



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

**CARACTERIZACION DEL PARVOVIRUS CANINO
AISLADO EN CULTIVO CELULAR A PARTIR DE
CACHORROS CLINICAMENTE SANOS Y ENFERMOS.
POR INMUNOFLOURESCENCIA DIRECTA Y
HEMOAGLUTINACION**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
ARTURO GASCA DIAZ**

ASESOR: M. V. Z. MIGUEL ANGEL SOTO PEREZ

COASESOR: M. V. Z. LUIS JORGE ALANIS CALDERON

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



ESTADO LIBRE Y SOBERANO
DE QUERÉTARO
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Caracterización del parvovirus canino aislado en cultivo celular
a partir de cachorros clínicamente sanos y enfermos, por inmunofluorescencia directa y hemoadsorción.

que presenta el pasante: Arturo Gasca Díaz
con número de cuenta: 8002417-2 para obtener el TÍTULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 8 de Noviembre de 1996

PRESIDENTE	<u>M. en C. Raúl Mar Cruz</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Alejandro Martínez Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Luis Jorge Alanís Calderón</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MVZ. Rodolfo Córdoba Ponce</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Marco Antonio Mendoza Saavedra</u>	

INDICE DE LA TESIS

	<u>Página</u>
1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	2
3.- OBJETIVOS	4
4.- HIPOTESIS	5
5.- MATERIAL Y METODO	6
6.- RESULTADOS	11
7.- GRAFICA	12
8.- CUADROS	13
9.- DISCUSION	14
10.- CONCLUSIONES	20
11.- FOTOGRAFIAS	21
12.- LITERATURA CITADA	23

RESUMEN

Se estudio el comportamiento y caracterización del parvovirus canino (PVC), en sistemas celulares a partir de la obtención de heces de cachorros sanos y cachorros enfermos de gastroenteritis hemorrágica (GEH), con la realización de pruebas de diagnóstico en la detección del antígeno viral. Cada muestra fue inoculada en los cultivos celulares CRF1 y A72 para así evaluar la capacidad del virus en: 1) Producir efecto citopático, 2) Cuerpos de inclusión, 3) Reaccionar frente a un conjugado fluorescente anti-PVC y 4) Hemaglutinar glóbulos rojos de cerdo. Los resultados mostraron que:

a) Se observó que tanto un 17 % de perros sanos como el 10 % de perros enfermos de un total de 20 perros fueron positivos a todas las pruebas de diagnóstico para determinar la presencia del antígeno viral.

b) El efecto citopático observado fue de un 27.5 % en los perros sanos y siendo negativos a todas las pruebas de diagnóstico de virus, siendo este diferente al causado por los parvovirus caninos.

c) Los análisis de la infección celular demostraron la acumulación del antígeno viral en los núcleos en las 12 y 24 hrs. Después de la infección en sistemas celulares CRF1 y A72.

d) En la prueba de hemaglutinación para detección de la hemaglutinina viral presente en las heces. Solo 16.7 % de los animales sanos y un 60 % de los animales enfermos con GEH no presentaron la hemaglutinina viral llegando a ser positivos en ambos animales las demás pruebas de diagnóstico.

INTRODUCCION

La parvovirus canina es una enfermedad de tipo viral que produce lesiones en el tejido linfoide, intestino delgado (duodeno, yeyuno) y en algunos casos en el miocardio de los perros - principalmente en animales jóvenes (6,29,30,39,45). El PNC pertenece a la familia parvoviridae, es un virus DNA, no posee envoltura y contiene una cadena sencilla de DNA cuyo peso molecular es de 1.6 a 2.2×10^6 daltons. La forma es esférica y de simetría icosaédrica mide de 18 a 24 milímetros de diámetro, su cápside cuenta con 12 a 32 capsómeros y su peso molecular es de 2 millones de daltons. En las investigaciones del parvovirus canino (PNC) en 1976 se observó un virus sinuado de los perros en las muestras fecales de animales clínicamente sanos llamándolo - posteriormente parvovirus canino tipo 1 (CPV-1) (20,29,33).

Llegándose a reconocer en 1978 a un parvovirus canino tipo 2 - (CPV-2) (22,30,31,32).

En 1980 el (CPV-2) fue reemplazado por un parvovirus canino tipo 2a (CPV-2a) que presentó cambios genéticos y una fuerte variación antigénica, dando lugar a la aparición del parvovirus canino tipo 2b (CPV-2b) después de 1982 (25,30,32).

Para el diagnóstico y el estudio del parvovirus canino se han empleado diferentes técnicas de laboratorio ya que es imposible determinar por medio de signos clínicos que el (PNC) sea el agente causal de gastroenteritis hemorrágica o la miocarditis, siendo las técnicas de laboratorio las siguientes:

1) Aislamiento viral, así como reproducción de la enfermedad -
clínicamente, 2) Determinación del antígeno viral, 3) Detección --
del nivel de inmunoglobulinas (Igs) sericas y 4) La Histopatolo-
gía (35,43,46).

Una de las características del parvovirus es la propiedad de -
aglutinar glóbulos rojos de diferentes especies por ejemplo hemá-
tias de cerdo (7,8,33,40,41).

Esta característica consiste en la combinación de los virus --
con receptores específicos de la superficie de los hematies. Ha-
mándosele a la parte del virus que se encarga del fenómeno de la
hemoaglutinación: hemoaglutinina viral; esta se asocia a una --
fracción soluble separable de la partícula viral y es probable-
mente una lipoproteína que no indica que el virus sea infectante
(10).

Otra de las características del parvovirus es su capacidad de
adaptarse a líneas de cultivo celular en las cuales pueden pro-
ducir efecto citopático como evidencia de replicación viral, co-
mo es el caso de las siguientes líneas celulares: riñón de gato
(CRFK), células de tumor canino (A-72) y riñón de perro (MDCK),
(NBL-72) (2,4,22,29,35,40,42,50,51).

OBJETIVOS DE LA TESIS

- A) Determinar la capacidad del parvovirus canino, aislado de muestras de heces de animales sanos y enfermos, para producir:
 - A.1) Efecto citopático en cultivo celular.
 - A.2) Cuerpos de inclusión en sistema de línea celular.
- B) La relación con las pruebas de diagnóstico de inmunofluorescencia directa, hemaglutinación y coloración con giemsa en cultivo celular.

HIPÓTESIS

Existen cepas de parvovirus canino que han perdido la capacidad de hemoaglutinar; sin embargo mantienen tanto su capacidad infectante como su capacidad de propagación en sistemas de línea celular manteniendo los títulos infectantes; produciendo efecto citopático y cuerpos de inclusión intranucleares.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron muestras fecales de cachorros de 1 a 5 meses de edad (provenientes de casos clínicos particulares) que presentaron cuadro clínico de gastroenteritis, así como de animales sanos.

Las heces fueron tomadas directamente del recto utilizando hisopos o tomando la muestra del suelo al ser evacuada por el animal. Las muestras líquidas de heces que presentaban consistencia líquida (líquida) fueron de 10.0 ml. y de 1.5 g aproximadamente, en heces de consistencia espesa (pastosa) que fueron depositados en tubos de ensayo con tapón estériles previamente rotulados.

Posteriormente las muestras se fueron llevando al laboratorio de diagnóstico donde se almacenaron a -70°C hasta su uso.*

A las muestras se les realizó la prueba de hemaglutinación -- (HA) así como se inocularon en línea de cultivo celular, por triplicado.

Un total de 23 muestras fueron procesadas de la siguiente manera: se les adicionó solución salina resfatada (SPF) con un PH de 7, realizando diluciones 1/10 para después ser homogenizadas por 30 minutos mecánicamente (agitador magnético) centrifugándolas a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, para obtener el sobrenadante el cual fue fraccionado en dos partes.

* Laboratorios de diagnóstico y de productos biológicos Biotell, S. A de C. V. (M. de Cervantes Saavedra No. 20)

La primera parte se utilizó para medir el fenómeno hemoaglutinante y la segunda parte en la elaboración del inóculo e infectar en sistema de líneas celulares.

VIRUS

El antígeno viral que se empleó como control positivo en la hemoaglutinación específica, fue el virus de la cepa C-780916 (ATCC VR-953) de parvovirus canino, que fue propagada en sistema de línea celular de riñón de gato estable CRF1, a partir de técnicas estandarizadas (23).

ERITROCITOS

Se emplearon glóbulos rojos de cerdo. La muestra de sangre fue obtenida en solución Alsever en una relación de partes iguales 1:1 almacenándose a 4°C durante 24 horas. Los eritrocitos se lavaron tres veces en solución amortiguadora de fosfatos (SPF) con un PH de 7, para posteriormente preparar una suspensión de glóbulos rojos al 1 % manteniéndolos en refrigeración hasta su uso en la prueba de HA, la cual se realizó mediante el procedimiento descrito por Senda et al (41).

PREPARACION DEL INOCULO

Los inóculos fueron preparados de la siguiente forma: Se descongelaron previamente las muestras en baño frío.

Una vez descongelada se tomó 1 ml de cada muestra con pipeta serológica, depositándolas en tubos de ensayo, realizando diluciones decimales con medio de cultivo fresco, pipeteando 7 veces cada dilución. De la dilución 1/10 a la 1/1000 fueron centrifugadas a 6000 r. p. m. por 5 minutos se tomó el sobrenadante y se

esterilizó por filtración con membrana cuya porosidad fue de ---
0.22 micras. EL inóculo fue almacenado a -70°C hasta su uso.

PREPARACION DEL CULTIVO CELULAR E INOCULACION:

Se utilizaron las siguientes líneas celulares CPEK y A-72, a partir de cultivos, de estas líneas, fueron primeramente propagadas las células con medio de cultivo celular ajustado a un PH de 7.4 con 7.5 % de bicarbonato de sodio y el 10 % de suero fetal bovino (SFB) previamente probado de ser libre de actividad de inhibición de la hemaglutinación (IH) específica como inespecífica.

El inóculo se propagó en células que fueron sembradas en tubos leighton, a cada uno, se le sembró 5×10^6 de células por 0.1 ml, con 3 ml de medio con (SFB). Después de la adherencia celular de 4 a 6 horas el medio fue renovado, y un mililitro de --- muestra se inoculó en las células dejándolo una hora a 37°C durante 5 días.

Al mismo tiempo se manejaron los controles positivo y negativo siendo el primero con virus de inóculo, de la cepa VR-C 780916 - teniendo un título de 10 dosis infectante cultivo celular 50 % - por ml (DICC 50 % /ml).

Una vez realizado el periodo de incubación, el efecto citopático (ECP)* fue evidente al término de este periodo, se procedió a la técnica de fijación de cultivo celular y posteriormente a la técnica de tinción.

* Se observó en microscopio invertido de marca olimpus con --- aumentos de 10, 40, y 100 X.

FIJACION Y TINCION DE GIEMSA*

Una vez presentado el efecto citopático se lavaron las monocapas de los tubos leighton con (SPF) y se fijaron con metanol absoluto a 10°C, para despues ser teñidas con el colorante Giemsa, de acuerdo a la técnica descrita por Senda *et al* (42).

FIJACION Y PRUEBA DE INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA (IFD)**

Una vez presentado el efecto citopático y fijadas las monocapas con metanol absoluto a 10°C, se procedió a realizar la técnica de IFD, utilizando conjugado de anticuerpos policlonales hacia el nucleocápside del virus del parva *** unido a un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (ITC) según procedimientos descritos por Kawamura (17) y Br. Macrae (5).

El conjugado se evaluó siguiendo la técnica previamente descrita por Larghi (20).

Se emplearon los criterios señalados por Larghi (20), para valorar el marcado inespecifico, especifico y autofluorescencia -- utilizando siguientes testigos:

1) testigo positivo.

Línea celular de riñón de gato (CRFK) previamente infectada -- con la cepa VR-C 780916 de VPC, fijadas con metanol y mantenidas a 20°C hasta su utilización.

* Se observó en microscopio de campo claro con aumentos de --- 100X en inmersión marca Carl Zeiss.

** Se observó en fotomicroscopio con aumento de 100X en inmersión de marca Carl Zeiss de epifluorescencia.

*** El conjugado anti-parva fue proporcionado por el laboratorio Biotell. Por Special Assays Inc Nashville Tnn. Utilizándolo en dilución 1/50 de acuerdo a las especificaciones del producto.

2) Testigo negativo.

Línea celular de riñón de gato (CRFK) sin infectar, fijados--- con metanol y conservados en igual forma que los testigos posi--- tivos.

Incluyendo además los testigos indicados por Bramdtzaegt(5):

-Frotis con abundancia en polimorfonucleares provenientes de - leucocitos de conejo.

-Preparaciones de tejido oral (gingival) e intestinal con gran cantidad de eosinófilos.

-Preparaciones de mucosa gástrica y de colon como sustrato de células epiteliales y columnares.

Estas preparaciones fueron fijadas y conservadas en la misma - forma que las anteriores.

RESULTADOS

En la gráfica número 1 se muestra el estado clínico de los 23 cachorros examinados: cinco animales (22%) presentaron con cuadro clínico de gastroenteritis (GE) y dieciocho (78%) estaban -- clínicamente sanos.

De las pruebas de identificación del aislamiento viral por -- técnicas de serología, como son la hemaglutinación (HA), la -- inmunofluorescencia directa (IFD), las de reconocimiento de la -- replicación viral, a partir del efecto citopático (ECP) y la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares eosinófilos (CI) -- por coloración Papanicolaou; Realizadas a los 23 muestras de heces -- los resultados son los siguientes:

De los 18 cachorros sanos, 4 (22.2%) presentaron reacción positiva en todas las pruebas, encontrándose diferencias en los -- demás animales, 5 (27.8%) sólo presentaron reacción positiva a -- (ECP), y una reacción negativa en las otras pruebas, 3 (16.7%) -- fueron negativos a la hemaglutinación y positivos las demás -- pruebas y 6 (33.4%) fueron negativos a todas las pruebas. Como -- se muestra en el cuadro número 1.

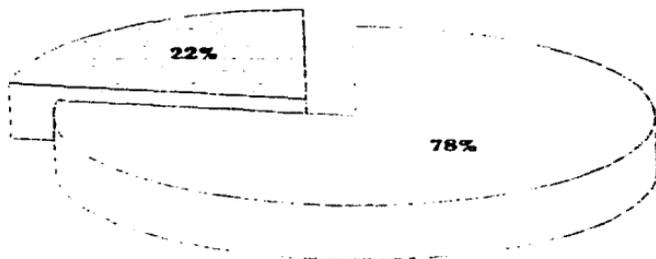
En el cuadro número 2 se resume el resultado de los animales -- clínicamente enfermos, donde 3 (60%) cachorros de 5 fueron positivos a todas las pruebas.

Presentándose en los 2 (40%) restantes cachorros una reacción negativa a la prueba de HA y positiva a las demás pruebas.

GRAFICA NUMERO 1

Estado Clínico de los 23 Cachorros Examinados

5 CACHORROS CON CUADRO CLÍNICO DE GEH.



18 CACHORROS CLÍNICAMENTE SANOS.

CUADRO NUMERO 1

ANIMALES CLINICAMENTE SANOS

NUMERO DE CACHORROS SANOS	PRUEBAS				%
	HA	IFD	ECP	CI	
4	+	+	+	+	22.3
5	-	-	+	-	27.8
3	-	+	+	+	16.7
6	-	-	-	-	33.4

CUADRO NUMERO 2

ANIMALES CON MANIFESTACION CLINICA DE GASTROENTERITIS

NUMERO DE CACHORROS ENFERMOS DE GEH.	PRUEBAS				%
	HA	IFD	ECP	CI	
3	+	+	+	+	60
2	-	+	+	+	40

DISCUSION

Recientes aislamientos virales de parvovirus canino (PVC) en perros con enfermedad aguda intestinal, como en animales clínicamente sanos, se han venido informando (6). En este trabajo se encontro que muestras de heces de animales clínicamente sanos, fueron positivas a las pruebas de diagnóstico de hemaglutinación, inmunofluorescencia directa, efecto citopático y cuerpos de inclusión, siendo este resultado semejante a lo informado con anterioridad por (35), que señala que dentro del rango de manifestación clínica de la infección por parvovirus canino puede ser una infección subclínica, infección aguda o infección sobreaguda y en los estudios serológicos hallaron que la infección subclínica es la más común.

Así tambien en otro estudio (34), informan que antes de la vacunación de 25 a un 90 por ciento de los perros clínicamente sanos en pruebas de diagnóstico resultan positivos a parvovirus como resultado previo de una infección subclínica.

Por otro lado Parrish et al (32) informan que el inicio súbito de la enfermedad con sintología a una miocarditis o gastroenteritis es incierta, ya que se han identificado partículas semejantes a parvovirus en perros sin que estos presenten signo alguno de la enfermedad, esto puede ser debido a que un cambio mínimo o una mutación en el genoma del parvovirus puede hacer que la patogenia de la parvovirus canina sea diferente y cambie así su relación con sus hospedadores.

Dentro de las características de la capacidad de réplica viral en las líneas celulares de diversos virus citocidas, está la de producir daño celular conocido también como efecto citopático (EPC) (11). El (PVC) tiene capacidad de producir efecto citopático (ECP) en las líneas celulares, como en la de riñón de gato, la de riñón de perro y en células tumorales de perro, presentándose en las formas de granulación celular, cuerpos de inclusión, sincitios, células redondas, y sobre la adherencia celular en forma desigual, esto es informado por Faradise *et al* (28). Sin embargo dentro de este trabajo se obtuvo la presencia de cambios morfológicos a nivel celular, de los inoculados de las muestras fecales sobre las líneas celulares como en la A-72 y la CRFk, no obstante en, las otras pruebas realizadas, como la IFD y la HÁ se obtuvieron resultados negativos, esto fue presente en los perros con signología clínicamente sana, estos cambios morfológicos a nivel celular no corresponden a la de una infección por réplica viral del (PVC) como es informado con anterioridad por Hulas (14). Ya que dichas alteraciones morfológicas en este estudio correspondieron más a los cambios ocasionados por variaciones bioquímicas propias de las células, que generalmente conducen a trastornos funcionales propios de las células y a través del tiempo en muchos casos a cambios histopatológicos. De otra manera estos cambios morfológicos pudieron ser causados por una nutrición no favorecida como también una alteración en el pH, y un mal manejo en el control del número de pases de las líneas celulares (11). Otra de las causas por las que se presentaron estos cambios fueron debido a la adaptación de los virus inocu-

lados ^{del} sobre los cultivos celulares, como fue en el caso de la cepa mutante de parvovirus canino 1a (CPV-102/10) derivada de la cepa CPV-94 que después de 5 pases adicionales en células de riñón de perro y también 10 pases en células NFK, perdió su capacidad de replicarse adecuadamente en perros y en la línea celular A-72 que fue encontrada por Parrish et al (33). En término a una explicación de estos cambios morfológicos que no son específicos de una manifestación de infección celular por el parvovirus canino, fue que al usar la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) en células infectadas por los virus de parvo, no se presentó la distribución específica viral uniforme sobre los núcleos, ya que este patrón es debido a la localización de antígenos virales en el borde de la heterocromatina (28). Dentro de las pruebas para caracterizar la capacidad de infección viral en los sistemas celulares, la prueba de IFD confirmó la capacidad infectante de los virus aquí analizados, presentando una distribución intranuclear del antígeno en forma homogénea y similar a la observada por Paradeso et al (29) Simarro et al (43).

En la detección a partir de muestras fecales de perros sanos sólo el 33 % fueron negativos en todas las pruebas de diagnóstico para la detección y el aislamiento del antígeno viral; Estos casos pudieron haber presentado una infección viral subclínica - ya que en el muestreo fueron hechas antes o después del periodo de eliminación del virus a través de las heces. Considerando que los estudios de infección natural como los de una patogenia

experimental demostraron que el virus puede ser detectado y a su vez aislarse a partir del día 4 y disminuyendo conforme se incrementan los anticuerpos neutralizantes séricos siendo el cuarto día y el sexto los de mayor eliminación (6,24).

Sobre los casos en los que se obtuvo resultados negativos a la prueba de hemaglutinación (HA) y positivos a las demás pruebas, tanto en animales sanos como en animales con cuadro de gastroenteritis, se encontró que no todas las cepas de parvovirus canino son capaces de hemaglutinar, debido a que pierden esta capacidad ya sea *in vitro* durante pases repetidos o *in vivo* a través de su paso por los animales (25). La pérdida de la capacidad hemaglutinante se debe a la mutación que sufren las proteínas VP-1 y VP-2 que se encuentran en la capsida del virus no hemaglutinante sin embargo estos virus no hemaglutinantes no pierden su capacidad antigénica al infectante (25). Además existen estudios sobre la diferencia de la actividad hemaglutinante (HA) de cepas aisladas de parvovirus canino desde 1977 que revelaron que dichas cepas presentaban actividad hemaglutinante similar a la de los virus de panleucopenia felina (VPLF) y virus de la enteritis del mink (VEM) mientras que los actuales aislamientos virales de parvovirus canino ya no presentaron esta característica activa de la hemaglutinación como el (VPLF) y el (VEM). Estos hallazgos sugieren que las proteínas VP1 y VP2 encargadas de la hemaglutinación en el (VPC) presentan una alteración en el proceso de adaptación en los perros de una forma diferente que el -

(VPLF) o el (VEM) debido a una mutación, las mutaciones adicionales pudieron haber ocurrido en las proteínas VP1 y VP2 encargadas de la hemaglutinación durante pocos años. Existen pruebas como la inhibición de la hemaglutinación cruzada para la detección del parvovirus canino con la cual se demostró que no todas las cepas de parvovirus canino son iguales y que existen cepas viejas que dieron origen a cepas nuevas a través de mutaciones - las cuales cambiaron la capacidad hemaglutinante, por lo tanto de antigenicidad de las cepas nuevas dando como resultado un aumento en la habilidad para multiplicarse y diseminarse en los perros (9,15,19,20,25,26,37,38,44,49).

Con respecto a los 5 animales clínicamente enfermos con cuadro clínico de una gastroenteritis hemorrágica GEH observamos que -- sólo 3 de ellos con resultados positivos en todas las pruebas de diagnóstico para la detección del antígeno parvoviral muestran -- que la presencia de GEH podría haber sido debido al parvovirus -- canino PVC, un cuadro clínico de GEH es con mucha frecuencia observado en la práctica clínica de perros jóvenes, adultos y viejos, este cuadro clínico de GEH no es causado por una acción directa de la infección viral del PVC. Es más bien, que el virus -- del PVC tiene su acción de infección directa sobre linfocitos T, esto ocasiona una disminución transitoria de la respuesta linfocitaria de células T. Así es claro que la acción de infección -- viral directa es hacia el tejido linfoide como son las tonsilas, las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos; permitiendo así que el PVC tenga un efecto inmunomodulador en el --

sistema inmunológico (10,25) dando lugar a la participación de otros agentes biológicos activos de naturaleza bacteriana, viral, parasitaria y micótica (Campylobacter jejuni, Clostridium perfringens, Salmonella sp., Rotavirus, Coronavirus, Calicivirus, Herpesvirus, Astrovirus, Virus diminuto de los perros, Coccidias Giardias, Toxocara canis, Ancylostoma caninum, Dipylidium caninum, Candida albicans) e inclusive por causas físicas, químicas y alérgicas (1,3,12,13,16,18,21,22,39,47,48,49).

La dificultad para confirmar que el PVC es el causante del cuadro clínico de GEH ha existido siempre pues, por mucho tiempo se consideró que era causado por el PVC. No obstante a partir de 1985 año en que fueron publicadas las dos primeras patogenias; y hasta la actualidad no se ha comprobado que un cuadro clínico de GEH sea un síndrome de infección de una parvovirusis.

Para sustentar lo anterior en las 2 patogenias de tipo experimental de la actividad de infección viral del PVC por (6,24) nos muestra claramente la ausencia de un cuadro clínico de GEH en cachorros tipo convencional que estos fueron infectados con cepas patógenas de PVC, obteniendo resultados en ambas patogenias un solo animal de 20 que este presentó heces de consistencia blanda y una piroxia de 39.5°C evidenciando así sólo en ambas patogenias una verdadera infección del tejido linfoide e incluso llegando a la necrosis.

CONCLUSIONES

El parvovirus canino infecta a los perros, sin que estos manifiesten signos clínicos de gastroenteritis hemorrágica como se pudo observar en este trabajo donde, perros clínicamente sanos fueron positivos a la hemoaglutinación, cuerpos de inclusión, -- efecto citopático e inmunofluorescencia directa.

Se encontraron características del virus como fue la presencia de proteína hemoaglutinante en algunos y en otros virus de parvo no presentó esta proteína, por lo que es obligado correr pruebas confirmativas complementarias, como serían la capacidad de infección del virus en sistemas celular o en sistemas biológicos.

Es necesaria la utilización de las pruebas de diagnóstico como (hemoaglutinación, aglutinación, cuerpos de inclusión, efecto -- citopático, inmunofluorescencia directa y Elisa) para la detección del antígeno viral en el diagnóstico del parvovirus canino, ya que es imposible determinar que un animal tiene el virus tan solo por que manifiesta un cuadro clínico de gastroenteritis hemorrágica.



*Micrografia Ng1 de la prueba de inmunofluorescencia directa IFD
de células CRFK, negativas a la infección por PVC.
Células fijadas con metanol 24 hrs. pos-infección y teñidas con
isotiocianato de fluoresceína ITCF. 800 X*



Micrografía Igi de la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD) de células CPE infectadas con VFC. Se observa fluorescencia específica en los núcleos, presentando los antígenos de VFC uniformemente distribuidos a través de los núcleos apareciendo en forma excluida de los mismos, observándose células formando placitos como lo indican las flechas. 300 x.

LITERATURA CITADA

- 1.- Anderson, G. P; and Pidgeon, G. : Candidiasis in dog with parvoviral enteritis. J. Am. Anim. Hosp. Ass. **23**: 27-30 --- (1986-1987).
- 2.- Basak, S; and Turner, H.: Infectious entry pathway for canine parvovirus. Virology **184**: 368-376 (1992).
- 3.- Sasurco, E. L. : "Frecuencia de Campylobacter jejuni, Salmonella spp y Parvovirus canino en perros con gastroenteritis en la ciudad de Mexico". Tesis de licenciatura: Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, D.F. 1988.
- 4.- Sinn, L. N; Merchusieri, P. H. and Stephenson, E. H. : Establishment of a canine cell line: Derivation, characterization and viral spectrum. Am. J. Vet. Res. **41**: 855-860 (1980).
- 5.- Brandtzaegt, P. : Rhocamine conjugates: Specific and non-specific binding properties in immunohistochemistry. Ann. New York Acad. Sci. **254**: 33 (1975).
- 6.- Carman, P. S. and Povey, R. C. : Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: Haematology, serology and virus recovery. Vet. Res. **25**: 134-140 (1985).
- 7.- Carmichael, L. E; Jubert, J. C. and Pollock R. V. H. : -- Hemoagglutination by canine parvovirus; Serologic studies and diagnostic applications. Am. J. Vet. Res. **41**: 764-791

(1980).

- 8.- Chang, S. F; Sgro, J. Y and Parrish, C. R. : Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus - coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. J. Virol ; **64**: 6858-6867 (1990).
- 9.- Cortes, E; San Martin, G; Langeveld, U; Melzer, P. and -- Dalsgaard, A. : Topographical analysis of canine parvovirus and recombiant FC capsids. J. Gen. Virol; **74**: 2005--2010 (1993).
- 10.- Cunningham, R. D. : Virilogia Practica. 1^a ed. Acribia, Zaragoza, España, 1971.
- 11.- Fenner, F; Baechman, A; Gibbs, L; Murphy, A; Studdert, J. and White, D. : Veterinary Virology, 1^a ed. Academic Press INC, United States of America, 1967
- 12.- Fox, G; Krakowka, S. and Taylor, N. : Acute onset Campylobacter associated gastroenteritis in adult beagles. J. Am. Vet. Med. Ass; **187**: 1268-1271 (1985).
- 13.- Fracer M. G. : El manual Merck de veterinaria 3^a ed. Gen--trum, Madrid, España, 1988.
- 14.- Hulas, G. : Immunofluorescence test for identification of canine parvovirus (CPV-2) propagated in FC cell line. --- Vet Med; **66**: 467-490 (1990).

- 15.- Horiuchi, M and Shinagawa. : Construction of and infectious DNA clone of cell strain of canine parvovirus and characterization of the virus derived for the clone. Arch of Virol: 136: 227-236 (1993).
- 16.- Iscgal, E; Oshima, M; Mizusawa, N; Hayashi, M. and Namio-ka, S. : Escherichia coli associated endotoxemia in dog with parvovirus infection. Jap. J. Vet. Sci: 50: 597--606 (1989).
- 17.- Kawamura, A. : Fluorescent Antibody Technique and their Applications. 2nd ed. University of Tokyo, Japan, 1977.
- 18.- Sanchez, S; Tilden, P. S; Arnold, M. F. and Winters, K.: Canine parvovirus infection potentiates canine distemper encephalitis attributable to modified live-virus vaccine. J. Am. Vet. Med. Assoc: 180: 107 (1982).
- 19.- Langeveld, P. M. J; Casal, J; Vela, E; Dalsgaard, A; Smal- le, H. S; Purdy, G. W. and Meloen, H. R. : B-Cell Epitopes of Canine Parvovirus: Distribution on the Primary Structure and Exposure on the Viral Surface. J. Virol: 67: 765-772 (1993).
- 20.- Larghi O. P. : prueba de anticuerpos fluorescentes para rabia. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica No.8 de la OPS: 2: 5-24 (1975).
- 21.- Lindsay, S. and Byron, L. : "Coccidial parasites of cats and dogs". Compend. Contin. Educ: 13: 759-765 (1991).

- 22.- Macartney, L; Parrish, C. R; Binn, L. N. and Carmichael -
L. E. : Minute virus of canine (MVC), canine parvovirus-1
pathogenicity for dogs: hematology, serology and virus --
recovery. Cornell Vet; 29: 131-143 (1968).
- 23.- Merchant, J. D; Rahn, H. R. and Murphy Jr, M. W. : Hand-
book of Cell and Organ Culture, 4th ed. Burgess Publi-
shing Company, United States of America, 1960.
- 24.- Meunier, P. C. : The pathogenesis of canine parvovirus --
infection. Ph.D. thesis: Cornell University, Ithaca, N.Y.
- 25.- Mochizuki, M; Haraoka, R. and Nakatani, H. : Antigenic -
and genomic variabilities among recently prevalent parvo-
viruses of canine and feline origin in Japan. Jap. Vet.
Microbiol; 38:149 (1983).
- 26.- Nara, L; Winters, R; Rice, B. J. and Frankha, E. : Sist-
temic and local intestinal antibody response in dogs giv-
ven both infective and inactivated canine parvovirus. Am.
J. Vet. Res; 44: 1969-1994 (1983).
- 27.- Olsen, R. G; and Frankha, E. : Immune dysfunctions asso-
ciated with viral infection. Comp. Cont Educ. Vet. Pract;
6: 422 (1984).
- 28.- Paradise, R. T; Solon, L; Rhode, III, and Singer, I. I. :
Canine parvovirus: a Biochemical and Ultrastructural Cha-
racterization. J. Gen. Virol; 62: 113-125 (1982).

- 29.- Parrish, C. R.; Aquadro, C. F.; Strausheim, M. L.; Everman, J. F.; Sgro, J. Y. and Mohammed, H. O. : Rapid antigenic-- Type replacement and DNA sequence evolution of canine --- parvovirus. J. Virol. **65**: 6544-6552 (1991).
- 30.- Parrish, C. R.; Burtonboy, S. and Carmichael, L. E.: Cha-- racterization of a nonhemagglutinating mutant of canine - parvovirus. Virology **165**: 230-232 (1988).
- 31.- Parrish, C. R.; Hays, P.; Foley, W.; Everman, J. F.; Senda, M. and Carmichael, L. E. : The global spread and repla--- cement of canine parvovirus strains. J. Virol. **69**: 1111-- 1116 (1988).
- 32.- Parrish, C. R. and Carmichael, L. E. : Characterization - and Recombination Mapping of an Antigenic and Host Range Mutation of Canine Parvovirus. Virology **169**:121-132 (1988).
- 33.- Parrish, C. R.; O'Connell, M. R.; Evermann, F. J. and Carmi-- chael, L. E. : Natural variation of Canine Parvovirus. -- Am. Ass. Adv. Sci. **230**: 1046-1048 (1985).
- 34.- Pollock, V. H. R. and Carmichael, L. E. : Canine viral -- enteritis. Vet. Clin. N. A. S. Am. Pract. **13**: 551-565 --- (1983).
- 35.- Pollock, V. H. R. and Parrish, C. R. : Canine parvovirus. Compar Pathol of Viral Disease; 1 chapter 10 (1985).

- 36.- Rimmelzwaan, B. P.; Carlson, J.; Uytendaele, F. G. D. M. and Osterhaus, A. D. M. E. : A synthetic peptide derived from the amino acid sequence of canine parvovirus structural - proteins which defines a B cell epitope and elicits antiviral antibody in Balb/c Mice. J. Gen. Virol. 71:2741-2745 (1990).
- 37.- Rimmelzwaan, B. P.; Heijnen, J. W. R.; Teunhaar, S.; Poelen - M. G. M.; Carlson, J.; Osterhaus, A. D. M. and Uytendaele, F. G. D. M. : Establishment and characterization of canine parvovirus-specific murine CD4⁺ T cell clones and their use for the delineation of T cell epitopes. J. Gen. Virol. 71: 1095---1102 (1990).
- 38.- Rimmelzwaan, B. P.; Poelen, M. G. M.; Teunhaar, S.; Carlson, J. and Uytendaele, F. G. D. M. : Delineation of canine parvovirus T cell epitopes with peripheral blood mononuclear cells and T cell clones from immunized dogs. J. Gen. Virol. 71: 2021-2029 (1990).
- 39.- Robinson, W. F.; Wilson, G. E. and Flower, P. F. L. : Canine parvovirus disease: Experimental reproduction of the enteric form with a parvovirus isolated from a case of -- myocarditis. Ann. Pathol. 11: 589-599 (1989).
- 40.- Senda, M; Hirayama, H; Itoh, O. and Yamamoto H. : Canine parvovirus: Strain Difference in haemagglutination acti--

- vity and antigenicity. J. Gen. Virol.; **69**: 349-354 (1983).
- 41.- Senda, M; Hirayama, N; Yamamoto, H. and Murata, K. : An improved hemagglutination test for study of canine parvovirus. Vet. Microbiol.; **12**: 1-6 (1986).
- 42.- Senda, M; Ohishi, Y; Hirayama, N. and Yamamoto, H. : Detection of parvovirus in cell culture. Ann. Rep. Natl. Vet. Assay. Lab.; **26**: 11-14 (1987).
- 43.- Sinarro, J; Caballero, G; Castro, J. M. and Ruiz, G. : Canine parvovirus: intrinsic characteristics of the infective infection. Med. Vet.; **6**: 33-35 (1982).
- 44.- Sinarro, J; Caballero, G; Martínez, J; Marcotegui, M. A; Castro, J. M. and Ruiz, G.: Isolation, identification and physicochemical characterization of canine parvovirus. Med. Vet.; **44**: 213-225 (1987).
- 45.- Soto, F. M. A. Lesiones histopatológicas y su posible asociación con la infección por parvovirus canino (PVC). - Tesis de licenciatura: Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1986.
- 46.- Soto, F. M. A; Palacios, A. J. y Del Toro, E. D. : Prueba de hemaglutinación en heces como diagnóstico de infección por parvovirus canino. Signal, México, D. F. 1982.
- 47.- Turk, J; Fales, W; Miller, M; Pace, L; Fischer, J; Jones

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- son, G; Kreeper, J; Turquist, S; Pittman, L; Rottinghaus, A. and Gusser, H. : Enteric Clostridium perfringens infection associated with parvoviral enteritis in dogs. J. Am. Vet. Med. Ass.; 280: 991-994 (1982).
- 48.- Turk, J; Miller, M; Brown, T; Fales, W; Fischer, J; Gussner, M; Nelson, D; Shaw, P. and Solerzano, R. : Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvovirus enteritis. J. Am. Vet. Med. Ass.; 198: 771-775 (1990).
- 49.- Zajac, A. M. D. : "Giardiasis". Comp Cont Educ; 14: 504-506 (1992).
- 50.- Zajac, J; Zuffa T. and Sediva L. : Use of direct immunofluorescence to demonstrate canine parvovirus in tissue culture. : Vet. Med.; 77: 337-346 (1982).
- 51.- Zuffa, T. : Growth of attenuated strains of canine parvovirus, mink enteritis virus, feline panleukopenia virus and canine distemper virus in various cell cultures. Vet. Med.; 72: 633-640 (1987).