

01621
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"DETERMINACION DEL PARVOVIRUS CANINO EN HECES
POR MEDIO DE LA TECNICA REACCION EN CADENA DE LA
POLIMERASA"

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MAURICIO AMARO NAPOLES

ASESORES: MVZ. DANIEL MARTINEZ GOMEZ
DR. JORGE CRUZ VERA
MVZ. MYRNA A. VICENCIO MALLEN
MVZ. RAYMUNDO ITURBE RAMIREZ

MEXICO, D. F.

2003.



Q



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**TESIS
FALLA
DE
ORIGEN**

DEDICATORIA

A mi madre: **Maria Felix Nápoles Barrales.**

Autorizo a la Dirección General de Inspección de la
UNAM a divulgar en forma electrónica el contenido
contenido de esta tesis doctoral.

NOMBRE: MAURICIO

AMARO NAPOLES

FECHA: 8 DE DICIEMBRE DE 2003

FIRMA: 

En agradecimiento

A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, muy en especial a todos los que laboran en el Departamento de Microbiología e Inmunología.

A los que siempre estarán conmigo en la risa o el llanto, la alegría o el enojo, en la abundancia o en las carencias en los triunfos y fracasos:

Othir y Yubia

A mi papá, a mi abuelita (chata) y a mi tío Erasmo por su apoyo incondicional.

A mi abuelita Porfi y mis dos abuelos, tomas y polo, a mis tíos Lupe, Vero, Lalo, Fito, Elvia, Héctor, Beto, Chole, Beti, Ani y sus familias que siempre se han preocupado por mi y mis hermanos.

A los integrantes del laboratorio de Serología y a los de Microbiología Molecular

A mis asesores Daniel Martínez Gómez, Jorge Cruz Vera, Myrna A. Vicencio Mallén y Raymundo Iturbe Ramírez

A mi jurado: Antonio Verdugo Rodríguez, Francisco Basurto Alcantara, Yukie Tachika Ohara y Joaquín Aguilar Bobadilla

A todos mis amigos.

Y muy en especial a la dueña de mi vida:

Maricla E. J. C.

e

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HISTORIA.....	3
EL PARVOVIRUS CANINO (PVC) EN LATINOAMÉRICA (LA).....	4
CARACTERÍSTICAS DEL PVC.....	6
REPLICACIÓN DEL PVC.....	9
ENFERMEDAD CLÍNICA (PARVOVIROSIS DEL PERRO).....	12
PATOGENIA.....	12
HISTOLOGÍA DE LOS DATOS CLÍNICOS.....	13
DIAGNÓSTICO.....	16
DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO PARA LA PARVOVIROSIS.....	17
JUSTIFICACIÓN.....	19
HIPÓTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
CÉLULAS Y VIRUS.....	21
REPLICACIÓN Y RECUPERACIÓN DE VIRUS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR.....	21
RECUPERACIÓN DE VIRUS A PARTIR DE HECEAS.....	21
INFECCIÓN DE CULTIVOS CELULARES CON LA CEPA DE CAMPO.....	22
HEMOAGLUTINACIÓN.....	22
INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN.....	23
EXTRACCIÓN DEL ADN.....	23
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	25
DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.....	27
ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA DE PCR.....	27
CLONACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA PCR.....	28
RESULTADOS.....	29
RESULTADOS DE LA HEMOAGLUTINACIÓN – INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HA-IHA) CON LAS MUESTRAS DE HECEAS E INFECCIONES EN CULTIVO CELULAR.....	29
INFECCIÓN DE CÉLULAS A 72 CON LAS DIFERENTES CEPAS DE PVC.....	32
EXTRACCIÓN DEL ADN DEL PVC.....	32
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	33
CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR.....	37
DISCUSIÓN.....	38
CONCLUSIONES.....	42
LITERATURA CITADA.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.....	5
FIGURA 2.....	8
FIGURA 3.....	8
FIGURA 4.....	11
FIGURA 5.....	12
FIGURA 6.....	15
FIGURA 7.....	19
FIGURA 8.....	19
FIGURA 9.....	26
FIGURA 10.....	33
FIGURA 11.....	34
FIGURA 12.....	37
FIGURA 13.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

CUADRO 1.....	2
CUADRO 2.....	30
CUADRO 3.....	31
CUADRO 4.....	36

RESUMEN

AMARO NÁPOLES MAURICIO. Determinación del parvovirus canino en heces por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (bajo la dirección de: MVZ Daniel Martínez Gómez, MVZ. Raymundo Iturbe Ramírez, MVZ. Myrna A. Vicencio Mallén).

Actualmente no existen trabajos sobre la identificación y aislamiento del parvovirus canino (PVC) en México. En este trabajo se colectaron 35 muestras de heces de perros con cuadro clínico de gastroenteritis, a partir de las cuales se identificó el ADN de PVC por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). A las muestras se les realizó la prueba de hemoaglutinación – inhibición de la hemoaglutinación (HA-IHA) y resultaron 14 de ellas positivas. El aislamiento se realizó con células A 72, se logró el aislamiento en 4 de estas 14 muestras positivas por la técnica de HA-IHA. Al realizar la PCR con estos aislamientos, se logró la amplificación de una banda de 1446 pb, misma que al ser digerida con la enzima *EcoRV* mostró el patrón específico de PVC. Posteriormente se realizó la técnica de PCR con las 35 muestras de heces y se logró la amplificación en 7 de las muestras positivas por HA-IHA. Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede confirmar la existencia de PVC en México, incluso con los aislamientos se esta en posibilidades de identificar el tipo al que pertenece. De igual forma se demostró la utilidad de la prueba de HA-IHA como método de diagnóstico ya que en este trabajo se comparó la sensibilidad y especificidad de la PCR con la HA-IHA y aunque la especificidad fue mayor con en la técnica de PCR (100%) la sensibilidad (50%) estuvo por debajo de la prueba de HA-IHA.

INTRODUCCIÓN

Varias de las enteritis en caninos jóvenes pueden deberse a virus, como el coronavirus, rotavirus y parvovirus^{1,2,3}. También se han aislado virus, como astrovirus, herpesvirus, enterovirus y calicivirus, entre otros, pero su patogenicidad es aún incierta^{1,2}.

La enfermedad producida por el parvovirus canino (PVC) se caracteriza por una gastroenteritis aguda o miocarditis con una marcada leucopenia^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11} y se reportado en Australia, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Bélgica, Japón, España, Brasil e Italia^{5,6,8,12,13,14,15,16}.

Parvoviridae

1 Densovirinae

1.1 Brevidentovirus (5 especies)

1.2 Densovirus (8 especies)

1.3 Icterovirus (4 especies)

1.4 Densovirinae no clasificados (2 especies)

2 Parvovirinae

2.1 Adenoasociados

• Virus Adeno-asociado 1, 2, 2H, 3, 3B, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12

• Virus Adeno-asociado Aviar ATCC VR-R65

• Virus Adeno-asociado de primates no humanos

2.2 Erythrovirus

• Virus E19

• Parvovirus de la ardilla

• Erythrovirus A6

• Erythrovirus humano V9

2.3 Parvovirus

• Enfermedad del visón de las islas

• Adentivirus

• Parvovirus autónoma de la rata RV-Y

• Parvovirus del pato salvaje

• Parvovirus bovino

• Parvovirus bovino 2

• Parvovirus bovino 3

• Parvovirus canino 2a

• Parvovirus canino 2b

• Parvovirus canino 2c

• Parvovirus del pato

• Parvovirus felino

• Parvovirus del gusano

• 2.4 Parvovirinae no clasificados

• Virus aislado de mortalidad en un pez hembra

• Erythrovirus humano VX

• Parvovirus del macaco con trepas

• Parvovirus del macaco Rhemus

• Parvovirus del macaco Rhemus

• Virus Kilham de la rata

• Virus LuIII

• Virus diminuto del ratón

• Virus de la enteritis del visón

• Virus diminuto del perro

• Parvovirus del pato de Rusia

• Parvo-like virus

• Parvovirus H1

• Parvovirus H2

• Parvovirus H3

• Parvovirus H4

• Parvovirus porcino

• Parvovirus del maspache

• Parvovirus de los roedores

Cuadro I División de la familia Parvoviridae²¹

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El PVC pertenece a la familia *Parvovirinae*, la cual se divide en dos subfamilias: *Parvoviridae* (virus de los vertebrados) y *Densoviridae* (virus de los insectos)^{6,17,18}. La subfamilia *Parvovirinae* contiene tres géneros: el género *Erythrovirus* en el cual se encuentra el virus B19 que afecta al humano; el género *Parvovirus*, al que pertenece el PVC y en él se encuentran los virus que afectan a mamíferos como vacas, gatos, tigres, guepardos, tejones, ratas, ratones, cerdos, mapaches, lobos, coyotes, zorros y bisontes^{8,11,17,19,20,21}, también a aves como patos, gansos y pollos (estos dos géneros el *Erythrovirus* y *Parvovirus* presentan replicación autónoma, es decir, no requieren de la presencia de otro virus para causar enfermedad); el género *Dependovirus* requiere la presencia de un virus cooperador para poder replicarse, como el adenovirus^{8,17,21,22} (**Cuadro 1**).

Historia

En 1970 en los Estados Unidos de Norteamérica, se identificó un virus en heces de perros que fue llamado virus diminuto o parvovirus canino tipo 1 (PVC 1)^{6,10,22,23,24} este virus no estaba asociado a ninguna enfermedad^{6,10,22}. En el año de 1978 Eugster y Nairn^{24a} observaron un virus en heces asociado a brotes de enteritis grave, que causó mortalidad en perros y se identificó como parvovirus canino tipo 2 (PVC 2)^{6,8,10,13,22,24,25}, posteriormente este virus se aisló en Canadá, Sudáfrica y Reino Unido^{5,6,12,13}, para que así en un año la enfermedad se encontrara identificada en casi todo el mundo^{1,8,9,10}. Las investigaciones han mostrado que el PVC 1 y 2 son distintos, ya que no hay relación filogenética alguna^{8,10,22}. El PVC 2 está relacionado con el virus de la Panleucopenia felina, en características genéticas, antigénicas y presentación de la enfermedad^{5,6,8,10,26,27,28}, por esta razón, el PVC 2 ha sido considerado dentro del sub-grupo de los parvovirus felinos al igual que el virus de la panleucopenia viral felina (FPV), el virus de la enteritis del mink (MEV)^{6,9,26}, el parvovirus del mapache (RPV), el parvovirus del perro mapachero (RPDV) y el parvovirus del zorro azul (BFPV)²⁰.

El PVC 2 afectaba solamente a los miembros de la familia *Canidae* (perros, coyotes, lobos, perros mapacheros, zorros^{6,8,10,20}), pero no a los felinos²⁹. En 1980

se identificaron dos variantes antigénicas del PVC 2, las cuales recibieron el nombre de PVC 2a y 2b que remplazaron por completo al PVC 2^{6,8,10,21,30,31}, estas variantes adquirieron la capacidad de infectar tanto a caninos como a felinos y transmitir la infección entre ellos^{2,9,10,20,24,26,27}. Recientemente Pereira *et al.*²⁴, aislaron y caracterizaron una variante más de leopardos que se denominó PVC 2c³², la cual tiene la capacidad de infectar gatos e inducir la enfermedad³³.

La capacidad que adquirieron las variantes antigénicas 2a y 2b de replicarse en células de felinos y caninos *in vitro* e *in vivo*, se debe a la mutación de 4 aminoácidos en la superficie de la cápside viral, este cambio le confiere a estos virus un sitio de unión a las células de felinos. En general, los PVC 2 tienen en común la región correspondiente a los aminoácidos 93, 30 y 323 de la proteína VP 2, por los cuales el virus tiene la capacidad de infectar células caninas³⁴, en los PVC 2a y 2b existen diferencias en los aminoácidos correspondientes a los sitios 87, 300, 305, 564 y 568 de la cápside viral, con respecto al PVC 2, estos cambios estuvieron presentes en todos los PVC aislados en gatos, los cuales se explican más adelante^{6,9,26,27,32,32}, la tercer variante 2c también conserva estos cambios y sólo el aminoácido 300 es diferente al PVC 2 y a sus dos variantes³².

Diversos estudios han sido realizados para conocer el posible origen del PVC 2, de los cuales han surgido 3 hipótesis: la primera considera que se originó a partir de una mutación directa del FPV en la población de perros o gatos; la segunda sostiene que el PVC 2 surgió por una mutación en una cepa vacunal de FPV, después de haberse propagado en cultivo celular; y la tercera hipótesis considera que el antecesor del PVC 2 tenía un huésped diferente al perro o gato, posiblemente un carnívoro silvestre, en el cual se originó una variante que dio lugar al PVC 2^{10,26}. Esta última hipótesis es la mas aceptada pues en 1995 se aisló un parvovirus en zorros con características intermedias entre al FPV y el PVC 2 (Figura 1)^{10,26}.

El PVC en Latinoamérica (LA)

Países como Australia, Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Nueva Zelanda, Bélgica, Japón, España e Italia, fueron los primeros que identificaron al PVC 2

como agente causal de enteritis grave, poniendo la pauta para el desarrollo de otras investigaciones en diversos países. Por lo anterior en 1980 se realizaron los primeros trabajos en LA, en México y Brasil, en donde se describen casos de enteritis hemorrágica, a partir de los cuales, por sus signos clínicos, hallazgos a la

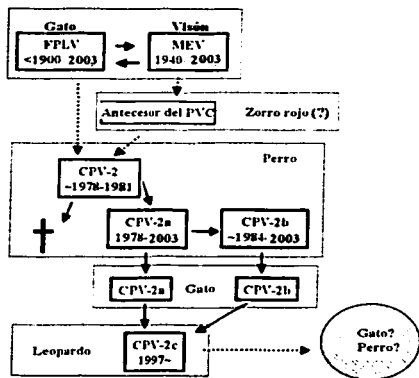


Figura 1. Posible evolución del PVC, donde se muestra su antecesor, que posiblemente se replicó en un carnívoro salvaje como el zorro y también se observan las tres variantes antigénicas que hasta hoy predominan en el ambiente^{40a}.

coll, entre otros⁴¹; b) observación del PVC 2 en cachorros⁴²; c) la identificación del PVC en cachorros con diarrea y sin diarrea⁴³; d) vacunación de lobos y el título que alcanzan con ella¹⁷; E) por último la aplicación de una prueba inmunoenzimática para el diagnóstico del Parvovirus⁴⁴.

En el año 2000 Pereira, en Brasil, publicó el primer trabajo de caracterización del PVC por su ADN en AL, en el cual, presenta la prevalencia del PVC desde 1980 hasta 1995 por medio de la PCR y la presencia del PVC 2a y

la necropsia, cambios histológicos y observación de partículas virales por microscopía electrónica (ME), se sugirió que se trataba del PVC 2^{16,36,37}. Posteriormente se describieron casos similares, en donde además se da a conocer que existen títulos altos de anticuerpos identificados por inhibición de la hemoaglutinación o inmunofluorescencia en contra del PVC 2^{38,39}. En Brasil en 1988 Angelo *et al.* aislaron cultivo celular por primera vez el PVC 2 en LA⁴⁰.

En la década de los noventa se presentaron trabajos sobre la infección del PVC 2 como: a) la asociación con otros microorganismos como *Salmonella spp.*, *C. jejuni* y *E.*

PVC 2b²⁴. El último trabajo realizado fue en el año 2001 en donde muestrearon zorros y con la técnica de inhibición de la hemoaglutinación se verificó la existencia de la enfermedad por el contacto de éstos con perros domésticos⁴⁵. A la fecha no hay reportes del aislamiento del Parvovirus canino en México.

Características del PVC

Los integrantes del género *Parvovirus* se caracterizan por medir de 18 a 26 nanómetros, son virus sin envoltura, de simetría icosaédrica y con un peso de aproximadamente 5.8×10^6 Da. Su genoma es de tipo ADN el cual consta de aproximadamente 5000 bases de una sola cadena lineal y con palíndromos terminales. Los miembros de esta familia son muy estables en condiciones normales del medio ambiente, además de que son resistentes a los solventes orgánicos comunes^{2,4,8, 17,19,22,46,47}. Tienen replicación intranuclear, utilizando la fase "S" de la célula, en la cual duplica su ADN, formando cuerpos de inclusión intranucleares. Esta característica está relacionada con su potencial patógeno y su tropismo por las células en mitosis^{2,7,8,17,19,22, 46,47, 48}.

El PVC mide 25 nm de diámetro, su ADN tiene 5323 bases, es termoestable ya que soportan 60 °C por 60 minutos, es resistente al éter, cloroformo y a un rango de pH de 3-9^{17,22,49}, es sensible al hipoclorito de sodio en exposición prolongada a una proporción de 1:30^{2,11}.

A nivel molecular el PVC consta de tres proteínas, de las cuales dos son estructurales y una no. Las dos proteínas estructurales, VP1 y VP2, las cuales, forman la cápside viral que recubre al ADN del virus, se encuentran entrelazadas formando 60 copias^{6,8,9,17,19,35, 49,50, 51,52}. La VP1 se encuentra en un 10% y la VP2 en 90% dentro de la cápside, con pesos de 84 y 65 kDa, respectivamente^{17,52}. Dentro de la secuencia de la VP1 se encuentra la secuencia de la VP2. La VP2 es la proteína que se encuentra en el exterior de la cápside viral, por lo tanto contiene los aminoácidos (aa) responsables de la unión del virus con las células, y es la que determina el tipo de hospedero. Los aa responsables de la especificidad de hospedero, corresponden a los sitios leucina 87, glicina 300, treonina 305, serina 564 y glicina 568 en el caso de células de gato^{6,9,26,35} y en el caso de células de

perro los sitios asparagina 93 y asparagina 323^{6,9,34,35,50,53}. Hay otros aa que determinan la dependencia de pH para la hemoaglutinación, por ejemplo la aglutinación glóbulos rojos de cerdo a un pH 7.4, es dependiente de los residuos asparagina 323 y 375^{6,30,34,50}. Se sabe que al cambiar el aa arginina 377, el virus pierde la capacidad de aglutinar (**Figura 2**)^{6,9,26}.

Antigénicamente, el virus tiene dos sitios, el A y el B, donde se encuentran los aa responsables de la neutralización del virus por anticuerpos; el sitio A, compuesto por los residuos de aa 426, 224, 222 y 93 y el sitio B, formado por los aa 297,300 y 302^{6,34,50,54} (**Figura 2**).

La proteína VP1 conforma la estructura icosaédrica de la cápside y le da soporte^{49,50,51,52}. En trabajos recientes se le ha relacionado con el transporte nuclear de las cápsides; además, es útil para una eficiente infección de la célula puesto que la región terminal denominada "N" juega un papel muy importante en el ensamblaje, pero no es indispensable⁵⁵. Se puede encontrar en la parte interna de las cápsides, en aproximadamente 10 copias de ésta por virion³⁵. En el parvovirus B19 se ha descrito un sitio de neutralización del virus, pero no ha sido demostrado en el parvovirus canino⁵⁶.

Dentro del genoma del PVC está codificada la otra proteína que no es estructural, llamada NS1^{6,8,17,19,28,49,51}, la cual es muy importante para la replicación viral^{8,17,28}, y sirve como una helicasa y endonucleasa para cortar el ADN celular e impedir su replicación⁸.

Existe una cuarta proteína, la cual es el producto de la infección del PVC a las células, ésta es de tipo estructural y es llamada VP3, por lo que no está codificada propiamente en el ADN del PVC, sino que se forma al momento de que la cápside va a encapsular al ADN viral, por unión a la proteína VP2 de aproximadamente 15-20 aa. La función de esta proteína sólo se ha relacionado con estructura de la cápside y no se han encontrado vinculos con otros procesos; sólo en cápsides con ADN se encuentran a las proteínas estructurales, VP1, VP2 y VP3^{6,9,19,50,51,52}.

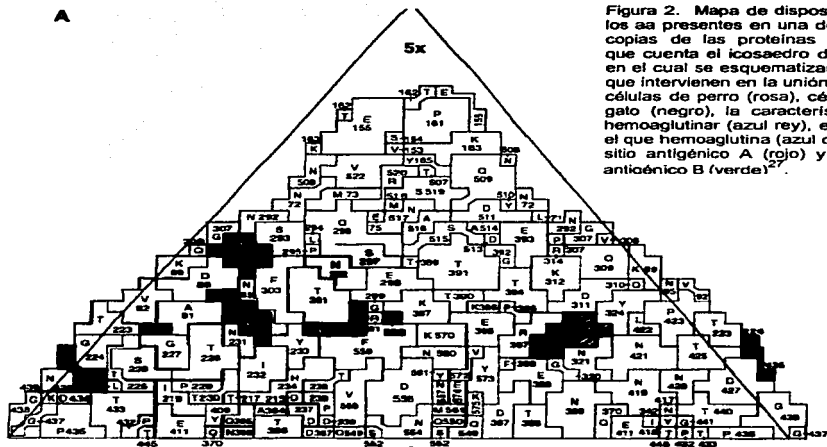
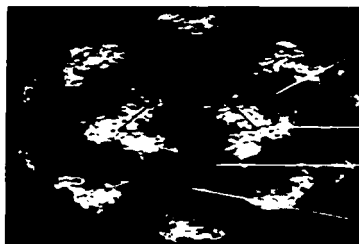


Figura 2. Mapa de disposición de los aa presentes en una de las 60 copias de las proteínas con las que cuenta el icosaedro del PVC, en el cual se esquematizan los aa que intervienen en la unión con las células de perro (rosa), células de gato (negro), la característica de hemoaglutinar (azul rey), el pH en el que hemoaglutina (azul claro), el sitio antigénico A (rojo) y el sitio antígeno B (verde)²².



Hendidura

Hombro

Cañón

Figura 3. Fotografía del parvovirus tomada con la técnica cristalografía de rayos "X", donde se delimita en un triángulo una de las 60 unidades formada por las proteínas VP1 y VP2, apreciándose las cuatro estructuras superficiales del mismo²³.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El parvovirus visto en un esquema en tercera dimensión muestra 4 zonas o estructuras bien delimitadas, la primera es la central con forma de cilindro, rodeada por la zona del cañón, que a su vez está en contacto con la tercer y cuarta zona que corresponden a una protuberancia denominada región del hombro seguida por la hendidura (**Figura 3**).

En la región del hombro se localizan los aminoácidos responsables tanto de la unión con las células del huésped, como con los anticuerpos neutralizantes, así como los que determinan las características de hemoaglutinación (**Figura 3**)
6,9,28,34,35,,50,51,52,53

Replicación del PVC

El primer paso en la infección viral, es la entrada del virus a las células, para ser transportado a través del citoplasma al núcleo, en donde se lleva a cabo la replicación del ADN, así como la síntesis de ARN mensajero para la producción de proteínas virales^{6,17}.

El virus al estar en contacto con la membrana celular, se asocia con sus receptores, los cuales se ha demostrado para el caso de PVC, son proteínas con residuos de ácido siálico^{9,35,57,58,59}. Basak *et al.* han descrito una glicoproteína de 40 a 42 kDa como receptor para este virus, en ausencia de esta, el grado de infección viral decrece un 60%⁵⁹. Para penetrar al interior de la célula, el virus utiliza la vía endocítica, donde se forman vesículas revestidas o endosomas, las cuales requieren de proteínas especiales llamadas clatrin. Estas proteínas crean una red por debajo de la membrana donde se originará el nuevo endosoma y ayudan a formarlo y desprenderlo^{19,58,59,60}. Después estas clatrin se disocian del endosoma y regresan a la membrana para formar un nuevo endosoma⁶². Estudios *in vitro* han revelado que el virus tarda aproximadamente de una a cuatro horas en penetrar al citoplasma⁶¹ y que necesita estar dentro del endosoma en su trayecto, ya que la acidificación que ahí se presentan modifica la cápside viral permitiendo al virus replicarse eficazmente^{58,59}. Dentro de la célula este endosoma es transportado al núcleo a través de la red de microtúbulos celulares, observando

las partículas virales en el interior del núcleo aproximadamente en 6 horas postinoculación^{58,62}. La entrada al núcleo se da a través de los poros nucleares, puesto que su diámetro es de 27 nm, justo el necesario para que la partícula viral de 25 nm pueda penetrar⁶². Estudios posteriores han revelado que el PVC después de entrar por los endosomas pasa por un segundo compartimiento el cual es formado por vesículas recicladas y en ellas es transportado hacia el núcleo⁶⁰.

Una vez dentro del núcleo, el virus libera el ADN y comienza su replicación, la cual necesita forzosamente que la célula esté en la fase "S" de su división, para poder utilizar la maquinaria celular. Específicamente utiliza la ADN polimerasa para este fin, comienza por transformar el ADN viral sencillo a tipo de doble. Al estar en este estado ocurren dos procesos: la síntesis de los ARN mensajeros catalizados por enzimas celulares, los cuales llevan la información genética para la formación de las tres proteínas víricas; en segundo, la formación de copias de ADN de cadena sencilla para después ser encapsulado por las cápsides que ya se formaron^{6,17}.

La replicación viral y la síntesis de proteínas inicia con transformar el ADN de cadena sencilla a cadena doble, para lo cual interviene una estructura en forma de gancho formada por el ADN en la porción 3' que es el resultado del palíndromo terminal, éste es un iniciador de síntesis (i), que propicia el inicio de la formación del ADN de doble cadena (ii). Al llegar al final de esa extensión, se forma nuevamente la disposición de gancho por los palíndromos en las dos cadenas sencillas (iii), pero la que se acaba de formar comienza a abrirse para seguir con una segunda extensión que toma como molde a la primera (iv), por lo que al final de esta segunda extensión ya se tiene un ADN de doble cadena cuya longitud es dos veces mayor que el fragmento sencillo original (v). Este ADN de doble cadena tiene un extremo cerrado y otro separado, formando nuevamente la disposición de gancho, listo para seguir replicándose en una forma exponencial (vi)(Figura 4)⁶³. Estos patrones de pegamiento con los que cuenta el virus permiten la formación de un gran número de copias de ADN y por consiguiente de ARN mensajero que son traducidos a un sin número de proteínas, con lo que le da al PVC 2 un gran potencial genético de replicación⁶.

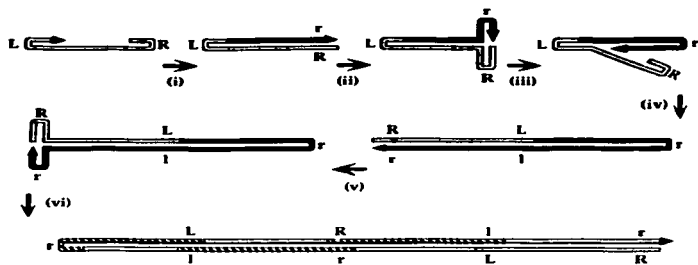


Figura 4. Se muestra la estrategia de replicación del ADN viral, donde la región de color gris es la porción que ocupa el ADN original del virus y la que está en color negro muestra el ADN de nueva formación, las letras indican la dirección que tiene el ADN, izquierda (L, l) y derecha (R, r)⁶³.

Dentro del genoma del PVC existen dos promotores, encargados de propiciar la formación de ARNm, el primero es llamado P4, con el cual se da la transcripción del RNAm para formar la proteína NS1, que por lo tanto es la primera en sintetizarse. El segundo promotor es el P38 que indica el inicio de la transcripción de las otras dos proteínas (VP1 y VP2), encontrados en los sitios correspondientes a las bases 188 y 1990 de la secuencia de ADN respectivamente. Una vez que ya se tradujo la primera proteína (NS1), ésta se encarga de modular la producción de ella misma y de las otras dos proteínas, así como del corte en el ADN de nueva formación para comenzar el empaquetamiento del mismo⁴⁹, la figura 5 muestra la disposición del ADN del PVC, así como la localización de las secuencias de cada proteína y promotor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

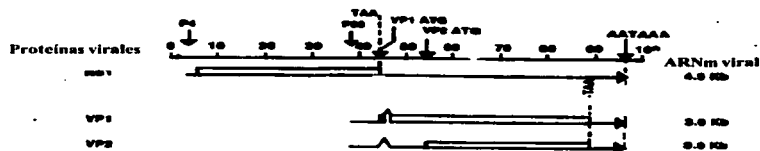


Figura 5. Esquema donde se muestran las regiones del ADN donde se codifican las 3 proteínas del PVC indicando los 2 promotores, las secuencias de inicio y de término. La proteína NS1 se codifica del sitio 276 al 2276, la VP1 del 2282 al 4587 y la VP2 del 2783 al 4587⁴⁹.

Enfermedad clínica (parvovirus del perro)

Patogenia

El PVC afecta a perros de todas las edades, principalmente desde el nacimiento hasta los 12 meses de edad, pero también puede infectar vía uterina ocho días antes del nacimiento. En casi todos los casos, la infección por PVC es a través de una exposición oronasal con heces contaminadas^{1,2,3,8}, pero también puede ser por fomites o alimento contaminado⁶⁴. En experimentos con perros libres de patógenos específicos inoculados por vía intravenosa, se produjo la enfermedad con $10^{5.5}$ partículas virales¹³.

Primero el virus se replica en el tejido linfoide de la orofaringe, posteriormente, por vía linfática, llega a ganglios linfáticos mesentéricos, timo y una vez en estado de viremia a criptas intestinales, teniendo un periodo de incubación de 3 a 5 días^{1,2}.

Después de uno a cinco días de la entrada del virus ocurre la viremia, al haber diseminación del virus a todos los epitelios como el oral, esofágico, intestinal y tejidos como del miocardio y medula ósea, donde los últimos tres son los más afectados^{2,3,8,64}. Existen trabajos en donde se ha aislado a partir de pulmones, bazo, hígado y riñones².

En condiciones normales, las células del epitelio germinal de las criptas intestinales se multiplican y van madurando para pasar a formar las puntas de las vellosidades intestinales. Al llegar a estas últimas, adquieren la capacidad de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

absorción y asimilación de nutrimentos. El PVC se replica en el epitelio germinal de las criptas intestinales que están en constante división celular, lo que provoca la destrucción de éste con el colapso subsiguiente de esa zona, además un fallo en el recambio normal de células por lo que las vellosidades se atrofian y acortan, con la consecuente manifestación de los signos clínicos de enteritis^{2,8}. El grado de lesión en el intestino determina la gravedad de los signos clínicos y la recuperación del animal⁶⁵. Dado que el virus se replica en el aparato digestivo es eliminado en las heces de los perros infectados y ésta se inicia entre el tercer y cuarto día después de la infección, antes de que se presenten los signos clínicos, manteniéndose constante en un lapso de 7 a 14 días^{2,3,22,48}, en aproximadamente 1×10^{12} partículas virales por gramo de heces¹.

En la médula ósea provoca una marcada leucopenia, acentuada aun más porque el virus ataca a leucocitos circundantes en mitosis^{2,13}. El miocardio es un tejido el cual tiene un aumento en su desarrollo en los últimos días de la gestación y las primeras semanas de edad, por lo que es en esta etapa en donde se afecta por la replicación viral dando como resultado una miocarditis^{2,8,66}.

Histología de los Datos Clínicos

Los animales infectados por vía uterina, desarrollan el cuadro clínico de miocarditis, caracterizado por una muerte súbita precedida por una disnea, insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardíaca congestiva y muerte^{1,2}. Los signos clínicos de distensión cardíaca pueden ocurrir de manera repentina sin una infección aparente o acompañado de un cuadro entérico. Las lesiones encontradas en el miocardio son estrias pálidas a consecuencia de una fibrosis provocada por la necrosis celular^{2,3,64}. Esta lesión corresponde a una miocarditis intersticial no supurativa, con edema, al microscopio se observa infiltración multifocal de linfocitos y células plasmáticas, además de cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos en las fibras del músculo cardíaco^{2,7}. La mortalidad puede llegar hasta el 70 %, sin embargo los cachorros que sobreviven quedan con afecciones cardíacas⁶⁴, pero en animales infectados de dos a doce días de edad la mortalidad es del 100%, dándose esta después de la viremia⁸.

En animales mayores a 12 días de edad meses de edad la infección se manifiesta de manera entérica, presentándose con mayor gravedad hasta los 5 meses. La enfermedad progresa con rapidez y tiene una morbilidad hasta del 100% de la camada, con una mortalidad que alcanza el 50%, dependiendo del estado fisiológico del animal⁴. Los signos característicos son vómito, diarrea profusa (que en la mayoría de los casos es sanguinolenta y da como consecuencia una deshidratación), anorexia, fiebre recurrente de hasta 41°C. En ocasiones puede haber ictericia, hipotermia y muerte^{1,2,3,4,8,22,48,64,67}. En la mayoría de los casos en donde se da la muerte, la infección es acompañada de condiciones de estrés, hacinamiento, deficiente higiene o parasitosis. El PVC al provocar una leucopenia grave, permite la entrada de otros patógenos oportunistas tal como microbiota normal Gram negativa y anaerobia provocando la complicación de la enfermedad con daño intestinal severo, bacteremia, endotoxemia y coagulación intravascular diseminada^{1,2}. Esta leucopenia se da por una linfopenia y granulocitopenia, además de una depleción de neutrófilos maduros circundantes llegando a ser de 500 a 2000 leucocitos por microlitro de sangre. Estos conteos están dados por la pérdida de ellos por la mucosa intestinal y por la replicación viral en la médula ósea^{1,4,67}.

A la necropsia podemos observar lesiones en el duodeno distal y yeyuno, en donde la pared intestinal se puede ver engrosada y segmentos con cambio de color, denudación de la mucosa, congestión y presencia de material acuoso oscuro que en la mayoría de los casos es sanguinolento, además se encuentran los linfonodos torácicos, abdominales o ambos aumentados de tamaño. Al microscopio se pueden observar cuerpos de inclusión intranucleares en las células epiteliales y en la totalidad de los epitelios escamosos del tubo gastrointestinal, las vellosidades se ven acortadas o destruidas. En placas de Peyer, linfonodos mesentéricos, timo y bazo se observa necrosis de las células linfoides y disminución en su número **(Figura 6)**^{2,3,4,8,67}.

En los perros mayores de cinco meses de edad, el daño a los epitelios por la infección es menor, puesto que el recambio del epitelio germinal disminuye, lo

que se traduce en una enteritis leve y en ocasiones sin ningún signo de enfermedad aparente, por lo que el animal se recupera por completo².

En perros mayores de cinco meses, los anticuerpos neutralizantes se producen a partir de los tres días post-infección, lo que provoca que alcancen a

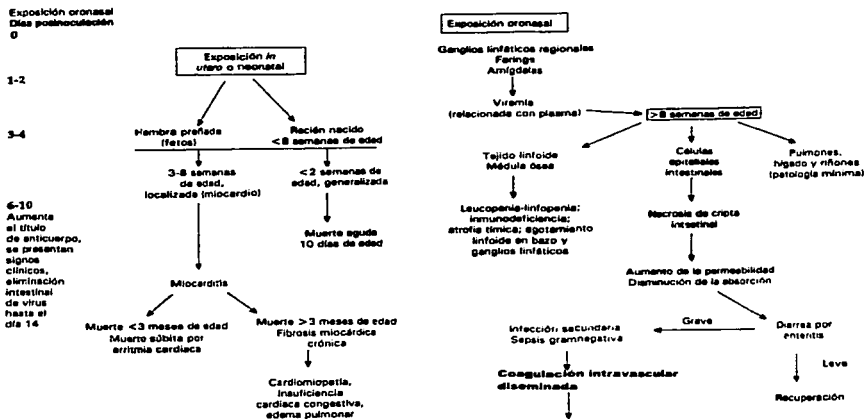


Figura 6. Curso de la parvovirus según la edad del animal².

resolver el problema, permaneciendo en concentración constante cerca de un año^{2,3,22,48}.

En todos los casos, la mortalidad depende de varios factores tales como la tasa de anticuerpos, estado físico y nutricional, así como las condiciones de higiene.

El PVC afecta a la mayoría de los integrantes de la familia *Canidae*, aislado por primera vez en fauna silvestre en América, en el Parque Zoológico Nacional de *Front Royal* en Estados Unidos de Norteamérica, en dos zorros vinagre (*Speothos venaticus*), dos lobos de crin (*Chrysocyon brachyurus*) y un zorro gris (*Cerdocyon thous*). Tres de ellos se recuperaron después de un tratamiento

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

sintomático, pero dos murieron. A la necropsia se observó una extensa zona de necrosis intestinal. Los cinco casos fueron confirmados por microscopía electrónica, se observaron partículas virales idénticas a las encontradas en los brotes de perros¹¹.

Diagnóstico del PVC

En la mayoría de los casos el diagnóstico presuntivo se realiza por la observación de los signos clínicos, relacionados con la edad del animal y las condiciones en las que éste se encuentra. Sin embargo, se deben considerar otras enfermedades que causan signos similares², como lo es campylobacteriosis, leptospirosis, infestaciones masivas de parásitos, coronavirus y rotavirus^{1,2,3,17}. Por tal motivo se recomienda hacer el diagnóstico definitivo y diferencial para el parvovirus.

Al emerger la enfermedad en 1978, el diagnóstico se realizaba con la identificación del PVC como causante de enfermedad por aislamiento viral y la correlación de los signos clínicos, lesiones a la necropsia, la microscopía electrónica e inmunofluorescencia, posteriormente se aprovechó la característica del PVC de aglutinar glóbulos rojos de cerdo para aplicar la prueba de hemoaglutinación viral y su confirmación con la inhibición de la hemoaglutinación^{3,11,22,64,67,68,69,70}. Después surgieron técnicas más específicas que la hemoaglutinación y menos costosas que la microscopía electrónica como lo son las técnicas inmunoenzimáticas (inmunoensayo ligado a enzimas o ELISA)^{22,71,72,73,74} y finalmente las técnicas moleculares basadas en la detección de fragmentos de ADN como es la hibridación^{75,76} y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)^{61,77,78,79,80,81,82,83}, que actualmente son las que ofrecen mayores ventajas.

Debido a que la mayoría de los perros están vacunados o tienen anticuerpos adquiridos vía materna, se recomienda hacer el diagnóstico a partir de heces o de tejidos para una identificación del virus^{1,2,8}.

Otras técnicas que permiten identificar el virus, pero sólo se han utilizado en investigación, son: Dot-blot, Virus Neutralización, Radio inmunoensayo, entre otras.

Debido a que la mayoría de los perros están vacunados o tienen anticuerpos adquiridos vía materna, se recomienda hacer el diagnóstico a partir de heces o de tejidos para una identificación del virus^{1,2,8}.

Otras técnicas que permiten identificar el virus, pero sólo se han utilizado en investigación, son: Dot-blot, Virus Neutralización, Radio inmunoensayo, entre otras.

Descripción de Técnicas de Diagnóstico para la Parvovirus

HEMOAGLUTINACIÓN (HA) – INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IHA) MÉTODO

Este método de diagnóstico combina la HA y la IHA. La HA tiene una especificidad del 63-89 % y una sensibilidad del 87 %⁷³. Las ventajas de esta prueba para los laboratorios de diagnóstico son: económica, fácil aplicación, resultados en no más de 24 horas^{38,73}. Los inconvenientes con los que cuenta son: contar con un aporte continuo de glóbulos rojos para realizar las 2 pruebas, tener una producción o adquisición de anticuerpos específicos en contra del PVC⁸⁴.

INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Es una técnica que tiene una alta sensibilidad ya que determina nitrógeno proteico de anticuerpos o antígeno hasta 300 ng/ml. Con la utilización de anticuerpos monoclonales para determinar virus en heces se ha mostrado que algunas muestras positivas pueden dar como negativas debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes en el intestino. Al aplicarse para determinar anticuerpos, habrá que considerar el esquema de vacunación a la que fue sometido el animal^{44,73}.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Es el método aplicado y considerado como de elección, usado cuando se requiere la confirmación de la presencia del virus^{17,31}. En este caso, el diagnóstico es directo, ya que es evidente la partícula viral, a diferencia de los otros métodos donde el diagnóstico es indirecto. El gran inconveniente que presenta es que se

y de infraestructura adecuada, aunado a esto, se requiere por lo menos 72 horas para dar resultados⁸⁴.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

En esta técnica, una ADN polimerasa termoestable amplifica una secuencia específica de ADN. Inicia con la aplicación de calor al ADN a analizar con lo cual se separa la doble cadena en dos cadenas sencillas, para que en un segundo paso la temperatura baje y permita el alineamiento de los oligonucleótidos iniciadores, previamente seleccionados y sintetizados, los cuales reconocen una secuencia determinada de esa cadena y sirven para iniciar la síntesis de las nuevas cadenas de ADN (**Figura7**), con la adición de la enzima, Taq-Polimerasa inicia la síntesis de las nuevas cadenas, de tal modo que en un primer ciclo de una cadena de ADN se forman dos secuencias, las de interés, en el segundo ciclo se forman cuatro, en el tercero ocho, en el cuarto 16 y así sucesivamente como se muestra en la figura 8^{85,86}.

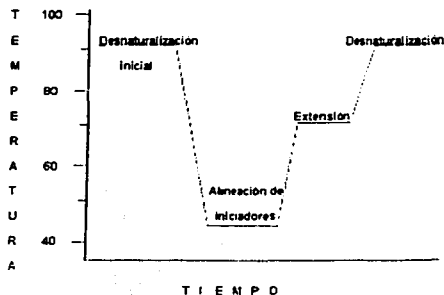


Figura 7. Representación de un ciclo de PCR

Con este método se puede identificar desde 100 ng del ADN que se va a analizar⁸⁷. Se ha reportado su aplicación al diagnóstico del PVC. Kazuhiro concluyó que mediante la PCR se identifica una concentración de 10^3 unidades formadoras de placas en un gramo de heces frescas⁸².

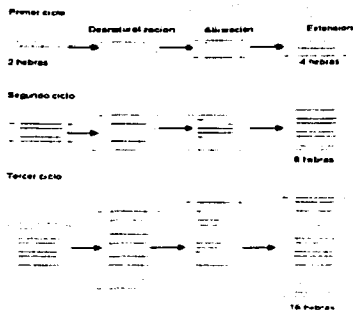


Figura 8. Duplicación exponencial del PCR

JUSTIFICACIÓN

El parvovirus canino tipo 2 emergió en 1978 y partir de esta fecha, se han realizado diversas investigaciones para establecer la presencia del virus en diferentes países^{24a}. En México se ha evidenciado el virus, ya que en trabajos anteriores a éste, han identificado partículas virales, lesiones histológicas sugestivas así como anticuerpos específicos en contra del virus, aunque nunca se ha logrado el aislamiento^{36, 37,38,39}. Este trabajo tiene como fin el aislamiento de parvovirus canino a partir de muestras clínicas de animales con cuadro clínico entérico y su identificación por medio de la técnica de PCR.

Por otra parte, el diagnóstico de PVC se realiza actualmente con la prueba HA-IHA. Este trabajo pretende también asentar las bases para la aplicación del diagnóstico molecular basado en la técnica de PCR.

HIPÓTESIS

Se identificará ADN de parvovirus a partir de heces de animales con cuadro clínico entérico por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa para demostrar la presencia del virus.

OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar parvovirus canino a partir de heces por medio de las técnicas aislamiento en cultivo celular y PCR, con el fin de demostrar la presencia de este virus en nuestro país y establecer las bases para el diagnóstico molecular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aplicar la técnica de HA-IHA con las heces colectadas para este estudio.
2. Ajustar la técnica de infección en cultivo celular, con la cepa de referencia ATCC donada por Holland de México S.A. de C.V y aplicarla a todas las muestras de este estudio.
3. Ajustar una técnica para la extracción de ADN a partir de heces y sobrenadantes de infecciones en cultivo celular.
4. Aplicar la técnica de PCR para amplificar un segmento de 1.4 kilo bases del genoma de parvovirus, con el ADN extraído.
5. Clonar en un vector comercial los productos amplificados, como método de conservación para estudios posteriores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Células y virus

Se utilizaron células A 72 (fibroma de perro), las cuales fueron reproducidas en botellas¹ de 25 cm² con *Minimum Essential Medium* (MEM²) adicionado con 10 % de suero fetal bovino³. Las cepas de virus utilizadas fueron: virus de campo (obtenido a partir de heces remitidas para el diagnóstico de Parvovirus Canino (PVC) al Laboratorio de Serología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM) y la cepa de referencia ATCC de PVC 2 perteneciente la cepario del mismo laboratorio.

Replicación y recuperación de virus a partir de cultivo celular

Cultivos de células A72 con una confluencia del 80% fueron infectados con la cepa de virus de referencia, para lo cual primero se retiró el medio de los cultivos y después se infectaron con 2 ml del inóculo de virus que consto de 0.1 ml de una suspensión de virus con 64 unidades hemoaglutinantes (UHA), mezclados con 1.9 ml de medio. Las botellas con el inóculo viral fueron incubadas por dos horas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo los 2 ml fueron removidos y se adicionaron 10 ml de medio de cultivo. La cosecha del virus se realizó a los 5 días post-infección, cuando el desprendimiento de las células era aproximadamente mayor al 80%. Todo el medio y las células desprendidas en las botellas fueron recuperados y congelados a -70° C en un ultracongelador³.

Recuperación de virus a partir de heces

Las heces fueron diluidas 1:10 con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 6.8 y centrifugadas a 1800 g durante 30 min a 0°C. El sobrenadante fue recuperando y fraccionado en tubos de 1.5 ml. Los sobrenadantes fueron conservados a -20°C hasta su utilización. Con estos sobrenadantes se realizaron las pruebas.

¹ NALGE NUNC[®]

² GIBCO BRL[®]

³ HARRIS[®]

Infección de cultivos celulares con la cepa de campo

Los sobrenadantes obtenidos a partir de las muestras de heces, fueron filtrados con membranas de 0.2 micras^{xv} y recuperados en tubos estériles a los que se les adicionó 1µg de Penicilina, 1µg de Estreptomicina y 2µg de Neomicina. Los sobrenadantes con antibióticos fueron incubados a 37°C por 2 h, transcurrido este tiempo las muestras se conservaron a -70° C, hasta su uso. La infección se realizó a células A72 en placas de 24 pozos con una confluencia aproximada del 80%. El inóculo se preparó mezclando 100µl de la cepa de campo con 800µl de medio de cultivo. Cada muestra fue inoculada en dos pozos, el testigo negativo sólo llevó medio de cultivo sin virus. La incubación y recuperación de virus se realizaron de la misma forma que con la cepa de referencia.

Hemoaglutinación

Esta técnica se realizó conforme al protocolo descrito por Carmichael en 1980⁶⁸, con algunas modificaciones. Para realizar esta prueba se utilizaron glóbulos rojos de cerdo provenientes del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la FMVZ, UNAM, los cuales fueron recuperados de muestras de sangre con el anticoagulante Alsever⁴ en proporción 1:1. Todos los ensayos se realizaron con un PBS pH 6.8 .

Para la realización de la técnica se utilizó una suspensión de glóbulos rojos de cerdo al 0.75% previamente lavados con PBS.

La técnica de hemoaglutinación (HA) se realizó en una microplaca de 96 pozos donde se colocaron diluciones dobles seriadas de las muestras (volumen inicial de 100 µl), hasta obtener una dilución 1:5120 con el virus de campo y 1:1024 con el virus de referencia, utilizando como diluyente PBS con 0.1 % de albúmina sérica bovina⁵. A estas soluciones se les agregaron 50µl de la suspensión de glóbulos rojos al 0.75%, y se incubaron a temperatura ambiente, realizándose lecturas cada 15 min, hasta que el testigo de glóbulos rojos, el cual

⁴ Se elabora en el laboratorio de serología, FMVZ, UNAM.

⁵ SIGMA 90

contenía 50 μ l de PBS y 50 μ l de la suspensión de glóbulos rojos, mostrara una sedimentación evidente.

Inhibición de la hemoaglutinación

Todas las muestras con resultados positivos por HA se sometieron a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IHA). En esta prueba se realizaron diluciones dobles seriadas del suero testigo desde 1:2 hasta alcanzar una dilución 1:2048 en 25 μ l de PBS con 0.1 % de albúmina sérica bovina. Para la elaboración del suero testigo se utilizó un suero proveniente de un perro positivo a HA-IHA, el cual fue diluido 1:2 con PBS al 2.5% de caolín^x, e incubado a 56° C a baño María por 30 min. Concluida esta incubación, el suero se dejó enfriar y después se le agregaron 100 μ l de glóbulos rojos lavados. Esta mezcla fue homogeneizada y nuevamente se incubó a 37° C por 1 h. Finalmente, se centrifugó a 1800 g por 5 min, y el sobrenadante fue congelado hasta su uso. A las soluciones diluidas se les adicionaron 25 μ l del virus de campo previamente titulado a 4 u 8 UHA, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15 min, y después se agregaron 50 μ l de una suspensión de glóbulos rojos al 0.75 %. La lectura se realizó cada 15 min, hasta que fueron evidentes los tres testigos de la prueba los cuales fueron: glóbulos rojos, igual que en HA, suero, el cual contenía 25 μ l de PBS con 25 μ l de suero y 50 μ l de glóbulos rojos y virus con 25 μ l de PBS con 25 μ l de virus y 50 μ l de glóbulos rojos.

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, tanto de los sobrenadantes de los cultivos, como los de las muestras de heces, se utilizó el protocolo descrito por Clewley⁸⁸, el cual se describe a continuación. Primero se elaboraron los diferentes reactivos utilizados en esta técnica:

- Solución de Lisis Total (SLT). A 120 g de tiocianato de guanidina⁶ se le agregaron 100 ml de una solución 0.1 M de Tris-HCL^{II} pH 6.4, 22

⁶ SIGMA 88

ml de una solución 0.2 M de EDTA^{II} pH 8 y 2.6g de Triton X100⁷. Esta solución se mezcló con agitación magnética y se guardó en frascos ámbar hasta su utilización.

- Solución de Lisis Simple (SLS). A 100 ml de una solución 0.1 M de Tris-HCL^{II} pH 6.4 se le agregaron 120 g de tiocianato de guanidina^{XVII}, el cual se disolvió con agitación magnética y se guardó en oscuridad, hasta su uso.
- Silica. A 6 g de dióxido de silicón^{XVII} se agregaron 50 ml de agua destilada, se mezclaron en un tubo cónico y se dejaron reposar por 24 horas. Después se retiró 43 ml del sobrenadante y resuspendieron nuevamente en 50 ml de agua destilada, reposando por 5 horas. Transcurrido este tiempo fueron removidos 44 ml del sobrenadante y a lo que quedó se le agregaron 60 μ l de ácido clorhídrico^{IX}, haciendo alícuotas, las cuales fueron esterilizadas y guardadas en oscuridad hasta su uso.
- TE. Esta solución se preparó a partir de soluciones más concentradas para tener una solución final de 10 mM de Tris-HCL pH 8.0 y 1mM de EDTA pH 8.0.

El método de extracción consistió en:

1. Colocar en un tubo de 1.5 ml 100 μ l de la muestra problema (sobrenadantes de cultivo celular o de heces diluidas), adicionándole 90 μ l de SLT y 40 μ l de silica, homogenizado con vórtex⁸ por 5 segundos y dejando reposar a temperatura ambiente por 5 minutos
2. Nuevamente se homogenizó con vórtex por 5 segundos y centrifugado en una microcentrífuga⁹ a 13000 g por 15 segundos.
3. Se retiró el sobrenadante y se adicionó 1 ml de SLS, se homogenizó 15 segundos con vórtex y centrifugó a 13000 g por 15 segundos.
4. Se repitió el paso número 3.

⁷ USB \oplus

⁸ LAB-LINE INSYTRUMENTS \oplus

⁹ IEC \oplus

5. Se repitió el paso número 3 pero con etanol¹⁰ al 70 % en lugar de la SLS.
6. Se repitió el paso número 5.
7. Se repitió el paso número 3 pero con acetona^{xxi} en lugar de SLS.
8. El sedimento se colocó en un equipo de secado la vacío¹¹ por 10 minutos.
9. Adicionándole 50µl de TE, agitado con vórtex 5 segundos y colocó en baño maría¹² a 56° C por 10 minutos.
10. Homogenizar con vórtex por 5 segundos y centrifugar a 13000 g por 2 minutos.
11. Se recuperaron 40-45µl del sobrenadante y se transfirieron a otro tubo limpio.
12. Este sobrenadante fue el que se utilizó en la PCR

Reacción en cadena de la Polimerasa

Esta técnica fue utilizada para amplificar un segmento del genoma de PVC a partir de muestras de heces y sobrenadantes de infecciones en cultivo celular con las diferentes cepas de virus empleadas en este trabajo. Los iniciadores utilizados fueron diseñados, a partir de la secuencia del gene de la proteína VP2 del PVC tipo 2, 2a y 2b, y amplifican una secuencia conservada en los 3 tipos²⁴ de un tamaño de 1446 pb. Estos iniciadores están localizados en las posiciones 3022 y 4467 (**Figura 9**) y su secuencia es la siguiente:

PVCMAN 1: 5'GAA GAG TGG TTG TAA ATA AT 3'.

PVCMAN2: 5'CAT AGT TAA ATT GGT TAT CTA 3'.

¹⁰ MERCK ®

¹¹ SAVANT ®

¹² PRECISION SCIENTIFIC ®


```

gagagtggttgtaataataggata259aaactgcagttaccggaaacatggctttgagatattc303
atgcacaaattgtaaccctttggtcattggtgatgc259aaatgcttggggagtttggttaacccaggaa
gatggcaactaattgttaatactatgagtgagttgcatttagttgattgaaacagaaattttaattgtt
gttttaaaagactgtttcagaaatgctactacgccaccnaactaaagttataataatgatttaactgcat
cattgattgctcattagatgtaataactatctatgctttactccagcagctatgagctcgtgacatcgagca
ttgggtttttatccatggaaaccaccataccaaactccatggagatattattttccaatggatagtagaac
attaatcccatctcatactcggaaactagtggtccacccaacaaatataaccalgggtacagatccag
atgatgttcaattttatactattgaaantctgtgcccagtcacttactaagaaagggtgattgattgca
tacaggaaacattttttttttgattgtaaacctatgtagactaaacacatactggccaacacagtaggca
ttgggtttaccaccatttctaaattcttggctcaaccctcagaggagctactctttgggtatagagga
gltcaacaagataaaagacgtgggtgtaactcaattgggaaatacaaacctatattactgaaagctac
tattatgagaccagctgaggtgtttagtgccaccatattattcttttgaggcgtctacacaagggcc
atttaaaacacctattgtagcaggagcggggggggagcgcaaacatgaaaaacaggcagcag
atgggtatccaaagatattggtgtagacaacatgtgcaaaaaactaccacaacaggcagaa
caccctgagagattacatatactagcacaatcagatacaggaaagataccagaggagattggatt
caaaatattaactttaaccttctgtaacc1276atgataatgattgctaccacagatccaattggggg
taaaacaggaaattaactatactaatatttaatactttatggctcttaactgcaaaataatgtagca
ccagtttacc303aaattggtcaaatgtggataaaagaaattgtgactgactttaaaccaggactcattg
aaatgcaaccattttgtgcaaaataattgctcctgtgcaattattgttaaaggttgcgctaatttaaca
aatgaaatgatcctgtagcactcgtctaataatgtaagaattgtaacttactcagatttttggggaaa
ggtaaatgattttaaagctaaactaaagag1623ctctcatacttggaaatccaatccaacaatgagta
ttaatgtgataacc303aaatttaactgt

```

Figura 9. Se muestra la secuencia amplificada con los iniciadores descritos en este trabajo. Se toma como la base número 1 a la base con la cual inicia la codificación de la proteína VP2, mostrando con rojo las bases que han cambiado según el tipo antigénico. Estos cambios son de "a" a "t" en el sitio 259, de "c" a "g" en el 889, de "g" a "t" en el 913 y de "a" a "g" en el 1023 para el PVC 2a-2b-2c; de "t" a "c" en el sitio 303 y 537 para el 2c; de "c" a "g" en 2a-2b o "a" en 2c en el sitio 899 o 2a-2c y 2b en el sitio 1276 respectivamente; y por último de "a" a "c" en el 2a, en el sitio 1623.

Previo a su síntesis, los iniciadores fueron analizados en el *Genebank*⁸⁹ para corroborar posibles homologías con otras secuencias ya descritas. En el cuadro siguiente se presentan las condiciones de ciclo utilizadas en la PCR.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Ciclo	temperatura y tiempo	Núm. ciclos
Desnaturalización inicial	94° C / 45 seg.	1
Desnaturalización	94° C / 1 min.	30
Alineamiento	44° C / 1min.	
Elongación	72° C / 2 min.	
Extensión final	72° C / 7 min.	1

Los productos obtenidos en la reacción de PCR fueron visualizados por electroforesis, en geles de agarosa^{XVI} al 1 % en una solución TAE (2 mM de EDTA pH 8, 40 mM de TRIS, 19 mM de ácido acético), en una cámara de electroforesis¹³ a 80 volts¹⁴. El ADN fue teñido con una solución de bromuro de etidio^{XVII} a 0.1 mg/ml y visualizado en un transiluminador^{XXI}.

Digestión de los productos de la PCR

El fragmento de ADN amplificado fue digerido con la enzima de restricción *Eco* RV^{XVI}, la cual corta en la secuencia GATATC. De esta digestión se obtienen dos fragmentos, uno de 986 y otro de 460 pares de bases.

Ensayos de sensibilidad de la prueba de PCR

Se realizaron diluciones dobles seriadas del virus de referencia previamente titulado a 64 UHA y se comenzó con 1/2 hasta la dilución 1/1024, utilizando como diluyente PBS. Posteriormente a cada una de ellas se le extrajo el ADN y se le aplicó la técnica de PCR, los resultados obtenidos fueron contrastados con los obtenidos en hemoaglutinación.

¹³ LIFE TECHNOLOGIES ®

¹⁴ BIO-RAD ®

Clonación de los productos de la PCR

El fragmento amplificado fue clonado utilizando el vector Topo TA Cloning[®]^{XVI}, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para comprobar la presencia del inserto el plásmido fue digerido con las enzimas *Asp*718^{XVI} y *Eco*R1^{XVI}, las cuales cortan en los sitios GGTACC y GAGCTC respectivamente.

RESULTADOS

RESULTADOS EN LA HA-IHA CON LAS MUESTRAS DE HECES E INFECCIONES EN CULTIVO CELULAR

Todas las muestras de heces analizadas en este trabajo fueron procesadas para realizar ensayos de hemoaglutinación, con el fin de obtener títulos que indicaran la cantidad de virus en cada una de ellas expresado en unidades hemoaglutinantes (UHA), de igual forma, los sobrenadantes obtenidos en las infecciones en cultivo celular con las cepas distintas, fueron analizados de la misma manera, los cuales se muestran en las cuadro 2 y 3. En 13 muestras (37%) de las 35 analizadas se obtuvieron resultados positivos, en las cuales el título más alto de UHA correspondió a 128. Es importante resaltar, la presencia de aglutinaciones inespecíficas lo cual hace necesario la aplicación de la prueba de IHA para establecer el diagnóstico de PVC. Estas aglutinaciones inespecíficas fueron observadas en dos casos, en donde se obtuvo valores de 2 UHA (Cuadro 2).

En este estudio se consideró como resultado negativo en la prueba de HA donde existió una sedimentación de los glóbulos rojos y un resultado positivo donde se observó hemoaglutinación de ellos. La dilución más alta donde se observó un resultado positivo se consideró el punto final, el cual contiene 1 UHA, a partir de aquí, se obtuvo las UHA por muestra.

Cuadro 2. Resultados obtenidos en la prueba de HA-IHA con las muestras de heces.

Identificación	UHA	IHA^{**}	Identificación	HA	IHA^{**}
M1	128	+	M19	-	-
M2	128	+	M20	-	-
M3	128	+	M21	-	-
M4	64	+	M22	-	-
M5	128	+	M23	-	-
M6	32	+	M24	-	-
M7	128	+	M25	-	-
M8	8	+	M26	-	-
M9	8	+	M27	-	-
M10	2	+	M28	-	-
M11	-	-	M29	-	-
M12	-	-	M30	-	-
M13	2	-	M31	-	-
M14	64	+	M32	-	-
M15	-	-	M33	-	-
M16	2	-	M34	-	-
M17	32	+	M35	-	-
M18	128	+			

^{*} Unidades hemoaglutinantes

^{**} Este resultado sólo corrobora el obtenido en la HA.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en la HA-IHA con las infecciones en cultivo celular.

Identificación	UHA	IHA
PVC-ref	64	+
M1	4	+
M2	2	+
M3	1024	+
M4	2	+
M5	128	+
M6	2	+
M7	2	+
M8	2	+
M9	2	+
M10	512	+
M11	-	-
M12	-	-
M13	-	-
M14	-	-
M15	-	-
M16	-	-
M17	-	-

Identificación	HA	IHA
M18	-	-
M19	-	-
M20	-	-
M21	-	-
M23	-	-
M24	-	-
M25	-	-
M26	-	-
M27	-	-
M28	-	-
M29	-	-
M30	-	-
M31	-	-
M32	-	-
M33	-	-
M34	-	-
M35	-	-

En lo que se refiere a la interpretación de los resultados en la IHA, se consideró negativo donde, aun con la presencia del antisuero testigo, se observó hemoaglutinación y un resultado positivo donde se observó el 100% de la inhibición de la hemoaglutinación. Esta segunda prueba sólo fue utilizada para corroborar que la HA fuera producto de la presencia del virus PVC en las heces, por lo tanto, las unidades inhibitorias de la hemoaglutinación no fueron consideradas.

INFECCIÓN DE CELULAS A72 CON LAS DIFERENTES CEPAS DE PVC

Con el fin de obtener material biológico para la estandarización de la técnica de PCR se realizaron infecciones en cultivos celulares con la cepa de referencia utilizada en este trabajo. En la segunda parte de este trabajo, los cultivos fueron infectados con las cepas de campo obtenidas de las muestras de heces.

Las infecciones con las cepas de referencia, se realizaron como se indica en material y métodos, estos cultivos fueron observados diariamente con un microscopio invertido para identificar el efecto citopático y aplicar la técnica de HA-IHA para confirmar la presencia del PVC. En las células infectadas el efecto citopático comenzó a ser aparente a las 48 h. A las 72 h el desprendimiento del estrato celular en algunas zonas era evidente, mientras que las otras células formaban aún una monocapa, aunque empezaban a redondearse. Al cabo de 120 h, las células ya se encontraban totalmente desprendidas del estrato, en contraste, las células que no fueron infectadas se encontraban aún en monocapa sin cambios aparentes. Referente a la técnica de HA, los resultados se presentan en el cuadro 3. Como se muestra en este cuadro, no existieron aglutinaciones inespecíficas con los sobrenadantes de los cultivos y el número de UHA fue diferente. Cabe aclarar en este punto que el título en UHA, mostrado en el cuadro 3 con la cepa de referencia, se obtuvo hasta la tercer infección consecutiva en las células A 72. Para el resto de las muestras sólo se realizó una sola infección, con el fin de conservar las características de patogenicidad de las cepas aisladas.

EXTRACCIÓN DE ADN DEL PVC

Después de probarse varios protocolos, los resultados mostraron que la técnica descrita en este trabajo fue la más eficiente en la extracción de ADN viral a partir de muestras de heces y sobrenadantes de cultivo celular con respecto a los otros protocolos. Se debe señalar en este punto que se obtuvo una cantidad de ADN por muestra no visible en geles de agarosa, sin embargo fue suficiente para lograr amplificaciones con los iniciadores reportados en este trabajo.

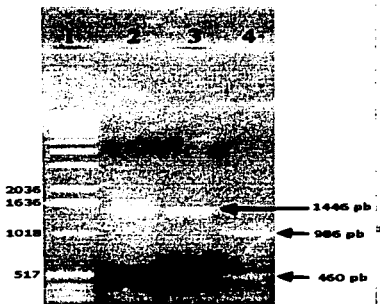


Figura 10. Foto de un gel de agarosa al 1 % en solución TAE, teñido con bromuro de etidio, donde se realizó la electroforesis de los productos de la PCR. En los carriles 2 y 3 se señalan bandas de 1446 pb que corresponden a los productos amplificados en la técnica de PCR, a partir de las extracciones de ADN de los sobrenadantes de las infecciones en cultivo celular con la cepa de referencia. En el carril 4 se señalan los fragmentos de 986 y 460 pb, obtenidos de la digestión del producto amplificado por la PCR, con la enzima Eco RV. En el carril número 1 se observa el marcador de peso molecular 1 kb DNA.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Antes de realizarse la técnica con las muestras de campo se trabajó con las extracciones a partir de los sobrenadantes de las infecciones realizadas con la cepa de referencia, la cual tenía 64 UHA. A partir del este sobrenadante se logró la amplificación del producto esperado de 1.4 kilo bases (kb) (**Figura 10**). No se obtuvo amplificación a partir de los sobrenadantes de los cultivos no infectados. Esto se sustenta con la búsqueda de homologías que se realizó con cada uno de los iniciadores propuestos en este trabajo, resultado que no existe homología significativa con secuencia alguna, excepto con el virus de la Panleucopenia y el virus de la enteritis del visón.

Con el fin de confirmar que este amplificado correspondiera a PVC, se procedió a su digestión con la enzima Eco RV; dado que el fragmento amplificado solo contiene un sitio de corte para esta enzima. El resultando esperado de la digestión son dos bandas, una de 986 y otra de 460 pares de bases,

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

aproximadamente(Figura 10). Los amplificados obtenidos con los sobrenadantes de las infecciones de cultivos, con las cepas de campo (dato no mostrado) y con la cepa de referencia (Figura 10) mostraron este patrón.

Una vez lograda la amplificación del producto esperado se procedió a realizar diluciones dobles seriadas con el sobrenadante de la infección en cultivo celular con la cepa de referencia, para obtener el número mínimo de UHA detectadas por la técnica de PCR. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Figura 11. Como se indica en esta figura se obtuvo amplificación hasta la tercer dilución (1/8) en la cual se tenían 8 UHA, este resultado es el mas alto que se obtuvo después de cinco repeticiones, es decir en dos ensayos fue posible identificar hasta 1 y 0.5 UHA, sin embargo no se consideraron, ya que la constante fue 8 UHA.

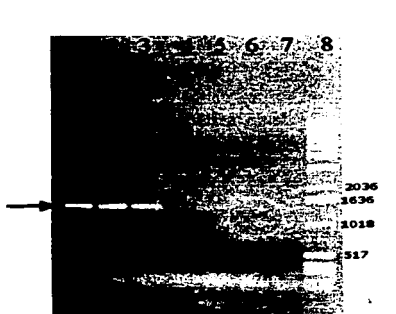


Figura 11. Foto de un gel de agarosa al 1 % en solución TAE, teñido con bromuro de etidio, donde se realizó la electroforesis de los productos obtenidos por medio de la PCR a partir de las extracciones de ADN de las diluciones dobles seriadas del sobrenadante de la infección en cultivo celular con la cepa de referencia. En los carriles 1, 2 y 3 se señalan bandas de 1446 pb que corresponden a los productos amplificados en la técnica de PCR correspondientes a las diluciones 1/2, 1/4, 1/8 respectivamente. Los carriles 4, 5, 6 y 7 corresponden a las diluciones 1/16, 1/32, 1/64 y 1/128 respectivamente, a partir de estas diluciones no se logró la amplificación del producto de 1446 pb. En el carril 8 se observa el marcador de peso molecular 1 Kb DNA.

Una vez que se determinó el número de UHA mínimas identificables por la técnica de PCR, esta técnica se realizó a partir de las extracciones con las muestras de heces, aun con las negativas (**Figura 12**). Para este ensayo se utilizaron los mismos sobrenadantes filtrados utilizados en las infecciones de cultivo celular, mismos que mostraron diferentes títulos en la prueba de HA. Aunque se conocía el número mínimo de UHA identificables por la técnica de PCR, no se realizó ninguna dilución con estos sobrenadantes con el fin de corroborar el dato de unidades mínimas identificables. También se aplicó esta técnica a todos los sobrenadantes de las infecciones realizadas con estas muestras (**Cuadro 4**). Como se muestra en este cuadro sólo se logró la amplificación en 7 de las 35 muestras (20%) de heces, el número de UHA en 3 de estas muestras era menor del mínimo identificable de 8 UHA, las restantes 5 tenían UHA por arriba del mínimo identificable. Un dato importante de resaltar es que a pesar de que en las muestras M14 y M18 se obtuvo amplificación del ADN viral a partir de heces, no fue posible su aislamiento (**Cuadro 3**), como consecuencia no fue posible la amplificación de ADN de PVC a partir de sobrenadantes del cultivo celular (**Cuadro 4**). Para el resto de las muestras la amplificación fue positiva a partir de las extracciones con los sobrenadantes de las infecciones en cultivo celular, excepto para una la cual presentó solo 2 UHA.

Cuadro 4. Resultados de la PCR a partir de la extracción con las heces filtradas y a partir de la extracción con los sobrenadantes de las infecciones con las mismas heces.

Identificación	PCR a partir de las heces	PCR a partir de las infecciones en cultivo celular	Identificación	PCR a partir de las heces	PCR a partir de las infecciones en cultivo celular
M1	+	+	M19	-	-
M2	+	+	M20	-	-
M3	+	+	M21	-	-
M4	+	-	M22	-	-
M5	+	+	M23	-	-
M6	-	-	M24	-	-
M7	-	-	M25	-	-
M8	-	-	M26	-	-
M9	-	-	M27	-	-
M10	-	-	M28	-	-
M11	-	-	M29	-	-
M12	-	-	M30	-	-
M13	-	-	M31	-	-
M14	+	-	M32	-	-
M15	-	-	M33	-	-
M16	-	-	M34	-	-
M17	-	-	M35	-	-
M18	+	-			

Además de las muestras que fueron sometidas al proceso de PCR, se incluyeron muestras testigo, los cuales fueron: el testigo positivo fue el amplificado logrado con la cepa PVC-ref; el testigo negativo fue el que contenía en lugar de ADN, agua Milli Q y para el caso de los sobrenadantes de las infecciones en

cultivo celular, un testigo de células el cual contenía el ADN obtenido de células sin infectar (**Figura 12**).

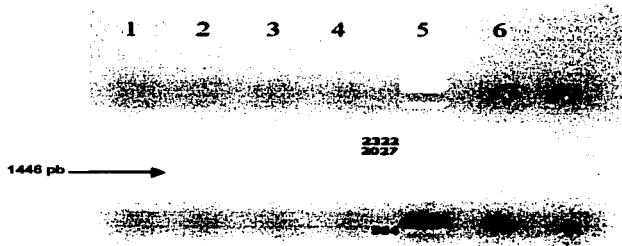


Figura 12. Foto de un gel de agarosa al 1 % en solución TAE, teñido con bromuro de etidio, donde se realizó la electroforesis de los productos obtenidos por medio de la PCR, a partir de las extracciones de ADN de las muestras de heces. En los carriles 2 y 6 se señalan bandas de 1446 pb que corresponden a los productos amplificados en la técnica de PCR, correspondientes a la muestra 18 y al testigo positivo respectivamente. Los carriles 1, 3, y 4 corresponden a las muestras 17, 19 y 20 respectivamente, a partir de estas muestras no se logró la amplificación del producto de 1446 pb. En el carril 5 se observa el marcador de peso molecular 1 Kb DNA.

CLONACIÓN DEL PRODUCTO DE LA PCR

Finalmente se obtuvieron aislamientos de cepas de campo de PVC. Los dos productos amplificados en heces e infecciones en cultivo celular fueron clonados, para la cual se utilizó el paquete comercial TOPO TA®, que contiene el plásmido pCR 2.1 TOPO. Este vector tiene un tamaño de 3.9 kb y un sitio único para la inserción de productos de PCR (1446 pb en este caso). El plásmido se identificó como pTMP1 y fue de un tamaño aproximado de 5.3 kb, por la sumatoria de las bases del plásmido y del ADN del Parvovirus insertado. Cuando fue digerido para linalizarlo con la enzima *Asp718*, que tiene un sitio de corte único en este vector, se corroboró la inserción pues muestra un peso de 5.3 kb (**Figura 13**).

De igual forma se utilizó la enzima *Eco RI* para la cual existen dos sitios ubicados justo a los extremos del sitio donde se introduce el inserto, por lo cual la digestión

produce su liberación, visualizando dos fragmentos, uno de tamaño correspondiente al vector (3.9 kb) y otro similar al amplificado (1.4 kb) (Figura 13).

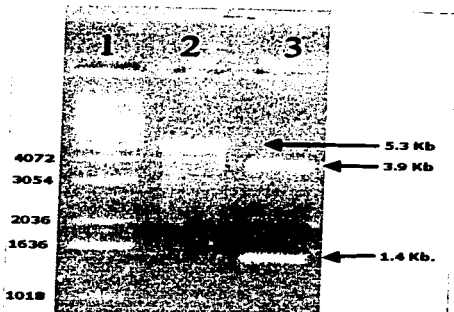


Figura 13. Foto de un gel de agarosa al 0.8 % en solución TAE, teñido con bromuro de etidio, donde se realizó la electroforesis de los fragmentos obtenidos de la digestión del plásmido pTMP1 con las enzimas *Asp718* y *EcoRI*. En el carril 2 se señala una banda de 5.3 Kb que corresponde al plásmido linealizado por la enzima *Asp718*. En el carril 3 se señalan bandas de 3.9 y 1.4 Kb obtenidas de la digestión del plásmido con la enzima *EcoRI*. En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular 1 Kb DNA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

El Parvovirus canino fue identificado por Eugster en 1977^{24a} y aislado en 1979 por varios investigadores ^{4,12,13,5}. En México, en 1980 Stephano y Estrella^{36,37} identificaron partículas virales sugestivas a Parvovirus. En 1982 Águila³⁸ encontró anticuerpos por la prueba de IHA en contra del virus y Soto en 1986³⁹ logró relacionar lesiones histopatológicas en yeyuno sugestivas a Parvovirus, con la observación de antígeno viral por la prueba de inmunofluorescencia. En este trabajo se logró identificar por primera vez, ADN de parvovirus canino a partir de muestras clínicas y de infecciones en cultivo celular con heces de animales con cuadro de enteritis, lo que se puede considerar, constituye el primer aislamiento de parvovirus canino en México.

La detección del virus se realizó también con la prueba de HA-IHA, con la cual se detectó PVC en 14 de las 35 heces analizadas en este estudio. En este sentido, existe una diferencia con respecto a la prueba de PCR, ya que solo 7 muestras resultaron positivas. Esta diferencia puede deberse a la técnica de recuperación de ADN a partir de heces, o también a la presencia de inhibidores inespecíficos de la PCR. En este trabajo se debió principalmente a la recuperación de ADN, ya que este virus es muy pequeño, por lo tanto la cantidad de material genético recuperable por mililitro de muestra es muy baja y la concentración del virus requiere de una centrifuga que alcance 117,000 g⁵, con la cual no se contaba. La presencia de inhibidores inespecíficos quedó descartada, cuando a una extracción de heces se le adicionó ADN extraído a partir de una infección en cultivo celular y se amplificó el segmento de 1.4 kb. De utilizarse esta prueba como método de diagnóstico se deberá mejorar los procedimientos de extracción. Actualmente existen en el mercado paquetes comerciales para la extracción de ADN de muestras de heces, que trabajan a través de columnas, con las cuales se purifica y concentra el ADN, incrementando la sensibilidad en la prueba de PCR. El inconveniente de estos paquetes por su costo, en este trabajo se utilizó un método

de extracción sencillo⁶⁸ que utiliza el mismo principio de las columnas siendo de muy bajo costo.

Se debe señalar que en la prueba de HA-IHA, los glóbulos rojos de cerdo que tiene la característica de ser aglutinados por el virus, solo son algunos grupos aun no identificados, esto crea un inconveniente, ya que de no tenerse cepas de referencia de parvovirus, no se podrá aplicar la prueba de HA-IHA. De igual forma el suero control puede representar otro inconveniente ya que debe de provenir de animales infectados. En este aspecto la PCR no requiere de estos controles y de requerirse una cepa control podría utilizarse una vacuna para perros.

Los iniciadores utilizados en este trabajo fueron diseñados para amplificar un segmento conservado del genoma de parvovirus canino. Aunque los iniciadores tienen homología con algunos segmentos en el genoma del virus de la panleucopenia felina, lo cual no es sorprendente puesto que se trata de virus relacionados filogenéticamente, sin embargo el producto amplificado sería de tamaño distinto. Además, el análisis de restricción empleado en este estudio, confirma que la secuencia amplificada corresponde al genoma de parvovirus canino únicamente.

Este segmento se tiene ahora clonado y su secuenciación se está llevando a cabo para poder identificar el serotipo al cual corresponde. Actualmente se sabe que el serotipo 2b ha sido identificado en la mayoría de los casos en los Estados Unidos de Norteamérica²⁹, el 2a en parte de Europa como Ucrania, Alemania y España²⁴ y el 2c sólo aislado en Asia³², para nuestro país no se conoce este dato y debido a la importación de animales, es difícil de establecer, a no ser que se lleven a cabo trabajos de epidemiología molecular. Este trabajo sienta las bases para iniciar trabajos de este tipo en México.

Los aislamientos del Parvovirus canino se lograron a partir de heces con títulos mayores a 20 UHA, confirmado por la prueba de HA-IHA en 10 muestras. Al

corroborar los resultados con la técnica de PCR, solo se encontraron positivos a la prueba 5 aislamientos, los cuales presentaban títulos virales en las heces igual o mayores a 640 UHA. Los resultados corroborados por la PCR concuerdan con los obtenidos por Carmichael 1980⁶⁸, puesto que él aisló el virus en heces que contenían títulos virales mayores a 512 UHA. Las otras cinco muestras que resultaron positivas a sus aislamientos por HA-IHA pero negativas a la PCR, se considera como negativo el aislamiento ya que el título del virus en las heces está por debajo de lo reportado por Carmichael 1980⁶⁸. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos por Mochizuki 1984⁶⁹, en donde obtuvieron títulos del virus en las heces de 128 y 5120 en HA y confirmados por IHA, pero no logró aislar el virus, lo cual se sugiere que posiblemente fue por la presencia de cápsidas vacías⁶⁹.

Los resultados de la aplicación de la PCR en las extracciones de los sobrenadantes de las heces sugieren que la sensibilidad de esta prueba es menor que la de HA-IHA, ya que solo se detecta producto de amplificación en las extracciones de los sobrenadantes de las heces que tienen un título viral igual o mayor a 640 UHA. Aunado a esto, las diluciones hechas para ver el mínimo identificable también resultaron ser menores que en la HA-IHA, lo cual contradice los resultados reportados por Mochizuki 1993⁷⁷, Meerarani 1996⁷⁹, Mizak 1999⁸¹, donde se muestra que la sensibilidad es mucho mayor en la PCR con respecto a la HA-IHA. Estos resultados pueden deberse nuevamente a la presencia de cápsidas vacías en las muestras, las cuales son detectadas por la HA-IHA, pero no por la PCR o también puede deberse al método de extracción de ADN dado que en otros trabajos se utilizaron columnas para la extracción y purificación de ADN.

Finalmente, en este trabajo se ajustaron las condiciones para un aislamiento exitoso del PVC en cultivo celular, con la línea de células A72, lo que permitirá en el futuro, más aislamientos de campo, que permitan establecer valores de prevalencia, junto con las pruebas PCR y HA-IHA.

En México la importancia de esta enfermedad en perros no se conoce, dado que las pruebas de diagnóstico no son concluyentes. La combinación de pruebas como PCR, aislamiento y HA-IHA podrán mostrar un panorama más amplio de la distribución e importancia del parvovirus en México.

CONCLUSIONES

1.- Este trabajo representa el primer reporte de aislamiento del PVC en México, al lograrse cinco aislamientos a partir de muestras de heces de animales con cuadro clínico de gastroenteritis, como lo habían sugerido trabajos anteriores.

2.- La técnica de PCR es una alternativa para la identificación de PVC en muestras de heces, sin embargo deben de mejorarse los procedimientos de extracción de ADN a partir de estas muestras y en caso de aplicarse al diagnóstico, complementarlo con la HA-IHA.

3.- Con este trabajo se sientan las bases para iniciar estudios de epidemiología molecular en México, lo que permitirá conocer las variantes de este virus que se presentan en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Birchard SJ y Sherding RG. *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. México: McGraw-Hill interamericana, 1996.
2. Greene CE. *Enfermedades infecciosas de perros y gatos*. 2nd ed. México: McGraw-Hill interamericana, 1998
3. Appel M, Meunier P, Pollock R, Greisen H y Carmichael L. *Canine viral enteritis*. *Canine Practice* 1980;7:22-34.
4. Black JW, Holscher MA, Powell HS y Byerly CS. *Parvoviral enteritis and panleucopenia in Dogs*. *Vet. Med. Sm. Anim. Clin* 1979;74:47-50.
5. Walker ST, Feilen CP, Sabine M, Love DN y Jones RF. *A Serological Survey of Canine Parvovirus infection in New South Wales*, Australia. *Vet. Record*. 1980;106:324-325.
6. Parrish CR. *The Emergence and Evolution of Canine Parvovirus. An Example of Recent Host Range Mutation*. *Sem. Virol*. 1994;5:121-132.
7. Gagnon AN, Crowe SP, Allen DG y Downey RS. *Myocarditis in Puppies: Clinical, Pathological and Virological Findings*. *Can. Vet. J* 1980;21:195-197.
8. Murphy FA, Studdert MJ, Gibbs EPJ y Horzinek MC. *Veterinary virology*. 3° ed. USA: Academic Press, 1999.
9. Truyen U y Parrish CR. *The Evolution and Control of Parvovirus Host Ranges*. *Sem. Virol*. 1995;6:311-317.
10. Truyen U. *Canine Parvovirus*. *Recent Advances in Canine Infectious Diseases* [serial online] 26-Jan-2000 [cited 2002 Jan 10];AO106.0100. Available from: URL: http://www.livis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/truyen/chapter_frm.asp
11. Mann PC, Bush M, Appel JC, Beehler BA y Montali RJ. "Canine Parvovirus Infection in South American Canids". *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1980;177:779-783.
12. Smith JR, Farmer TS y Johnson RH. "Serological Observations on the Epidemiology of Parvovirus Enteritis of Dogs". *Aust. Vet. J.* 1980;56:149-150.
13. Appel MJ, Scott FW y Carmichael LE. "Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with hemorrhagic enteritis". *Vet. Record*. 1979;105:1566-159.
14. Mochizuki M y Hashimoto T. "Growth of Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus *in vitro*". *Jpn. J. Vet. Sci.* 1986;48:841-844 .
15. Ybañez RR, Cortés E, Vela C y Casal JI. "Identification of Types of Canine Parvovirus Circulating in Spain". *Vet. Rec.* 1995;136:174-175.
16. Hagiwara MK, July JR, Baccaro MR y Angelo MJ. "Enterite hemorrágica em caes associada á infeccao por um parvovirus". *Arg. Inst. Biol.* 1980;47:47-49.
17. Mahy BW, Collier L. *Microbiology and Microbial Infections: Virology*. 9nd ed. Gran Bretaña. Arnold, 1998.

18. Agdbange M, Parrish CR y Rossmann MG. "The Recognition of Parvovirus Capsids by Antibodies". *Sem Virol.* 1995;6:219-231.
19. Kasamatsu H y Nakanishi A. "How Do Animal DNA Viruses Get to the Nucleus?". *Annu. Rev. Microbiol.* 1998;52:627-686.
20. Steinel A, Munson L, Vuuren MV, y Truyen U. "Genetic Characterization of Feline Parvovirus Sequences from Various Carnivores". *J. Gen. Virol.* 2000;81:345-350.
21. Domrachev M, Federhen S, Hotton C, Leipe D, Soussov V, Sternberg R, Turner S. Parvoviridae. [serial online] cited 2002 Jan 11. Available from: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=10780&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
22. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ y White DO. *Virologia veterinaria*. España: Acribia., 1992.
23. Binn LN, Lazar EC, Hedi GA y Kajima M. "Recovery and Characterization of a Minute Virus of Canines". *Infect. Immunity.* 1970;1:503-508.
24. Pereira C, Monezi TA, Mehnert UD, Angelo DM y Durigon LE. "Molecular Characterization of Canine Parvovirus in Brazil by Polymerase Chain Reaction Assay". *Vet. Micro.* 2000;75:127-133.
- 24a. Eugster AD y Nairn C. "Diarrhea in Puppies: Parvovirus-like Particles Demonstrated in Their Feces" *Southwest Vet.* 1977;30:59-60.
25. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF y Carmichael LE. "Natural Variation of Canine Parvovirus". *Science.* 1985;230:1046-1048.
26. Truyen, U. "Emergence and Recent Evolution of Canine Parvovirus". *Vet. Microbiol.* 1999;69:47-50.
27. Truyen U, Evermann JF, Vieler E y Parrish CR. "Evolution of Canine Parvovirus Involved Loss and Gain of Feline Host Range". *Virol.* 1996;215:186-189.
28. Horuchi H, Yamaguchi Y, Gojobori T, Mochizuki M, Nagasawa H, Toyoda Y, Ishiguro N y Shinagawa M. "Differences in the Evolutionary Pattern of Feline Panleukopenia Virus and Canine Parvovirus". *Virology.* 1998;249: 440-452.
29. Parrish CR, Aquadro ML, Strassheim JF, Evermann J-Y, y Mohammed H. "Rapid Antigenic-type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus". *J. Virol.* 1991;65: 6544-6552.
30. Mochizuki M, Kawabata H y Jin Sheng W. "Antigenic and Genomic Comparisons of Some Feline Parvovirus Subspecies Strains". *J. Vet. Med. B.* 1991;38: 99-105.
31. Truyen U y Parrish CR. "Canine and Feline Host Ranges of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus: Distinct Host Cell Tropisms of each Virus *in vitro* and *in vivo*". *J Virol.* 1992;66:5399-5408.

32. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, y Takahashi E. "Predominance of Canine Parvovirus (CPV) in Unvaccinated Cat Populations and Emergence of New Antigenic Types of CPVs in Cats". *Virology*. 2000;278:13-19.
33. Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, Sato E, Kawakami K, Miyazawa T, Toya Y, Takahashi E, Mikami T Y Mochizuki M. "Pathogenic Potential of Canine Parvovirus Types 2a and 2c in Domestic Cats". *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 2001;8:663-668.
34. Chang S-F, Sgro J-I Y Parrish CR. "Multiple Aminoacid in the Capsid Structure of Canine Parvovirus Coordinately Determine the Canine Host Range and Specific Antigenic and Hemagglutination Properties". *J. Virol.* 1992;66:6856-6867.
35. Parker JSL y Parrish CR. "Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid". *J. Virol.* 1997;17:9214-9222.
36. Stephano AH. "Epizootia de enteritis viral canina en México. Posible infección por parvovirus". *Vet. Méx.* 1980;11:141-148.
37. Stephano HA y Gómez ES. "Enteritis hemorrágica en cachorros en México: observación de partículas similares a parvovirus en raspado de mucosa intestinal". *Vet. Méx.* 1981;12:103-104.
38. Águlla THM. *Determinación de anticuerpos contra parvovirus canino en sueros de perros en México* (tesis de licenciatura). México (D.F.) México: Fac. Med. Vet. Zoo. Universidad nacional Autónoma de México, 1982.
39. Soto PMA. *Lesiones histopatológicas y su posible asociación con la infección por parvovirus canino (VPC)* (tesis de licenciatura). México (D.F.) México: Fac. Med. Vet. Zoo. Universidad nacional Autónoma de México, 1986.
40. Angelo MJO, Hagiwara MK July J, Carvalho RPS y Baccaro MR. "Isolamento de parvovirus canino no Brasil". *Rev. Fac. Vet. Zootec. Univ. Sao Paulo.* 1988;25:123-134.
- 40a Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Toya Y, Takahashi E y Mochizuki M. "Feline host range of canine Parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats". *Emer. Infect. Dis.* 2002;8:341-346.
41. Hagiwara MK, Mimazuka EM y Pavan MFB. "Role of intestinal flora in acute hemorrhagic gastroenteritis (parvovirus infection) of dog". *Braz. J. vet. Res. Anim. Sci.* 1996;33:107-109.
42. Del Amo AN, Aprea AN y Petruccelli MA. "Detection of viral particles in feces of young dogs and their relationship with clinical signs". *Revista de Microbiología.* 1999;30:237-241.
43. Homem VSF, Mendes YG y Linhares AC. "Gastroenterite canina-agentes virais nas fezes de caes diarréicos e nao diarréicos". *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 1999;51:531-536.
44. López J, Villouta G y Vourt A. Aplicación de una prueba inmunoenzimática en el diagnóstico de parvovirus canino tipo 2. *Avan. Cienc. Vet.* 1994;9:134-137.
45. Courtenay O, Quinnell RJ y Chalmers WSK. "Contact rates between wild and domestic canids: no evidence of parvovirus or canine distemper virus in crab-eating foxes". *Vet. Microbiol.* 2001;81:9-19.

46. Mohanty SB. *Virologia veterinaria*. México: interamericana, 1983.
47. Larski Z. *Virologia para veterinarios*. 2a ed. México: la Prensa Médica Mexicana, 1989
48. Matsui T, Matsumoto T, Karno T, Awakura T, Taniyama H, Furuoka H y Ishikawa H. "Intranuclear inclusions in the stratified squamous epithelium of the tongue in dogs and cats whit parvovirus infection". *Vet. Pathol.* 1993;30:301-305.
49. Reed AP, Jones EV y Miller TJ. "Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus". *J. Virol.* 1988;62:266-276.
50. Agbandje M, Parrish CR y Rossmann MG. "The Structure of parvoviruses". *Seminars in Virology.* 1995;6:299-309.
51. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith T, Rossmann MG, Compans RW y Parrish C R. "The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications". *Science.* 1991;251:1456-1464.
52. Weichert WS, Parker JS, Wahid ATM, Chang SF, Meier E, y Parrish CR. "Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection". *Virology.* 1998;250:106-117.
53. Hueffer K y Parrish CR. "Parvovirus host range, cell tropism and evolution". *Cur. Op. Microbiol.* 2003;6:392-398.
54. Strassheim LS, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro J-Y, Parrish CR. "Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid". *Virology.* 1994;198:175-184.
55. Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS y Parrish CR. "The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection". *J. Virol.* 2002;76:1884-1891.
56. Anderson S, Momoeda M, Kawase M, Kajigaya S y Young N. "Peptides derived from the unique region of B19 parvovirus minor capsid protein elicit neutralizing antibodies in rabbits". *Virology.* 1995;206:626-632.
57. Barbis DP, Chang SF y Parrish CR. "Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding". *Virology.* 1992;191:301-308.
58. Vihinen-Ranta M, Kalela A, Mäkinen P, Kakkola L, Marjomäki V Y Vuento M. "Intracellular route of canine parvovirus entry". *J. Virol.* 1998;72:802-806.
59. Basak S, Turner H y Parr S. "Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine Parvovirus in A72 cells". *Virology.* 1994;205:7-16.
60. Parker J S y Parrish CR. "Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking". *J. Virol.* 2000;74:1919-1930.
61. Hirasawa T, Yono K y Mikazuki K. "Detection and genomic analysis of canine parvovirus by the polymerase chain reaction". *J. Vet. Med. B.* 1996;43:545-554.

62. Vihinen-Ranta M, Yuan W y Parrish CR. "Cytoplasmic Trafficking of the canine Parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport". *J. Virol.* 2000;74:4853-4859.
63. Cotmore FS y Tattersall P. "DNA replication in the autonomous parvovirus". *Sem. Virol.* 1995;6:271-281.
64. McCarthy G. "Canine parvovirus infection: a review". *Irish Vet. J.* 1980;34:15-18.
65. Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJG y Slauson DO. "Pathogenesis of canine Parvovirus enteritis: the importance of viremia". *Vet Pathol.* 1985;22:60-71.
66. Robinson WF, Wilcor GE y Flower RLP. "Evidence for a parvovirus as the etiologic agent in myocarditis of puppies". *Aust. Vet. J.* 1979;55:294-295.
67. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Scott F Y Carmichael LE. "Canine viral enteritis. I. Status a report on corona - and parvo-like viral enteritis". *Cornell Vet.* 1979;69:123-133.
68. Carmichael LE, Joubert JC y Pollock RVH. « Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies and diagnostic applications". *Am. J. Vet. Res.* 1980;41:784-791.
69. Mochizuki MC, Hida S, Hsüan S y Sato H. "Fecal examinations for diagnosis of canine parvovirus infection". *Jpn. J. Vet. Sci.* 1984;46:587-592.
70. Gorski J, Daniel A, Mizak B y Zwierzchoeski J. "Requirements for haemagglutination inhibition test for diagnosis of parvovirus infection of carnivores". *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 1993;38:59-66.
71. Rimmelzwaan GF, Juntti N, Klinbeborn B, Groen J, UytdeHaag FGCM y Osterhaus ADME. "Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on monoclonal antibodies for the serology and antigen detection in canine parvovirus infections". *Vet. Quart.* 1990;12:14-20.
72. Mohan R, Nauriyal DC y Singh KB. "Detection of canine parvovirus in faeces, using a parvovirus ELISA test kit". *Indian Vet.* 1993;3:301-303.
73. Drane DP, Hamilton RC y Cox JC. "Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus". *Vet. Microbiol.* 1994;41:293-302.
74. Esfandariari J Y Klingeborn B. "A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink". *J. Vet. Med. B.* 2000;47:145-153.
75. Remond M, Boireau P y Lebreton F. "Partial DNA cloning and sequencing of a canine parvovirus vaccine strain: application of nucleic acid hybridization to the diagnosis of canine parvovirus disease". *Arch. Virol.* 1992;127:257-269.
76. Nho WG, Sur JH, Doster AR y Kimm SB. "Detection of canine parvovirus in natural infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization". *J. Vet. Diagn. Invest.* 1996;9:255- 260.
77. Mochizuki MC, San Gabriel H, Nakatani M y Yoshida M. "Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faeces specimens". *Res. Vet. Sci.* 1993 ;55:60-63.

78. Truyen U, Platzer G, Parrish CR, Hänichen T, Hermanns W y Kaaden OR. "Detection of canine parvovirus DNA in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction". *J. Vet. Med. B.* 1994;41:148-152.
79. Meerarani S, Ramadass P, Subhashini CR y Nachimuthu K. "Polimerase chain reaction assay for early detection of canine parvovirus". *Indian Vet. J.* 1996;73:1013-1016.
80. Maxon TR, Meurs KM, Lehmkuhl LB, Magnon AL, Weisbrode SE y Atkins CE. "Polimerase chain reaction analysis for viruses in paraffin-embedded myocardium from dogs with dilated cardiomyopathy or myocarditis". *Am. J. Virol. Res.* 2001;62:130-135.
81. Mizak B y Rzezutka A. "Application of nested PCR for the detection of canine parvovirus in faeces". *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 1999;43:19-24.
82. Kazuhiro U, Michio S, Mutsuyasu N Y Kohichi Y. "Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dog". *Vet. Microbiol.* 1995;43:315-23.
83. Kazuhiro W, Sunaliri M, Yamamoto A, Nakajima M y Yamura K. "Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples". *Vet. Microbiol.* 1996;52:73-79.
84. Datos del Laboratorio de Serología e Inmunología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
85. Alcamo IE. *DNA Technology*. 2nd ed. New York: Harcourt Academic press, 2001.
86. Old R y Primrose S. *Principles of Gene Manipulation*. 5nd ed. Australia: Blackwell, 1994.
87. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 2nd ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.
88. Clewley JP. PCR detection of Parvovirus B19. In: Persing DH, Smith TF, Tenover FC y White TJ, editor. "Diagnostic molecular microbiology: principles and applications". Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 1993:367-373.
89. Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T y Takahashi E. "Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats". [serial online] cited 2002 jun 25. Available from: URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=33284980&dopt=GenBank&term=VP2+parvovirus&qty=1