones

Se realizó el ensayo molecular de PCR y se pudo establecer la infección confirmando la presencia de material genético de PPVC-1 en todas las muestras validadas de los hisopados rectales. Tras la discriminación mediante la validación de las muestras de los tejidos objetivos de este estudio se estableció de igual manera la existencia de material genético del PVC-2 (Subespecie del PPVC-1) en tejido cardíaco y en un mayor porcentaje en tejido del sistema nervioso central. En el análisis de las muestras de tejido intestinal no se logró encontrar material genético viable para ser amplificado tanto en la validación como en el diagnóstico para PVC-2.

Se logró obtener la secuencia genética codificante con un tamaño de 962 bp, de la región que permitió detectar el cambio en la posición 426 de la proteína VP2 en las 20 muestras productos de PCR de tejido del sistema nervioso central y cardíaco positivos para el PPVC-1, lo que permitió demostrar que en la ciudad de Cuenca, y posiblemente en la región, la variante antigénica 2a prevalece circulante en el medio con la capacidad de replicarse en los tejidos cardíaco y nervioso.

Por lo anterior, se evidencia la necesidad de una vigilancia epidemiológica de la variante 2a en la región. De igual manera es imperativo que, en conjunto con la signología clínica y exámenes complementarios, se realice la identificación de la variante genética del PVC-2 causante de los casos de Parvovirus canina debido a las diferencias de capacidad de replicación y afección a órganos llevando a tasas de letalidad significativas o la presentación de secuelas en cachorros que sobreviven a la infección y así favorecer al clínico que tendrá evidencias para sustentar el manejo de los pacientes y establecer pronósticos más acertados.

Recomendaciones

Tras la conclusión del presente trabajo de tesis y de la experiencia obtenida durante el desarrollo y la revisión bibliográfica relacionada con la Parvovirus canina y las variantes virales del PVC-2 responsable de esta enfermedad, se pone a consideración de los lectores y la comunidad veterinaria continuar desarrollando proyectos de investigación en lo referente a la diseminación del PPVC-1 en la ciudad de Cuenca, la región y a nivel nacional para tener un panorama más amplio de la dinámica evolutiva de la subespecie PVC-2.

Partiendo de la posibilidad aislar e identificar el ADN del PPVC-1 en los órganos de un animal afectado, se sugiere continuar levantando información con la colaboración de las clínicas veterinarias y así investigar las características genéticas de las variantes antigénicas, en lo se debe incluir una mayor caracterización de las lesiones causadas por este virus mediante análisis morfológicos de los órganos afectados, histopatología e inmunohistoquímica de los tejidos, junto con los datos clínicos de los pacientes.

Finalmente, se recomienda en las clínicas veterinarias continuar con la inmunización, emplear la inmunocromatografía para la detección viral ante un caso sospechoso y dar seguimiento de las posibles secuelas *post* recuperación del paciente. También se sugiere el desarrollo de ensayos de biología molecular que permitan identificar la variante viral de manera oportuna y así proyectar la virulencia de la infección, severidad de la enfermedad, el establecimiento del manejo del paciente y la posible evolución que tendrá. A su vez se debe cuestionar la efectividad de la inmunización de los cachorros, revisar su se requiere formular nuevos inmunógenos o realizar ajustes en los calendarios de vacunación.

Referencias

1. Nandi S, Kumar M, Mohapatra T, Ravishankar C. Emergence of *Canine parvovirus* - 2 variants and its impact on vaccination. *World Appl Sci J.* 2013;23(10):1366–76. Disponible en: [https://www.idosi.org/wasj/wasj23\(10\)13/16.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj23(10)13/16.pdf)
2. Nho WG, Sur JH, Doster AR, Kim SB. Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. *J Vet Diagnostic Investig.* 1997;9(3):255–60. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/104063879700900306>
3. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006>
4. Mazzaferro E. Update on canine parvoviral enteritis. *Vet Clin Small Anim.* 2020;50(6):1307–25. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>
5. Ain-Fatin R, Nu-Fazila S, Yasmin A, Sifa-Shaida A, Ayuni W, Muhamad-Alif Z. Canine parvovirus (CPV) infection in a great dane puppy: a case report. *Adv Anim and Vet Sci.* 2020;8(10):1075–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2020/8.10.1075.1078>
6. Agungpriyono D, Uchida K, Tabaru H, Yamaguchi R, Tateyama S. Subacute massive necrotizing myocarditis by *Canine parvovirus type 2* infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. *Vet Pathol.* 1999;36(1):77–80. Disponible en: <https://doi.org/10.1354/vp.36-1-77>
7. Sykes JE. Canine parvovirus infections and other viral enteritides. In: *Canine and Feline Infectious Diseases.* Elsevier Inc.; 2014. p. 141–51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00014-4>
8. Spera C, Pereira F, Lorenzetti E, Marques G, Freitas L, Martins M, et al. First detection of *Canine parvovirus 2b* DNA in a crab-eating fox pup (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Brazilian J Microbiol.* 2020;52(1):449–53. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00389-9>

9. Schaudien D, Polizopoulou Z, Koutinas A, Schwab S, Porombka D, Baumgärtner W, et al. Leukoencephalopathy associated with parvovirus infection in Cretan hound puppies. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3169–75. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JCM.01582-09>
10. Doyle E. Canine parvovirus and other canine enteropathogens. In: Miller L, Janeczko, Hurley K, editors. *Infections disease management in animal shelters*. Second. Jhon Wiley & Sons, Inc; 2021. p. 321–36. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/9781119294382.ch14>
11. Chung H, Kim S, Nguyen V, Shin S, Kim J, Lim S, et al. New genotype classification and molecular characterization of canine and feline parvoviruses. *J Vet Sci.* 2020;21(3):1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e43>
12. Zhou P, Zeng W, Zhang X, Li S. The genetic evolution of canine parvovirus – A new perspective. *PLoS One.* 2017;12(3):1–13. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175035>
13. 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):214–219. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.012>
14. 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. Universidad Central del Ecuador; 2017. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/13801>
15. Clavijo V. Caracterización molecular de las cepas de *Parvovirus canino tipo 2* en perros de la ciudad de Cuenca. Universidad de Cuenca; 2020. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/33771>
16. Zhao Y, Lin Y, Zeng X, Lu C, Hou J. Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. *Virology.* 2013;10:1–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-272>

17. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.11.005>
18. Nivy R, Hahn S, Perl S, Karnieli A, Karnieli O, Aroch I. A fatal outbreak of parvovirus infection: First detection of *Canine parvovirus type 2c* in Israel with secondary *Escherichia coli* septicemia and meningoencephalitis. *Isr J Vet Med.* 2011;66(3):96–102. Disponible en: http://www.ijvm.org.il/sites/default/files/parvo_from_september_book_en_250911-9.pdf
19. Schatzberg S, Haley N, Barr S, Parrish C, Steingold S, Summers B, et al. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of parvoviral DNA from the brains of dogs and cats with cerebellar hypoplasia. *J Vet Intern Med.* 2003;17(4):538–44. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02475.x>
20. Behdenna A, Lembo T, Calatayud O, Cleaveland S, Halliday JEB, Packer C, et al. Transmission ecology of canine parvovirus in a multi-host, multi-pathogen system. *R Soc.* 2019;286(1899):20182772. Disponible en: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2772>
21. Ford J, Mcendaffer L, Renshaw R, Molesan A, Kelly K. Parvovirus infection is associated with myocarditis and myocardial fibrosis in young dogs. *Vet Pathol.* 2017;54(6):964–71. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/0300985817725387>
22. Miranda C, Thompson G. Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants. *J Gen Virol.* 2016;97(9):2043–57. Disponible en: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000540>
23. Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 2010;40(6):1041–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
24. Franzo G, Tucciarone CM, Casagrande S, Caldin M, Cortey M, Furlanello T, et al. Canine parvovirus (CPV) phylogeny is associated with disease severity. *Sci Rep.* 2019;9(1):11266. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47773-6>
25. Grecco S, Iraola G, Decaro N, Alfieri A, Alfieri A, Gallo Calderón M, et al. Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary

- epidemiological landscape of canine parvovirus in South America. *Virus Evol.* 2018;4(1):1–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/ve/vey011>
26. Mietzsch M, Péntzes JJ, Agbandje-Mckenna M. Twenty-five years of structural parvovirology. *Viruses.* 2019;11(4). Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v11040362>
 27. Schirò G, Mira F, Decaro N, Desario C, Chiaramonte G, Di S, et al. Persistence of DNA from canine parvovirus modified-live virus in canine tissues. *Vet Res Communions.* 2022;47(2):567–74. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10008-7>
 28. Pedroza C, Páez V, Charles C, Elizondo D, Leonel De Cervantes R, López M. Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagnostic Investig.* 2015;27(1):107–11. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/1040638714559969>
 29. Chen B, Zhang X, Zhu J, Liao L, Bao E. Molecular epidemiological survey of canine parvovirus circulating in China from 2014 to 2019. *Pathogens.* 2021;10(5):1–12. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050588>
 30. Callaway H, Welsch K, Weichert W, Allison A, Hafenstein S, Huang K, et al. Complex and dynamic interactions between Parvovirus capsids, transferrin receptors, and antibodies control cell infection and host range. *J Virol.* 2018;92(13):1–18. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.00460-18>
 31. Markovich J, Stucker K, Carr A, Harbison C, Scarlett J, Parrish C. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2012;241(1):66–72. Disponible en: <https://doi.org/10.2460/javma.241.1.66>
 32. Voorhees I, Lee H, Allison A, Lopez R, Goodman L, Oyesola O, et al. Limited intrahost diversity and background evolution accompany 40 years of canine parvovirus host adaptation and spread. *J Virol.* 2018;94(1):e01162-19. Disponible en: <https://doi.org/10.1128/JVI.01162-19>
 33. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.02.016>
34. Spibey N, Greenwood N, Sutton D, Chalmers W, Tarpey I. *Canine parvovirus type 2* vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet Microbiol.* 2008;128(1–2):48–55. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.015>
35. Gainor K, Bowen A, Bolfa P, Peda A, Malik YS. Molecular investigation of *Canine parvovirus - 2* (CPV-2) Outbreak in Nevis Island: Analysis of the nearly complete genomes of CPV-2 strains from the Caribbean region. *Viruses.* 2021;13:1083. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/v13061083>
36. Kumari GD, Pushpa RNR, Satheesh K. In vivo histopathological and in vitro cell culture studies upon Canine parvovirus infection. *J Entomol Zool Stud.* 2020;8(3):1967–72. Disponible en: <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue3/PartAE/8-3-163-186.pdf>
37. Nandi S, Kumar M. Canine parvovirus: current perspective. *Indian J Virol.* 2010;21(1):31–44. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13337-010-0007-y>
38. Mahaprabhu R, Pazhanivel N, Venkata G, Rao S. Immunopathological identification of canine parvoviral enteritis in vaccinated Doberman pup. *Pharma Innov J.* 2021;10(12):1011–5. Disponible en: <https://www.thepharmajournal.com/special-issue?year=2021&vol=10&issue=12S&ArticleId=9608>
39. Behera SK, Singh YD, Roychoudhury P, Arya RS, Behera P, Ali MA, et al. Clinico-pathological and necropsy findings in a 4-month old mixed-breed pup with *Canine parvovirus-2* infection and its genetic characterization. *J Entomol Zool Stud.* 2020;8(5):573–577. Disponible en: <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue5/PartH/8-4-446-594.pdf>
40. Fagbohun OA, Jarikre TA, Alaka OO, Adesina RD, Ola OO, Afolabi M, et al. Pathology and molecular diagnosis of canine parvoviral enteritis in Nigeria: case report. *Comp Clin Path.* 2020;29:887–93. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00580-020-03127-7>

41. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/104063870501700206>
42. Cáceres A. Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Parvovirus canino. Universidad de Chile. 2017. Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/165721>
43. Mokhtari A, Farmani N, Rajabi M. Detection of Canine parvovirus by PCR and its association with some of risk factors. *Rev MVZ Córdoba.* 2018;23(2):6607–16. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1334>
44. Benavides Melo CJ, Astaiza Martínez JM, Arteaga Cadena ÁV, Cisneros López HD, Montezuma Misnaza CA. Necropsia en Caninos. San Juan de Pasto: Editorial Universidad de Nariño; 2021. Disponible en: <http://sired.udenar.edu.co/id/eprint/7304>
45. Dorado Pérez G. Amplificación de DNA mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Campus Universitario de Rabanales. 2005. Disponible en: http://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44_PCR.pdf
46. Poma HR, Davies C, Gutiérrez Cacciabue D, Mora MC, Basombrío MÁ, Rajal VB. Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR: Efecto de las sustancias inhibitoras. *Rev Argent Microbiol.* 2012;44(3):144–9. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412012000300003&lng=es&tlng=es
47. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: a quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. *Anal Biochem.* 2006;351(2):308–10. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.01.051>
48. 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. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.09.007>

49. Elia G, Cavalli A, Desario C, Lorusso E, Lucente MS, Decaro N, et al. Detection of infectious *Canine parvovirus type 2* by mRNA real-time RT-PCR. *J Virol Methods*. 2007;146(1–2):202–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.06.017>
50. Marenzoni ML, Calò P, Foiani G, Tossici S, Passantino G, Decaro N, et al. Porencephaly and periventricular encephalitis in a 4-month-old puppy: Detection of Canine parvovirus type 2 and potential role in brain lesions. *J Comp Pathol*. 2019;169:20–4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.03.005>
51. Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG, Slauson D. Experimental viral myocarditis : parvoviral Infection of neonatal pups. *Vet Pathol*. 1984;15. Disponible en: <https://doi.org/10.1177/030098588402100510>
52. Url A, Schmidt P. Do canine parvoviruses affect canine neurons? An immunohistochemical study. *Vet Sci*. 2005;79(1):57–9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.11.003>

Anexos

Anexo A. Tabla de analices de resultados

Tabla 6. Análisis de frecuencias de las muestras sometidas a los ensayos de PCR del control (Detección de ADN de la especie canina) y PCR de diagnóstico (ADN del PPVC-1).

PCR	Muestra							
	Hisopados		Intestino		Corazón		SNC	
	C	D	C	D	C	D	C	D
	N: 27 (100 %)	n: 24 (100 %)	N: 27 (100 %)	n: 0 (0 %)	N: 27 (100 %)	n: 21 (100 %)	N: 27 (100 %)	n: 27 (100 %)
(+)	24 (88,9)	21 (87,5)	0 (0,0)	N.r	21 (77,8)	9 (42,9)	27 (100,0)	20 (74,1)
(-)	3 (11,1)	1 (4,2)	27 (100,0)	N.r	6 (22,2)	12 (57,1)	0 (0,0)	7 (25,9)
(±)	0 (0,0)	2 (8,3)	0 (0,0)	N.r	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Nota: C, PCR de control de proceso; D, PCR de diagnóstico; (-), Negativo; (+), Positivo; (±), No concluyente; N, Numero de muestras a validarse; n, Número de muestras viables (validadas); N.r, No realizado.

Tabla 7. Relación entre los datos de los pacientes en estudio con los hallazgos en el PCR de diagnóstico del PPVC-1 y el estudio de secuenciación.

Variable		PCR diagnóstico			Secuenciación	
		Hisopado	Corazón	SNC	Cardíaco	Nervioso
					PVC-2a	PVC-2a
		N: 23 (100 %)	N: 9 (100 %)	N: 20 (100 %)	N: 4 (100 %)	N: 16 (100 %)
Edad	0-3 meses	17 (73,9)	8 (88,9)	12 (60,0)	3 (75,0)	10 (62,5)
	>3 meses	6 (26,1)	1 (11,1)	8 (40,0)	1 (25,0)	6 (37,5)
Sexo	Hembra	3 (13,1)	2 (22,2)	3 (15,0)	4 (100,0)	2 (12,5)
	Macho	20 (86,9)	7 (77,8)	17 (85,0)	0 (0,0)	14 (87,5)
Raza	Mestiza	7 (30,4)	3 (33,3)	7 (35,0)	2 (50,0)	6 (37,5)
	Pura	16 (69,6)	6 (66,7)	13 (65,0)	2 (50,0)	10 (62,5)
Vacunas	No vacunado	4 (17,4)	1 (11,1)	5 (25,0)	0 (0,0)	3 (18,8)
	Completas	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Incompletas	3 (13,0)	2 (22,2)	3 (15,0)	2 (50,0)	3 (18,8)
	Desconocida	16 (69,6)	6 (66,7)	12 (60,0)	2 (50,0)	10 (62,5)
Test rápido PPVC-1*	Positivo	19 (82,6)	7 (77,8)	15 (75,0)	4 (100,0)	13 (81,3)
	Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
	No aplicado	4 (17,4)	2 (22,2)	4 (20,0)	0 (0,0)	3 (18,8)
Signos clínicos gastrointestinales	Si	23 (100,0)	9 (100,0)	20 (100,0)	4 (100,0)	16 (100,0)
Hallazgos macroscópicos <i>post mortem</i>	Encefalitis	23 (100,0)	9 (100,0)	20 (100,0)	4 (100,0)	16 (100,0)
	Miocarditis	23 (100,0)	9 (100,0)	20 (100,0)	4 (100,0)	16 (100,0)

* Inmunocromatografía.

Tabla 8. Datos generales de los pacientes incluidos en el estudio.

Número de muestra	Raza	Edad (meses)	Sexo	Vacunas	Signos gastrointestinales	Test rápido PVC-2	Hallazgos macroscópicos en la necropsia		PCR								Muestra secuenciada	
							Miocarditis	Encefalitis	Hisopado		Intestino		Corazón		SNC		Corazón	SNC
									C	D	C	D	C	D	C	D		
1	Mestiza	3	M	V.i	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	+	X	X
2	Mestiza	6	M	V.i	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	+	X	X
3	Mestiza	3	H	N.v	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	+		X
4	Mestiza	3	M	N.v	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	-		
5	Husky	2	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	-	X	
6	Pitbull	3	M	D	X	N.a	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	-		
7	Mestiza	4	M	N.v	X	N.a	X	X	+	+	-	N.r	-	N.r	+	+		X
8	Bulldog Francés	3	M	D	X	N.a	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	+		X
9	Bulldog Francés	3	M	D	X	N.a	X	X	+	+	-	N.r	+	+	+	+		X
10	Mestiza	4	M	N.v	X	N.a	X	X	-	N.r	-	N.r	-	N.r	+	+		
11	French Poodle	3	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
12	Shit tzu	4	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
13	Pastor de Berna	2	M	D	X	+	X	X	+	±	-	N.r	+	+	+	-	X	
14	Shitzu	4	M	D	X	+	X	X	+	±	-	N.r	+	-	+	+		X
15	French Poodle	3	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	-	N.r	+	-		
16	Mestiza	3	M	N.v	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
17	Golden Retriever	2	M	D	X	+	X	X	-	N.r	-	N.r	+	+	+	+		
18	Pastor de Berna	2	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
19	Pastor de Berna	2	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	-		
20	Pastor de Berna	2	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
21	French Poodle	2	H	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
22	French Poodle	2	H	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	-		
23	French Poodle	2	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	+	-	+	+		X
24	French Poodle	2	H	D	X	+	X	X	-	N.r	-	N.r	+	+	+	+		
25	French Poodle	2	M	N.v	X	-	X	X	+	-	-	N.r	-	N.r	+	+		
26	Husky	5	M	V.i	X	+	X	X	+	+	-	N.r	-	N.r	+	+		X
27	Mestiza	6	M	D	X	+	X	X	+	+	-	N.r	-	N.r	+	+		X

Notas: M, Macho; H, Hembra; V.i, Vacunas incompletas; D, Desconocido; N.v, No vacunado; N.a, No aplicado; C, PCR del control de proceso; D, PCR de diagnóstico; (-), Negativo; (+), Positivo; (±), No concluyente; N.r, No realizado

Anexo B. Fotografías de los perros muestreados



Foto 1. Perro N°3

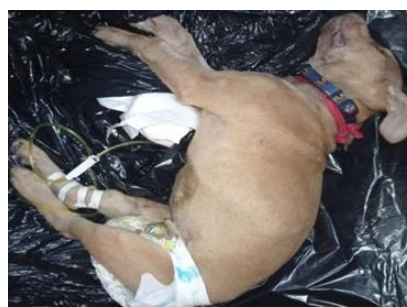


Foto 2. Perro N°4



Foto 3. Perro N°5

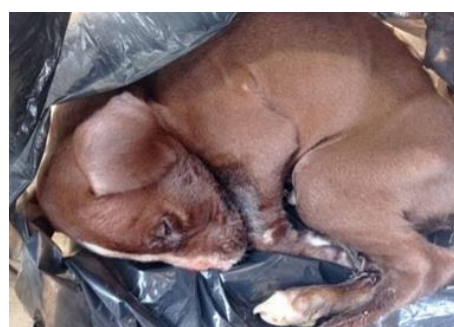


Foto 4. Perro N°6



Foto 5. Perro N°7



Foto 6. Perro N°9



Foto 7. Perro N°11



Foto 8. Perro N°13



Foto 9. Perro N°14



Foto 10. Perro N°17



Foto 11. Perro N°18



Foto 12. Perro N°19



Foto 13. Perro N°21



Foto 14. Perro N°22



Foto 15. Perro N°24



Foto 16. Perro N°25

Anexo C. Fotografías de los segmentos intestinales colectados



Foto 17. Intestino del perro N°3



Foto 18. Intestino del perro N°5



Foto 19. Intestino del perro N°6



Foto 20. Intestino del perro N°8



Foto 21. Intestino del perro N°10



Foto 22. Intestino del perro N°12



Foto 23. Intestino del perro N°13



Foto 24. Intestino del perro N°16



Foto 25. Intestino del perro N°17



Foto 26. Intestino del perro N°18



Foto 27. Intestino del perro N°20



Foto 28. Intestino del perro N°24

Anexo D. Fotografías de los tejidos cardíacos colectados

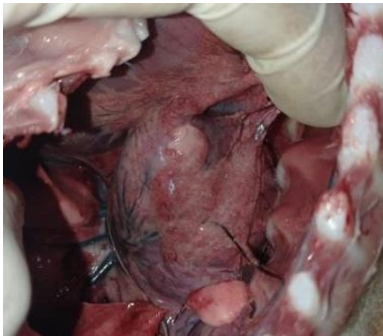


Foto 29. Corazón del perro N°3



Foto 30. Corazón del perro N°5



Foto 31. Corazón del perro N°7



Foto 32. Corazón del perro N°9



Foto 33. Corazón del perro N°13



Foto 34. Corazón del perro N°14



Foto 35. Corazón del perro N°15



Foto 36. Corazón del perro N°18

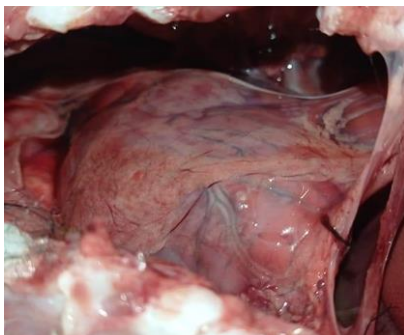


Foto 37. Corazón del perro N°19

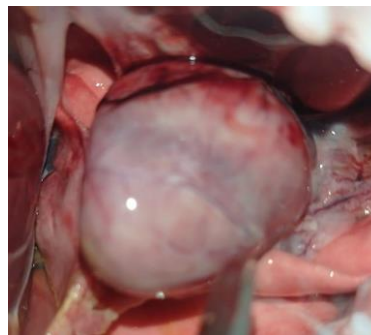


Foto 38. Corazón del perro N°21

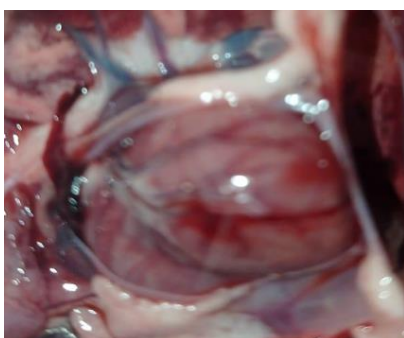


Foto 39. Corazón del perro N°23

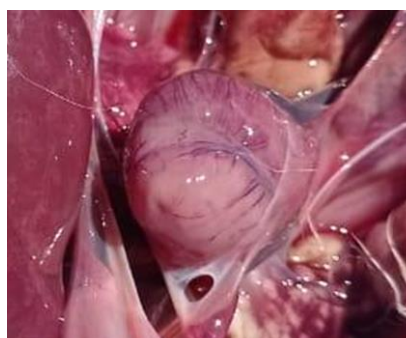


Foto 40. Corazón del perro N°25

Anexo E. Fotografías de los tejidos cerebrales colectados



Foto 41. Cerebro del perro N°1



Foto 42. Cerebro del perro N°2



Foto 43 Cerebro del perro N°3

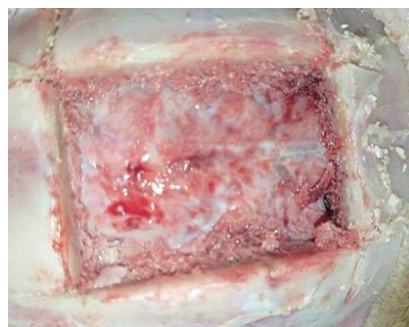


Foto 44. Cerebro del perro N°4

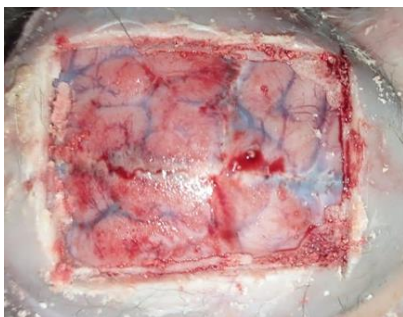


Foto 45. Cerebro del perro N°5

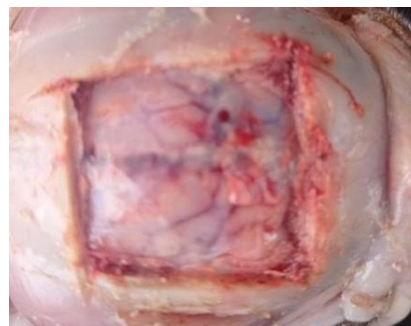


Foto 46. Cerebro del perro N°6



Foto 47. Cerebro del perro N°8



Foto 48. Cerebro del perro N°10

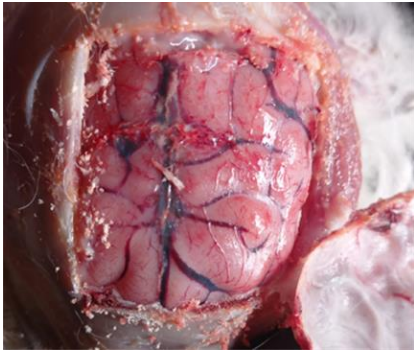


Foto 49. Cerebro del perro N°11



Foto 50. Cerebro del perro N°12

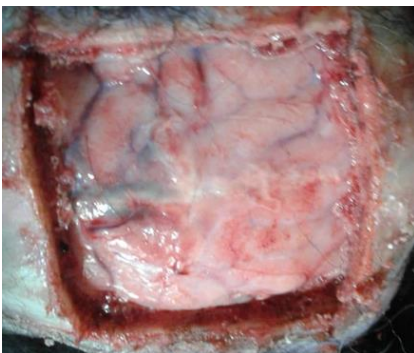


Foto 51. Cerebro del perro N°13

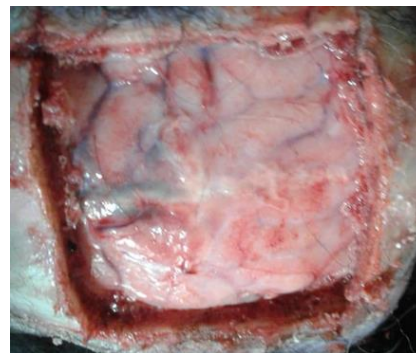


Foto 52. Cerebro del perro N°16

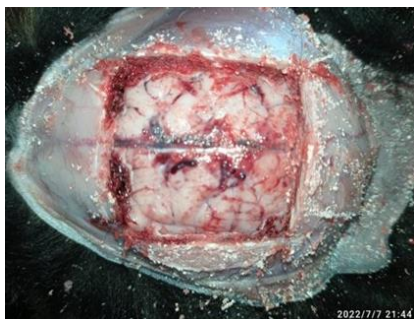


Foto 53. Cerebro del perro N°18

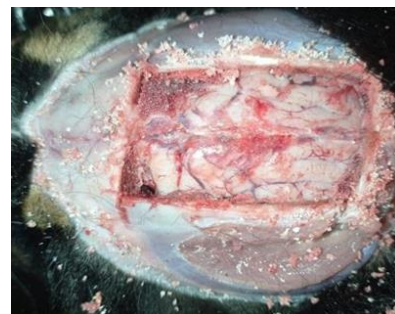


Foto 54. Cerebro del perro N°19



Foto 55. Cerebro del perro N°20

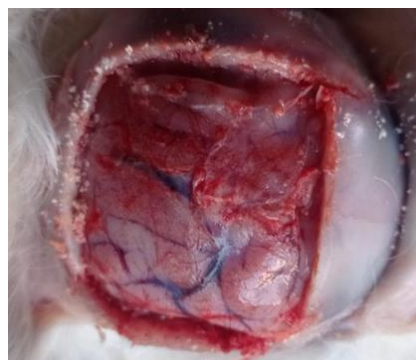


Foto 56. Cerebro del perro N°21



Foto 57. Cerebro del perro N°22

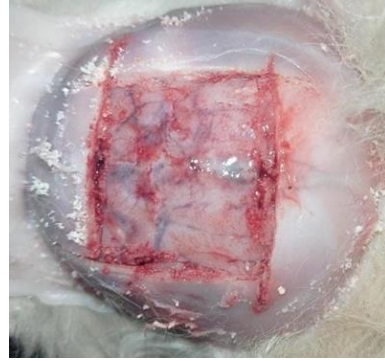


Foto 58. Cerebro del perro N°23

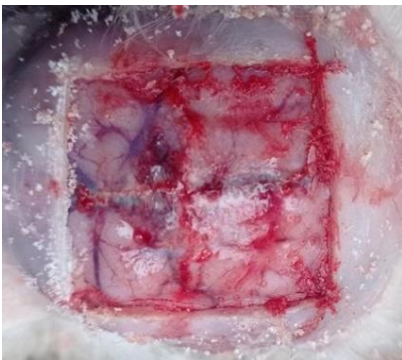


Foto 59. Cerebro del perro N°24



Foto 60. Cerebro del perro N°25



Foto 61. Cerebro del perro N°27

Anexo F. Fotografías del trabajo en el laboratorio de Biología Molecular



Foto 62. Procesamiento inicial de los hisopados rectales



Foto 63. Muestras de tejido nervioso inmersos en la solución de conservación



Foto 64. Incisión de una pequeña lámina de tejido intestinal, cardíaco y nervioso



Foto 65. Fragmentos de tejido sobre papel absorbente para eliminar el exceso de la solución de conservación



Foto 66. Colocación de los pequeños fragmentos de tejido en tubos eppendorf



Foto 67. Tubos eppendorf con muestras de tejido más solución de Lisis 2x y Proteinasas K



Foto 68. Incubación de las muestras de tejido e hisopados en baño María



Foto 69. Agitación vigorosa de las distintas mezclas en el vórtex



Foto 70. Centrifugación de las muestras para precipitar el ADN



Foto 71. Secado de las pastillas de ADN a temperatura ambiente

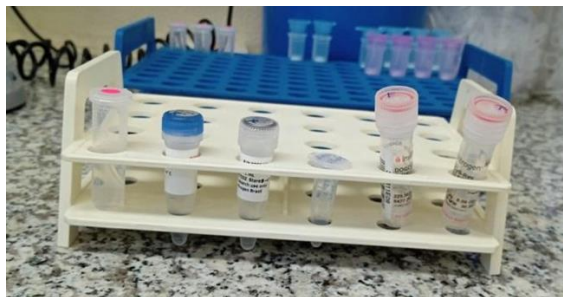


Foto 72. Reactivos para la premezcla de reacción de los ensayos de PCR de control

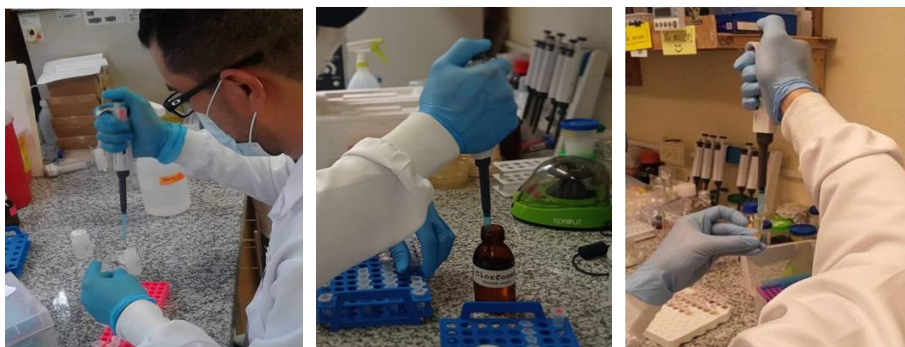


Foto 73. Adición de diferentes reactivos

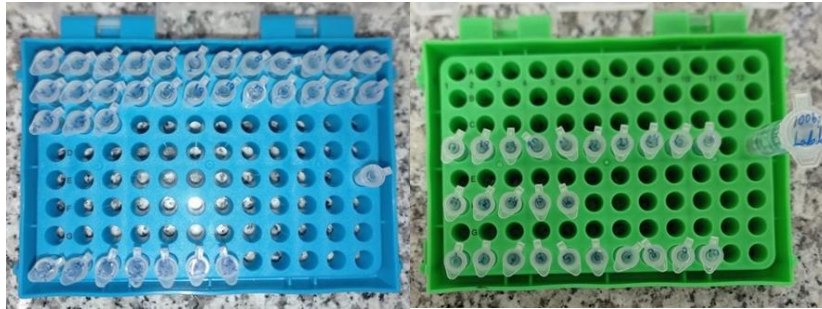


Foto 74. Muestras de tejido e hisopados listas para amplificarse



Foto 75. Amplificación de las muestras de tejido e hisopados en el termociclador

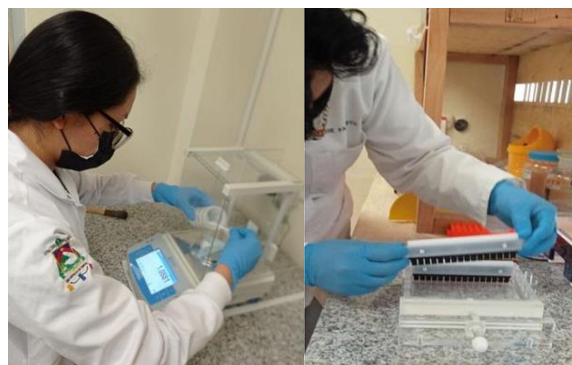


Foto 76. Elaboración del gel de agarosa para el proceso de electroforesis



Foto 77. Depósito de los productos amplificados en los pocillos del gel



Foto 78. Resolución de los amplicones en la cámara de electroforesis



Foto 79. Colocación del gel con los productos resueltos en el transiluminador

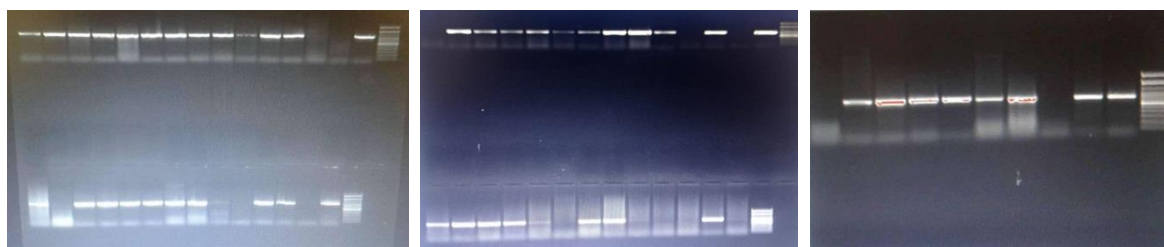


Foto 80. Imágenes capturadas con el fotodocumentador

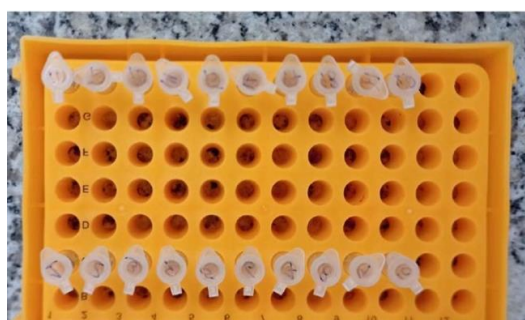


Foto 81. Muestras de tejido nervioso y cardíaco seleccionadas para secuenciarse

Anexo G. Secuencias obtenidas de los productos de PCR

Table with 10 columns: Sample ID, Sequence 1, Sequence 2, Sequence 3, Sequence 4, Sequence 5, Sequence 6, Sequence 7, Sequence 8, Sequence 9. Rows include sample IDs like H230125-007_E03_1_CPVC and their corresponding DNA sequences.

Table with 10 columns: Sample ID, Sequence 1, Sequence 2, Sequence 3, Sequence 4, Sequence 5, Sequence 6, Sequence 7, Sequence 8, Sequence 9. Rows include sample IDs like H230125-007_E03_1_CPVC and their corresponding DNA sequences.

Table with 10 columns: Sample ID, Sequence 1, Sequence 2, Sequence 3, Sequence 4, Sequence 5, Sequence 6, Sequence 7, Sequence 8, Sequence 9. Rows include sample IDs like H230125-007_E03_1_CPVC and their corresponding DNA sequences.


```

H230125-007_E07_17_CPV      GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTAT-CATTT TTTTTTTTTT A
H230125-007_M11_17_CPV      GATAATGTAT -GCTACCAAC AGATCCAATG AGTAA-GCAT G----- - - - - - - - - -
H230125-007_G07_18_CPV      GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTATACATAA TTTTTTATTA A
H230125-007_O11_18_CPV      GATAATGTAT -GCTACCAAC AGATCCAATG AGTAAATCCGT G----- - - - - - - - - -
H230125-007_I07_19_CPV      GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTATATATTT TTTTTTTTTT A
H230125-007_A13_19_CPV      GATAATGTAT -GCTACCAAC AGATCCAATG GAGGTAATGC AAC----- - - - - - - - - -
H230125-007_K07_20_CPV      GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTATACATTT TTTTTTTTTT A
H230125-007_C13_20_CPV      GATAATGTAT -GCTACCAAC AGATCCAATG GAGTAAAGCA CC----- - - - - - - - - -
2APCR_PRODUCTR-MF177       GA----- - - - - - - - - -
2APCR_PRODUCT-MF177277      GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAT CAGGAATTAA CTATACTAAT ATATTTAATA C
2BPCR_PRODUCTR-MF177       GA----- - - - - - - - - -
2BPCR_PRODUCT-MF177280     GATAATGTAT TGCTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTATACTAAT ATATTTAATA C
2CPCR_PRODUCTR-MF177       GA----- - - - - - - - - -
2CPCR_PRODUCT-MF177286     GATAATGTAT TACTACCAAC AGATCCAATT GGAGGTAAAA CAGGAATTAA CTATACTAAT ATATTTAATA C
    
```