



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIAGNOSTICO DE PARVOVIRUS CANINO
TIPO 2 (PVC-2) EN PERROS DOMESTICOS
POR INMUNOHISTOQUIMICA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

ROCIO ANGELICA RUIZ ROMERO

ASESORES: **DRA. I. EUGENIA CANDANOSA ARANDA**
MVZ EAPV FELIX D. SANCHEZ GODOY



MEXICO, D. F. 2005

M341796



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.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mi papito y a mi mamita, a mi hermana, a mi madrina Carolita y a mis "hermanitos" preciosos: Darky, en donde quiera que estés siempre vas a ser mi nena divina, al desquiciado de Tomás por ser tan noble, te adoro; a mi chiquita Jacinta por ser tan alegre y quererme tanto, a mi "sobrinito" Vago por enseñarme todos los días que no hay nada de que preocuparse, a mis "ranolas" por recordarme que lo más simple es lo más padre.

A la vida por permitirme disfrutar cada día con las personas que más quiero.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Rocio Angelica Ruiz

Romero

FECHA: 7-marzo-05

FIRMA: _____



AGRADECIMIENTOS

A mis papitos por estar siempre conmigo, por tratar de ser los mejores papás del mundo, por darme todo su cariño, por enseñarme a ser una buena persona y a ser responsable, nunca voy a acabar de agradecerles por haberme dado más de lo que merezco y por seguir haciéndolo, en pocas palabras LOS AMO y sin ustedes no sería nada.

Hermana eres lo máximo, gracias por tus consejos, por enseñarme que solo yo puedo decidir lo que está bien o mal en mi vida. Siempre vamos a estar juntas. Daniel gracias por convertirte en mi hermano mayor y por hacer feliz a mi hermana, gracias por aguantarme y por tu apoyo. Te quiero.

Dra. Eugenia Candanosa no tengo palabras para agradecerle la confianza que me tuvo desde un principio y todo el apoyo que me ha dado, por ser una buena amiga además de un gran ejemplo a seguir, espero no decepcionarla nunca. GRACIAS.

Dr. Félix Sánchez por todo tu apoyo, paciencia y consejos a lo largo de este duro trabajo.

Dr. Alfonso López Mayagoitia por proporcionarnos el testigo positivo. Dr. Andrés Ducoing W. por su colaboración en la parte estadística de este trabajo. Sr. Jaime Eugenio Córdova por el material fotográfico utilizado en esta tesis y por su amistad. Al apoyo recibido por parte de la Dirección General de Evaluación Educativa y al Programa de Becas para la Elaboración de Tesis de Licenciatura en proyectos de Investigación (PROBETEL).

Dr. Fernando Constantino por permitirme colaborar y realizar mi tesis en el Departamento de Patología. A los patólogos José Ramírez, Luis Ignacio Montesinos, Enrique Aburto por sus enseñanzas y apoyo en la elaboración de esta tesis.

A los excelentes técnicos del Departamento de Patología: Don Luis por sus sabios consejos, apoyo y cariño, mil gracias por todo, Lalo, Lupita, Don Aure, Don Benito por su apoyo en la elaboración de esta tesis. Con mucho cariño a Carmelita por jalarme las orejas cuando la riego.

A los miembros del jurado Dr. José Ramírez Lezama, Dr. Fausto Reyes, Dr. Alfredo Sahagún, Dra. Laura Cobos, por su valioso tiempo.

Carolita y Rafa: Son los mejores padrinos que me pudieron tocar, gracias por estar siempre conmigo. Caro gracias por creer ciegamente en mí, se qué sigues apoyándome desde donde estas.

A mis tíos Poly y Pipo, Tita y Mother aunque no nos conocimos se que gracias a ustedes tengo una familia hermosa. Abuelo Peto te extraño, Padis por haberme consentido tanto. Gracias a todos por cuidarme siempre.

Sandy: hermana de mi vida!, siempre vas a ser mi mejor amiga, gracias por todos los años tan padres que estuvimos juntas y todos los que nos faltan. Vane: mi otra hermana de mi vida!! Gracias por estar siempre conmigo, eres una excelente persona. A las 2 por más de 20 años de amistad, sé que siempre van a ser mis amigas por apoyarme y no juzgarme nunca. Las amo. A todos mis amigos del Queen Elizabeth School.

A mis amigos que estuvieron conmigo desde el principio de la carrera. Mau: eres la mejor persona que he conocido, gracias por ser como eres, por estar conmigo y por aceptarme como soy, te quiero muchísimo. Chío por todos los buenos momentos que pasamos juntas. Pancho eres un gran amigo y un gran apoyo. Bárbara porque inconcientemente me ayudaste a ser mejor estudiante cada día. Natalia por tu sinceridad y amistad desinteresada. A todos los adoro. A todos mis compañeros de Patología, especialmente a Erika gracias por tu consejos y amistad, Larissa por ser tan linda y ayudarme siempre, Mario, Rodrigo, Paco, Isaac Conrado.

A las personas que voluntaria o involuntariamente me enseñaron que la vida no es color de rosa y que en algún momento me hicieron caer sin importarles pasar sobre mí, ahora de pie y con la frente en alto les digo gracias por enseñarme el lado malo de la vida pero yo no pertenezco a su mundo, sino fuera por ustedes no sería la mujer fuerte que soy ahora.

CONTENIDO

Página

| | |
|---|----|
| RESÚMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| • PROPIEDADES DE LOS PARVOVIRUS..... | 2 |
| • HISTORIA..... | 3 |
| • CARACTERÍSTICAS DEL PARVOVIRUS CANINO | 7 |
| • EPIZOOTIOLOGÍA | 7 |
| • TRANSMISIÓN | 8 |
| • PATOGENIA..... | 8 |
| • SÍGNOS CLÍNICOS..... | 10 |
| • LESIONES MACROSCÓPICAS..... | 10 |
| • LESIONES MICROSCÓPICAS..... | 12 |
| • INMUNIZACIÓN..... | 13 |
| • DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES | 14 |
| • DIAGNÓSTICO | 14 |
| IMPORTANCIA | 19 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| HIPÓTESIS | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 20 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 20 |

| | |
|---|----|
| MATERIAL Y MÉTODOS | 22 |
| • CRÍTERIOS DE INCLUSIÓN | 22 |
| • TOMA DE MUESTRAS | 22 |
| • EVALUACIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS..... | 22 |
| • MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO | 24 |
| • ANÁLISIS DE RESULTADOS..... | 28 |
| • ESTUDIO RETROSPECTIVO..... | 29 |
| RESULTADOS | 30 |
| • ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO..... | 30 |
| • ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO..... | 31 |
| • ESTUDIO RETROSPECTIVO..... | 32 |
| DISCUSIÓN | 34 |
| CONCLUSIONES | 39 |
| REFERENCIAS | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | <u>Página</u> |
|----------------|---------------|
| FIGURAS..... | 49 |
| CUADROS | 56 |
| APÉNDICES..... | 60 |

RESUMEN

RUIZ ROMERO, ROCÍO ANGÉLICA. Diagnóstico de Parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) en perros domésticos por inmunohistoquímica (bajo la dirección de Dra. I. Eugenia Candanosa Aranda y MVZ EAPV Félix D. Sánchez Godoy).

Se realizó un estudio retrospectivo de 190 casos (1998-2003) con lesiones intestinales histopatológicas de parvovirus canino. De los cuales se evaluaron treinta casos de intestino delgado por el complejo avidina-biotina-peroxidasa empleando un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón contra parvovirus canino tipo 2 (PVC-2). Se obtuvieron reacciones inmunohistoquímicas positivas en el 76.67% (23 casos) de las muestras procesadas. Los linfocitos, macrófagos y las células necróticas de las criptas intestinales fueron las células que con mayor frecuencia presentaron inmunopositividad. Las lesiones intestinales histopatológicas que se asociaron sensiblemente a PVC-2 fueron las células de regeneración y necróticas en las criptas intestinales por la evidencia del antígeno parvoviral. La demostración inmunohistoquímica del antígeno de PVC-2 es un método de gran ayuda para confirmar el diagnóstico etiológico en casos con lesiones intestinales sugerentes de esta enfermedad.

2 INTRODUCCIÓN

El parvovirus canino es una de las causas más importantes de mortalidad en cachorros. Esta entidad patológica de distribución mundial está estrechamente relacionada con el virus de la Panleucopenia Felina (VPF). Las gastroenteritis virales en perros cobraron gran importancia a partir de 1978 con la aparición del parvovirus canino tipo 2 (PVC-2).¹⁻¹⁶

Actualmente, se reconocen dos formas de enfermedad: cardíaca (cachorros de 3 a 16 semanas de edad) y entérica (entre el destete y los 6 meses de edad).^{15,16}

La enfermedad neurológica primaria puede ocurrir como resultado de hemorragias en el sistema nervioso central por coagulación intravascular diseminada o hipoglucemia durante el proceso patológico, la sepsis o alteraciones de ácidos, bases y electrolíticas. Así mismo, es posible una infección concurrente con el virus del distemper canino.^{17, 18,19}

PROPIEDADES DE LOS PARVOVIRUS

La familia *Parvoviridae* comprende 2 subfamilias:

1. *Parvovirinae*: en donde se encuentran los virus que afectan a los vertebrados.
2. *Densovirinae*: para los virus que afectan a los insectos.^{20,21}

La subfamilia *Parvovirinae* comprende 3 géneros:

1. *Parvovirus*. Los miembros de este género infectan a los vertebrados y tienen una replicación autónoma.

2. ***Erythrovirus***. Que incluye al virus B19 que afecta a los humanos y está relacionado con el virus del mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) el cual también tiene una replicación autónoma.
3. ***Dependovirus***. Los virus pertenecientes a este género son llamados "adeno-asociados" ya que solo son capaces de replicarse con ayuda de otro virus, generalmente un adenovirus.^{20, 21}

Los miembros del género *Parvovirus* afectan a cerdos, gatos, perros, minks, ratones, ratas, hamsters, gansos y patos.²⁰ (Cuadro 1).

El parvovirus canino tipo 1 o "virus diminuto de los caninos" (PVC-1, VDC) tiene propiedades antigénicas y genómicas distintas al PVC-2 y al parecer no tiene relación alguna con los parvovirus de otras especies.²² El otro virus canino, llamado parvovirus canino tipo 2 está estrechamente relacionado con el virus felino y del mink. El virus canino puede replicarse en células caninas y felinas, pero el virus felino únicamente se replica en células de felino.²⁰

El PVC-2 es similar al virus de la panleucopenia felina en más del 98% de su genoma, únicamente hay 6 nucleótidos diferentes en la proteína VP2 (posiciones 3025, 3065, 3094, 3753, 4477, 4498); estas diferencias muestran efectos biológicos enormes ya que pierde la capacidad para replicarse en gatos.²³

HISTORIA

El parvovirus canino tipo 2 fue identificado por Eugster y Nalm³ en Norteamérica como la causa de una enfermedad nueva de los perros y a otros miembros de la familia *Canidae* tales como lobos, coyotes, perros

sudamericanos y perros mapacheros asiáticos. Se piensa que el virus surgió de una mutación del virus de la panleucopenia felina.¹⁻¹⁴

Actualmente, se conocen dos parvovirus distintos como agentes infecciosos de los perros: el patógeno PVC-2 que fue identificado en 1978 como la causa de una enfermedad nueva de los perros y de los caninos salvajes; y el "virus diminuto de los caninos" que fue informado por Binn en 1970. El VDC es un parvovirus completamente diferente que no había sido asociado con enfermedad natural hasta 1992. El VDC puede causar neumonía, miocarditis y enteritis en los cachorros o infección transplacentaria en las hembras preñadas, con reabsorción de los embriones y muerte fetal. Las infecciones por este virus han sido confirmadas en EUA, Suecia, Alemania y más recientemente en Italia.²⁴

El origen del PVC-2 es desconocido, aunque lo más probable es que se originó a partir de una mutación directa del VPF en la población de perros o gatos.²⁵ Otra hipótesis sugiere que el PVC-2 se originó de una vacuna contra la Panleucopenia felina y se diseminó por medio de las vacunas, esto podría explicar la aparición simultánea en varias poblaciones de perros en el mundo, pero los estudios subsecuentes no revelaron ningún apoyo para esa hipótesis.^{24,25} Una tercera hipótesis sugiere que el antecesor de PVC-2 tenía como huésped a un carnívoro silvestre como el zorro rojo europeo (*vulpes vulpes*) en el cual se originó una variante que dio lugar al PVC-2.^{24,25}

El PVC-2 probablemente se presentó inicialmente en Europa encontrándose animales seropositivos en Grecia en 1974, posteriormente en Bélgica en el año

de 1976, Holanda en 1977, Dinamarca, Australia y Estados Unidos en 1978, Reino Unido, Irlanda, Alemania y Japón en 1979, luego se diseminó alrededor del mundo entre los años 1978 y 1979, durante un periodo aproximado de 6 meses.^{23, 26, 27,28}

En 1979 surgió una nueva variación de la cadena de PVC-2 a la cual se le denominó PVC-2a y en 1984 se identificó otra variante denominada PVC-2b. El PVC-2a tiene cambios de nucleótidos en las posiciones 3045, 3685, 3699 y el PVC-2b tiene un cambio más en la posición 4062, estos nuevos antígenos son los predominantes en la población canina y han reemplazado por completo al PVC-2.^{23, 29,30}

El aislamiento original del PVC-2 no se replica en gatos, pero las variantes PVC-2a y PVC-2b se replican eficientemente en los gatos y ambos se han aislado de gatos en Japón, Alemania y Estados Unidos de América que presentan una parvovirus natural indistinguible de la panleucopenia.²⁴ En Estados Unidos, el PVC-2b ha sustituido en gran parte a las cepas aisladas previamente, en tanto que en Asia y en Europa predominan tanto PVC-2a y PVC-2b.²⁹

Ikeda *et al.*, en el 2000, aislaron nuevas variantes antigénicas de PVC de leopardos de Vietnam y Taiwán ya que perdían la capacidad de reaccionar con varios anticuerpos monoclonales, estos fueron designados PVC-2c y divididos más a fondo en dos tipos antigénicos PVC-2c(a) y PVC-2c(b) por su reactividad con el anticuerpo monoclonal B4A2 que distingue PVC-2a y PVC-2b.³¹

A partir de Junio de 1980, en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma

de México (UNAM), se empezaron a recibir cada vez con más frecuencia cadáveres de perros con historia clínica de cuadro gastroentérico agudo, la mayor parte de los cuales eran menores de un año. En la necropsia de estos animales se encontraron lesiones gastroentéricas similares a las de panleucopenia felina.^{32, 33}

Los Médicos Veterinarios Zootecnistas dedicados a la clínica en pequeñas especies de la República Mexicana confirmaron la presencia de una enfermedad altamente contagiosa en diferentes estados con características diferentes a los cuadros gastroentéricos que habían observado previamente.³²

En 1981 se realizaron estudios de Microscopía electrónica, donde se confirmó la presencia de partículas virales de 22 nm de diámetro, esféricas, en muestras de mucosa intestinal compatibles con parvovirus canino.³³

En 1982 se examinaron 193 sueros de perros no vacunados contra parvovirus canino procedentes de la Ciudad de México y algunos estados de la República Mexicana como Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Ciudad de México, que fueron colectados entre los meses de abril a diciembre de 1981, para determinar la presencia de inmunoglobulinas contra el parvovirus canino por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación. Se encontraron 33 casos positivos a la prueba que representan el 17.04% de la muestra, hubo sueros positivos en todas las ciudades muestreadas.^{34, 35,36}

En México, durante el 2003, se presenta el primer informe de detección del PVC-2 a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así

como el aislamiento del virus a partir de muestras de heces de animales con cuadro clínico de gastroenteritis.³⁰

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.²⁷ Su genoma es de tipo ADN el cual consta de aproximadamente 5000 bases de una sola cadena lineal y con palindromos 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. Tienen replicación intranuclear utilizando la fase "S" de la célula, en la cual duplica su ADN, formando cuerpos de inclusión intranucleares.^{27, 30} Esta característica está relacionada con su potencial patogénico y por su tropismo por las células de replicación constante como enterocitos y células linfoides.^{27, 29, 30,37}

El PVC-2 mide 25 nm de diámetro, su ADN tiene 5323 pares de bases, es uno de los virus más resistentes que se conocen; es termoestable ya que soportan 60 °C por 60 minutos, es resistente al éter, cloroformo y a un rango de pH de 3-9, es sensible al hipodorito de sodio en exposición prolongada a una proporción 1:30, también puede ser inactivado con formalina y luz solar.^{29,30}

EPIZOOTIOLOGÍA

Los perros de cualquier edad pueden infectarse con el PVC-2, pero son más frecuentes las manifestaciones clínicas en cachorros entre el destete y los seis meses de edad. Los cachorros menores de seis semanas por lo general se

encuentran protegidos por la inmunidad materna pasiva. En perros adultos, generalmente la infección es asintomática, siendo esta forma una fuente importante de diseminación del virus.^{15,38} En cachorros la morbilidad es del 20-100% y la mortalidad alcanza un 10-50%; en perros adultos, la morbilidad es menor al 20% y la mortalidad menor al 5%.^{7,30}

Ciertas razas parecen tener mayor predisposición para la infección por PVC-2 y son más susceptibles a la forma más intensa de la enfermedad. Estas incluyen Rottweiler, Doberman Pinscher, Pit Bull Terrier, Cobrador de Labrador negro, Pastor Alemán, Springer Spaniel y Yorkshire Terrier.^{15,16} Las razas que presentan menor predisposición a la enfermedad son Cocker Spaniel y Poodle. Algunos factores como la edad del animal, estrés, raza e infecciones parasitarias y/o bacterianas predisponen a la presentación de la enfermedad.¹⁶

TRANSMISIÓN

La transmisión directa ocurre vía fecal-oral. La transmisión indirecta por vía oral a través de objetos contaminados con heces. Personas y fomites también contribuyen a la dispersión del virus. Las infecciones experimentales han sido producidas por varias rutas: oral, intranasal y subcutánea.²⁷

PATOGENIA

La infección por PVC-2 es a través de una exposición oronasal con heces contaminadas, teniendo un período de incubación de 3 a 5 días.^{15,30} Primero el virus se replica en el tejido linfoide de la orofaringe, posteriormente, por vía linfática, llega a linfonodos mesentéricos y timo. Una vez en estado de viremia llega a criptas intestinales; después de uno a cinco días de la entrada del virus

se disemina a los epitelios como el oral, esofágico e intestinal; y tejidos como el miocardio y médula ósea, donde los últimos tres son los más afectados. El PVC-2 se replica en el epitelio germinal de las criptas intestinales que están en constante división celular, lo que provoca la necrosis de éste con la consecuente atrofia y fusión de vellosidades, manifestándose los signos clínicos de enteritis. Dado que el virus se replica en el aparato digestivo es eliminado en las heces entre el tercer y cuarto día postinfección, antes de que se presenten los signos clínicos, manteniéndose constante la cantidad de partículas virales que es aproximadamente 1×10^{12} partículas por gramo de heces, en un lapso de 7 a 14 días en promedio.³⁰ (Figura 1).

En la médula ósea provoca una linfopenia relativa, no una panleucopenia. El número de linfocitos disminuye pero hay un leve efecto sobre el número de eosinófilos, basófilos, monocitos y eritrocitos.²⁴

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 replicación viral dando como resultado una miocarditis.³⁰

En fetos o recién nacidos, la infección es generalizada, donde varios órganos tienen una división celular considerable, en animales adultos solo se afectan pocos tejidos. En todas las edades, la continua división celular del tejido linfoide y del epitelio intestinal, da como resultado una leucopenia y enteritis.²⁰ La muerte puede ocurrir a causa de deshidratación, desequilibrio electrolítico, choque endotóxico o septicemia secundaria.³⁸

SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos son inespecíficos como pirexia, depresión y anorexia. En las primeras 24-48 horas hay vómito y diarrea profusa fétida, con frecuencia sanguinolenta, seguida de marcada deshidratación rápidamente progresiva, recuperación lenta o muerte entre las 24 y 72 horas.^{32, 39,40} Puede desarrollarse hipotermia, ictericia, diatesis hemorrágica, coagulación intravascular diseminada, disnea y arritmias.^{15,16}

La enfermedad intestinal es más severa en cachorros que tienen parásitos gastrointestinales, estrés ambiental, títulos de anticuerpos maternos bajos y respuesta inmune humoral retardada. Los perros levemente afectados se recuperan en uno o dos días, los gravemente afectados requieren terapia de mantenimiento y la mayoría se recupera después de 3 a 5 días.²⁷

Cuando el vómito se presenta en forma de proyectil y hay diarrea hemorrágica grave, el pronóstico es poco favorable y mueren a pesar de la terapia de soporte. Algunos perros mueren en forma aguda dentro de las primeras 24 horas de haber presentado los signos. La enfermedad fatal aguda es más común en cachorros, muchos de los cuales presentan miocarditis si se infectan antes de las 8 semanas de edad.^{16, 26}

LESIONES MACROSCÓPICAS

A la necropsia los cambios más significativos se observan en tracto digestivo. La serosa del estómago puede presentar petequias y equimosis. Hay ausencia de contenido gástrico o puede presentarse líquido claro espumoso amarillo o gris y la mucosa está congestionada.^{26, 29, 32,39, 41, 42, 43, 44,45}

A nivel de intestino delgado las lesiones se localizan principalmente en duodeno y yeyuno disminuyendo progresivamente hasta llegar al recto, donde no se ven cambios. Las principales alteraciones intestinales son: distensión por gas en porciones, la serosa puede presentar un aspecto granular por la presencia de fibrina, así como congestión y hemorragia. El contenido varía desde pastoso amarillo grisáceo hasta líquido sanguinolento. La pared del duodeno y yeyuno está engrosada y edematosa, la mucosa en ocasiones es de color rojo oscuro a brillante, de consistencia friable con úlceras redondas y lineales cubierta por parches de fibrina. En algunos casos se presenta intususcepción del ileon con presencia de zonas necróticas y evidencia de las placas linfoides.^{26, 29, 32,39, 41-45}

En intestino grueso se puede observar congestión, hemorragias y edema de la pared; además las heces suelen ser pastosas mezcladas con sangre. El ano, la mayoría de las veces, se presenta manchado con sangre o heces pastosas sanguinolentas.^{26, 29, 32, 39, 41, 42, 43, 44,45}

Los linfonodos mesentéricos se aprecian aumentados de tamaño, alargados, congestionados con edema, hemorragias corticales y necrosis medular.^{26, 29, 32, 39, 41-45}

El corazón se puede apreciar con petequias y equimosis en el surco coronario, algunas veces con dilatación de ventrículo derecho e izquierdo y con hidropericardio. El epicardio puede presentar un puntilleo blanco multifocal o bandas bien definidas, el endocardio presenta petequias.^{26, 29, 32, 39, 41-45}

El hígado se observa aumentado de tamaño, congestionado y friable. Los pulmones presentan congestión y edema. La médula ósea de huesos largos se aprecia hemorrágica y de color rojo oscuro. ^{26, 29, 32, 39, 41-45}

LESIONES MICROSCÓPICAS

Los cambios histopatológicos en intestino delgado consisten en exfoliación de la mucosa con pérdida de vellosidades. Las criptas intestinales exhiben necrosis de células epiteliales y detritus celulares en su luz, en ocasiones se pueden observar cuerpos de inclusión intranucleares basofílicos y/o anfofílicos; también se aprecian células de regeneración o proclásticas e hiperplasia de células caliciformes. La lámina propia está distendida por edema e infiltrado de células mononucleares. La submucosa puede estar congestionada, edematosa y con hemorragias en algunos casos. La capa muscular presenta dilatación de las fibras musculares. La serosa se observa edematosa, hemorrágica y con infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos y neutrófilos. ^{26, 29, 32, 35, 41-43, 46-48}

Se puede presentar edema, atrofia y necrosis de placas de Peyer, linfonodos, bazo y timo. ^{26, 27, 29, 32, 39, 41- 43 46- 48}

El corazón se puede observar con miocarditis intersticial, edema, hemorragias subepicárdicas y en algunos casos cuerpos de inclusión intranucleares en cardiomiocitos. ^{18, 26, 27, 29, 32, 39, 41- 43 46- 48}

A nivel hepático hay una congestión centrolobulillar, disociación de cordones hepáticos, edema, hemorragias e infiltrado por polimorfonucleares. La médula ósea presenta atrofia al igual que el páncreas. ^{26, 29, 32, 39, 41- 43 46- 48}

El pulmón se aprecia con edema, congestión, fibrina e infiltrado inflamatorio compuesto por polimorfonucleares.^{26, 29, 32, 39, 41- 43 46- 48}

INMUNIZACIÓN

Aunque la diseminación de la vacunación contra el parvovirus ha reducido en forma marcada la presencia de la enfermedad en Norteamérica, la enteritis por parvovirus continúa siendo un problema en cachorros conforme se acercan al final de la protección de los anticuerpos maternos, entre las 6 y 20 semanas de edad. Esto es a pesar de la vacunación debido al período de susceptibilidad cuando los anticuerpos maternos son demasiado bajos para proteger, pero al mismo tiempo lo suficientemente elevados para interferir con la respuesta a la vacunación. En cachorros de hembras con altos títulos de PVC, los anticuerpos derivados de la madre pueden persistir a niveles de interferencia hasta por 18 semanas, por lo tanto, la vacunación tal vez no sea capaz de sobrepasar esta interferencia de los anticuerpos maternos sino hasta después de las 18 semanas de edad.^{15, 24, 27}

Casi todas las aparentes "fallas de vacunación" en cachorros quizá sean resultado de exposición a la infección durante este periodo crítico de susceptibilidad.^{15, 24}

A pesar de que solamente se requieren de 1 a 2 dosis vacunales para inmunizar a los cachorros, los protocolos de vacunación recomiendan administrar vacunas polivalentes cada 2 a 3 semanas desde las 6 hasta las 18 semanas edad y posteriormente aplicarla anualmente.²⁷

DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES

Los parvovirus, coronavirus, rotavirus y posiblemente los astrovirus se han establecido como causa de enteritis viral y diarrea en perros. Muchos otros virus de enteropatogenicidad incierta se han descubierto en las heces de caninos por aislamiento viral o microscopia electrónica (ME) como herpesvirus, enterovirus, calicivirus, virus de la parainfluenza, adenovirus y picornavirus.¹⁵ El virus del distemper canino y el adenovirus tipo 1 producen diarrea y vómito en algunos perros, pero se asocian principalmente otras manifestaciones clínicas. El rotavirus canino causa diarreas en cachorros recién nacidos, pero no se asocia a cuadros entéricos en perros adultos.¹⁶

DIAGNÓSTICO

Se sospecha de infección por parvovirus en perros jóvenes cuando tienen presentación aguda de vómito y diarrea, especialmente asociada a depresión notable, fiebre o leucopenia o si estos signos siguen a una posible exposición a perros o fomites infectados.¹⁵

En México, el diagnóstico de PVC-2 se realiza principalmente por histopatología, ELISA y hemoaglutinación-inhibición de la hemoaglutinación (HA-IHA).³⁰

Las técnicas diagnósticas que se pueden emplear son:

1. HEMATOLOGÍA

La biometría hemática completa es particularmente útil debido a que la mayor parte de los perros con enteritis por parvovirus desarrollan leucopenia intensa por linfopenia y granulocitopenia, con una cuenta total de $0.5-2 \times 10^9/L$ y en ocasiones menos. La depleción de los neutrófilos maduros circulantes es

causada por pérdida extensa de neutrófilos a través de la mucosa intestinal dañada además de la mielopoyesis alterada debida a la lesión de médula ósea por el virus. La gravedad de la leucopenia, por lo general, es proporcional a la enfermedad clínica y una neutrofilia de rebote es indicador útil del inicio de la recuperación.¹⁵

El hematocrito es variable; a menudo es normal, pero puede estar moderadamente disminuido en algunos perros debido a la hemorragia intestinal o por hemodilución, en tanto que en otros perros puede estar elevado debido a la deshidratación (hemoconcentración).¹⁵

2. RADIOGRAFÍA ABDOMINAL

La distensión de asas intestinales con gas y líquidos son datos radiográficos frecuentes en la enteritis y deben ser diferenciados de obstrucción del intestino delgado. Se debe palpar con cuidado el abdomen para descartar la obstrucción mecánica. Las radiografías con contraste de bario a menudo revelan irregularidades en la mucosa y tiempo de tránsito prolongado.¹⁵

3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA (ME)

Si se cuenta con el equipo adecuado se puede realizar el diagnóstico utilizando material fecal de casos con signos típicos de la enfermedad, el diagnóstico es directo ya que es evidente la partícula viral. Es un método poco empleado, costoso y tardado.²⁴

4. AISLAMIENTO VIRAL

Se lleva a cabo en varias líneas celulares de origen felino y canino tales como células de riñón, pero este método es poco utilizado dado que se requieren

realizar cultivos celulares y esperar al menos 1 semana para obtener el resultado.²⁴

5. HEMOAGLUTINACIÓN-INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

La prueba de la hemoaglutinación -inhibición de la hemoaglutinación fecal (HA-HI) es un método simple y rápido para detectar el virus en materia fecal y en muestras de tejidos, ya que se aprovecha la característica del PVC de aglutinar glóbulos rojos de cerdo. La HA tiene una especificidad del 63-89% y una sensibilidad del 87%, es menos sensible que la ME o la prueba de inmuno ensayo ligado a enzimas (ELISA).^{24, 30}

6. SEROLOGÍA

La determinación de anticuerpos anti-PVC en suero no es suficiente para el diagnóstico, porque cerca del 95% de los perros en la población han tenido seroconversión por vacunación o exposición previa. El análisis de IgM específica por examen de anticuerpos fluorescentes indirectos (FIA) proporciona datos serológicos de infección reciente, ya que la IgM solo se encuentra en las primeras semanas después de la infección.^{15, 49}

7. INMUNOENSAYO LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

Es el método más práctico para descubrir la presencia de parvovirus en las heces. Los resultados positivos son un indicador confiable de excreción fecal activa del PVC-2. En ocasiones ocurren resultados falsos negativos.¹⁵ En general, alrededor de 10^3 partículas por gramo de heces pueden ser detectadas por la prueba de ELISA; esta prueba tiene una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98%.²⁴

8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Esta técnica consiste en la amplificación de un fragmento de ADN específico del virus a través del uso de iniciadores que se unen a su secuencia complementaria y son amplificadas por la Taq polimerasa. Para que se lleve a cabo la síntesis de la cadena de ADN se utilizan tres temperaturas: desnaturalización (94 °C), alineación (55-65 °C) y extensión (72 °C). Los análisis de PCR son altamente específicos y pueden distinguir el virus natural del virus vacunal, eliminando los resultados falso-positivos debido a la vacunación reciente. Esta técnica tiene una especificidad de 100% y una sensibilidad del 50%.³⁰

9. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

La inmunohistoquímica juega un papel importante en el diagnóstico histopatológico de diversas enfermedades. El desarrollo de anticuerpos para epítomos resistentes a la fijación de tejidos y la disponibilidad de un sistema de detección altamente sensible hacen de la inmunohistoquímica una herramienta práctica para la patología.⁵⁰

La técnica de inmunohistoquímica emplea tejidos fijados e incluidos en parafina, que da una reacción cuyos resultados pueden observarse con un microscopio fotónico. El anticuerpo se marca con la enzima peroxidasa y se hace aparente al tratarse con H₂O₂ y diaminobenzidina (DAB), produciendo una coloración café tabaco que aparece en los sitios de reacción.⁵⁰

El método estreptoavidina-biotina-peroxidasa está basado en la afinidad de la proteína estreptoavidina hacia la vitamina biotina. Se utilizan 3 reactivos:

anticuerpo primario, anticuerpo secundario biotinilado y la peroxidasa conjugada a la avidina o estreptoavidina.⁵¹

Algunos estudios en los que se ha utilizado un anticuerpo policlonal contra el PVC-2 hecho en conejo a una dilución de 1/400 μ L se encontró el 90% de los casos positivos y demostraron que la inmunopositividad en intestino delgado se localiza en células epiteliales de las criptas, así como en células necróticas que se encuentran en el lumen de las mismas. También se demostró el antígeno viral en linfocitos y macrófagos de la lámina propia, células endoteliales de los capilares y en linfocitos del tejido linfoide asociado, la positividad se apreció tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células. La reacción positiva más intensa se encontró en células mononucleares de la lámina propia y en células necróticas de las criptas, así mismo, la reacción más débil se apreció en el tejido linfoide asociado.⁵²

En el año de 1994 Ku *et al.*, demostraron que el 94.6% de los casos diagnosticados como PVC-2 por histopatología fueron positivos por inmunohistoquímica (complejo avidina-biotina-peroxidasa) en el cual se utilizó un anticuerpo monoclonal de origen murino.⁵³

IMPORTANCIA

En México, a partir de los brotes de enteritis hemorrágicas causantes de una alta morbilidad y mortalidad en cachorros, se han realizado distintos estudios para establecer la presencia del PVC-2, observándose en ocasiones partículas virales,³³ lesiones macro y microscópicas sugerentes a esta entidad,^{26,35} además de darse a conocer la existencia de títulos altos de anticuerpos identificados por inhibición de la hemoaglutinación,³⁶ hasta que en el año 2003 se pudieron realizar cinco aislamientos de PVC-2.³⁰

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico de las enteritis virales en patología se basa en la morfología pura de las lesiones a nivel de microscopía de luz; sin embargo, este no es específico para el diagnóstico de la entidad. Ante la necesidad de otros métodos que dieran mayor seguridad en el diagnóstico, se plantea el uso de la inmunohistoquímica para la identificación del PVC-2 en perros con lesiones intestinales sugerentes a este virus.

HIPÓTESIS

La mayoría de los cuadros gastroentéricos en perros diagnosticados por histopatología sugerentes a PVC-2 serán positivos por la técnica de inmunohistoquímica.

OBJETIVO GENERAL

Aplicar la técnica de inmunohistoquímica para llevar a cabo el diagnóstico de PVC-2, en muestras de intestinos obtenidos en necropsias de perros con lesiones sugerentes a esta enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las lesiones microscópicas más características del PVC-2 en perros remitidos para diagnóstico al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.
2. Estandarizar la técnica de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal en intestinos de perros con lesiones microscópicas sugerentes a PVC-2.
3. Aplicar la técnica de inmunohistoquímica para llevar a cabo el diagnóstico de PVC-2 en perros con enteritis compatibles con este virus.
4. Realizar la evaluación inmunohistoquímica en intestinos de perros con lesiones sugerentes a PVC-2 basándose en grados de inmunopositividad y localización de la misma.

5. Realizar un estudio retrospectivo para conocer las razas, género y edades de perros que con mayor frecuencia presentan lesiones sugerentes a PVC-2 y la época del año con mayor presentación de la enfermedad en el período 1998-2003.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo corresponde a un estudio descriptivo, retrospectivo y prospectivo, longitudinal y experimental, se utilizaron casos pertenecientes al acervo del servicio de diagnóstico del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

I. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para el estudio inmunohistoquímico, se seleccionaron un total de 30 casos de necropsias de perros menores de 1 año de edad con tejido intestinal en buen estado de conservación, con lesiones intestinales y diagnóstico sugerentes a PVC-2, tomadas de los años 2002 al 2004.

II. TOMA DE MUESTRAS

Los casos de los años 2002 y 2003 se encontraban incluidos en bloques de parafina. Para los casos correspondientes al año 2004, las secciones de intestino delgado se fijaron durante 24 horas en formalina neutra (pH 7.0-7.6) al 10% y para obtener los bloques, posteriormente fueron procesadas por el método habitual de inclusión en parafina.⁵⁴

III. EVALUACIÓN DE LESIONES MICROSCÓPICAS

Una vez que los 30 casos se encontraron incluidos en bloques de parafina, se realizó un corte de 5 μm y posteriormente fueron teñidos con la tinción de rutina de hematoxilina-eosina ⁵³ para su observación microscópica.

Las lesiones intestinales se evaluaron en las 4 capas histológicas de la siguiente forma:

a) MUCOSA: Atrofia de vellosidades, fusión de vellosidades, necrosis superficial, dilatación de criptas, necrosis de criptas, hiperplasia de criptas, presencia de células de regeneración o proclásticas, cuerpos de inclusión intranucleares en epitelio de criptas, hiperplasia de células caliciformes, infiltrado inflamatorio no supurativo, infiltrado inflamatorio supurativo, infiltrado inflamatorio mixto, congestión, hemorragias, edema, presencia de colonias bacterianas y tejido de reparación.

b) SUBMUCOSA: Congestión, edema, hemorragias, presencia de tejido de reparación, infiltrado inflamatorio y atrofia linfoide.

c) MUSCULAR: Edema, congestión, hemorragias e infiltrado inflamatorio.

d) SEROSA: Edema, congestión, hemorragias, fibrina e infiltrado inflamatorio.

Según el grado de la lesión, se clasificaron de la siguiente manera:

a) LEVE: Aquella lesión que abarca un tercio del tejido.

b) MODERADO: Cuando la lesión induce dos tercios del tejido.

c) GRAVE: Donde la lesión compromete la totalidad del tejido.

En el caso de la atrofia de vellosidades en grado leve se empleó cuando ésta solo se presentaba en la punta de las vellosidades y el grado grave cuando la atrofia abarcaba hasta las criptas.

IV. MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO^{55, 56}

Para lograr la identificación del antígeno viral se realizó la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica estreptoavidina-biotina-peroxidasa.

Anticuerpo primario

Se utilizó un anticuerpo monoclonal de origen murino **Anti-parvovirus canino*** a una dilución de 1/300, el cual cruza antigénicamente con el virus de la enteritis del mink y el virus de la panleucopenia felina.

Anticuerpo secundario

Se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón** de origen caprino marcado con biotina, aplicando 50 µL sobre el tejido.

Tejidos Utilizados Como Testigos

a) Testigo Positivo: Se utilizó una sección de intestino delgado el cual fue positivo para este virus a través de la técnica de inmunohistoquímica. Este testigo fue donado por la Universidad de la Isla del Príncipe Eduardo, Canadá, aplicando la misma marca del anticuerpo que en este estudio.

b) Testigos Negativos: Se utilizaron 2 testigos negativos, el primero corresponde a una sección del tejido donado previamente al cual se le cambió el anticuerpo primario por PBS (Figura 2), para el segundo, se utilizó una sección de intestino delgado de un perro sin lesiones de PVC-2 al cual se le aplicó anticuerpo primario (Figura 3).

* Biodesign Internacional, No. Catálogo: C86004M
60 Industrial Park Road Saco, Maine USA 04072

** Zymed Laboratories Inc.
561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 USA

MÉTODO ESTREPTOAVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASA

1. Preparación de los Tejidos

De las muestras de intestino delgado incluidas en parafina, se realizó un corte de 5 μm de grosor. Los cortes histológicos se montaron en portaobjetos tratados previamente con la solución adhesiva Poli-L-Lysina^Ω al 1% para evitar el desprendimiento de las secciones durante el proceso. Las secciones se desparafinaron en una estufa a 60 °C por 2 horas. Posteriormente los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, realizando 2 lavados de 20 minutos cada uno y después en acetona realizando dos lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones: 100%, 96%, 80% y 50%, realizando 2 lavados de 5 minutos cada uno, por cada concentración de alcohol y finalmente se sumergieron en agua destilada realizando 3 lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

2. Inhibición de la Peroxidasa Endógena

Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones de los órganos se trataron con peróxido de hidrógeno y metanol absoluto en una relación 1:8 realizando dos incubaciones de 30 minutos cada una. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguada de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, realizando 3 lavados de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente.

^Ω Sigma Chemical Company.
P.O. Box 14508. St. Louis Missouri, USA 63178-0016

3. Recuperación de Antígenos

Para la recuperación de antígenos, los tejidos sumergidos en PBS se sometieron a tratamiento físico (calor) en un horno de microondas convencional marca Sanyo, modelo EMA-108s, a nivel medio por 4 minutos. Inmediatamente se cambió el PBS caliente por PBS frío para detener la reacción de recuperación.

4. Bloqueo de Avidina y Biotina Endógenas

Para bloquear la avidina y biotina endógenas de los tejidos, se utilizó un bloqueador de tipo comercial con dos soluciones*. La primera solución estuvo dirigida en contra de la avidina y consistió en aplicar 2 gotas (50 μ L/gota) de solución de avidina sobre los tejidos, incubando por 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C) y después se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno. La segunda solución dirigida en contra de la biotina se aplicó 2 gotas de solución de biotina incubando por 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

5. Bloqueo de Antígenos

Para bloquear la adherencia no específica a proteínas por parte del anticuerpo secundario, se utilizó suero de cabra no inmune[‡], aplicando 2 gotas (50 μ L/gota) sobre los tejidos, dejándolos incubar por 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

* Endogenous Avidin/Biotin Blocking Kit. Zymed Laboratories Inc.
561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 USA

‡ Zymed Laboratories Inc.
561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080 USA

6. Aplicación de Anticuerpos Primarios

Se procedió a la aplicación del anticuerpo primario, diluido en PBS a una dilución de 1/300 μL , homogeneizado con vórtex.* Del anticuerpo primario, se aplicaron 2 gotas en cada laminilla, dejándolos incubar aproximadamente 12 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para el primer testigo negativo se sustituyó el anticuerpo primario por PBS y para el segundo se aplicó el anticuerpo primario con la misma dilución, posterior a la incubación, los tejidos fueron sometidos a tres lavados con PBS por 5 minutos cada uno.

7. Aplicación de Anticuerpos Secundarios

Se aplicó el anticuerpo secundario anti-ratón de origen caprino marcado con biotina. Se aplicaron 2 gotas a cada tejido y se incubaron por 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

8. Aplicación de la Estreptoavidina

Se aplicaron 2 gotas a cada tejido y se dejó actuar durante 30 minutos en cámara húmeda y se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

9. Aplicación del Cromógeno

Para la preparación del cromógeno se agregó una gota de cada uno de los reactivos incluidos en el kit comercial* (sustrato de buffer concentrado, el

* Vortex Thermolyne Modelo No. M16715, Serie No. 268
2555 Kerper Boulevard, Dubuque Iowa 52001 USA

* Zymed Laboratorios Inc.
561 Ecdes Avenue, South San Francisco, CA 94080 USA

cromógeno diaminobenzidina y 0.6% de peróxido de hidrógeno), a 1 mL de agua destilada homogeneizados con vórtex. A cada laminilla se aplicaron 50 μ L, dando el siguiente tiempo de revelado: 3-6 minutos dependiendo de la temperatura ambiente. Enseguida se realizó un lavado suave con agua destilada sobre cada laminilla para detener la reacción del revelado e inmediatamente se sumergieron nuevamente en agua destilada. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Meyer, aplicando 2 gotas en cada muestra reposando por 4 minutos y después se les dio un lavado en agua destilada por 5 minutos. Posteriormente las laminillas se sumergieron en PBS por 30 segundos obteniéndose una contratinción azul tenue sobre el tejido y se regresaron al agua destilada.

Finalmente, a las laminillas se les aplicaron cubreobjetos sellándolas con resina. Una reacción positiva se determinó al observar gránulos intracelulares teñidos de un color rojo.

V. ANALISIS DE RESULTADOS

Se realizó la evaluación de la inmunopositividad de la mucosa de cada caso a través de la visualización de 10 campos aleatorios utilizando el objetivo de 40X, para esto se utilizó el programa Motik Images Advanced 3.1 para Windows. La positividad se clasificó en tres grados de acuerdo a la intensidad de la reacción. (Apéndice 1) (Figuras 4-6).

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete JMP 5.1 (SAS Institute Inc.), empleándose estadística descriptiva, tablas de contingencia y análisis de

sensibilidad y especificidad para técnicas de diagnóstico por el método de Galen.⁵⁷

VI. ESTUDIO RETROSPECTIVO

A partir de los archivos de estudio *post-mortem* en el período comprendido entre los años 1998-2003 del Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM entre 1998-2003, se determinó el total de perros con diagnóstico sugerente a PVC-2; los datos de los perros afectados fueron analizados de acuerdo a la raza, género y edad. Por otro lado, se determinó la estación del año en donde hay mayor cantidad de perros afectados. Los resultados obtenidos se presentan en cuadros de frecuencias.

RESULTADOS

I. SELECCIÓN DE CASOS

Como producto del estudio retrospectivo y prospectivo, que se realizó de los casos sospechosos a PVC-2, se seleccionaron 30 casos con lesiones histomorfológicas compatibles con PVC-2 que se sometieron a la técnica de inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa, encontrándose que el 76.67% (23 casos) presentaron inmunopositividad de grado variable. Los datos de los perros positivos a PVC-2 se muestran en el cuadro 2.

II. RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

En la evaluación de las lesiones histopatológicas de los 23 casos inmunopositivos a PVC-2, las lesiones que se presentaron con mayor frecuencia en la mucosa intestinal fueron: Necrosis de criptas, infiltrado inflamatorio no supurativo, atrofia de vellosidades y fusión de vellosidades, con 95.65% cada uno (22 casos c/u), y células de regeneración en el 73.91% (17 casos). En la submucosa se observó edema en un 82.61% (19 casos), congestión en un 69.57% (16 casos), infiltrado inflamatorio no supurativo y atrofia linfoide con el 39.13% cada uno (9 casos). En la capa muscular la lesión más frecuente fue edema con el 82.61% (19 casos), congestión con 30.43% (16 casos), infiltrado inflamatorio con 17.39% (4 casos) y hemorragia con 13.04% (3 casos). Por último, en la serosa la lesión con mayor presentación fue edema con 56.52% (13 casos), infiltrado inflamatorio 30.43% (7 casos), congestión con 26.09% (6 casos), presencia de fibrina 21.74% (5 casos) y hemorragia con 8.70% (2 casos). (Cuadro 3).

III. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los 23 casos inmunopositivos a esta técnica, presentaron inmunopositividad de grado variable, observándose principalmente en células epiteliales de criptas intestinales, células de regeneración, células necróticas y células inflamatorias mononucleares en la lámina propia. (Figuras 7-10).

La distribución de la inmunopositividad observada por IHQ de los 23 casos positivos a PVC-2 fue principalmente en células necróticas 91.30% (21 casos), células inflamatorias mononucleares 86.96% (20 casos), células de regeneración 78.26% (18 casos) y células epiteliales con el 73.91% (17 casos) (Cuadro 4).

La presencia de células de regeneración en las criptas intestinales que se observan en la mucosa intestinal es un buen indicador de la presencia del PVC-2, teniendo una sensibilidad del 79% y una especificidad del 33%.

Las lesiones asociadas a PVC-2 que mostraron baja sensibilidad y especificidad fueron: dilatación de criptas, hiperplasia de criptas, cuerpos de inclusión intranucleares, hiperplasia de células caliciformes, infiltrado inflamatorio supurativo, hemorragia, edema y presencia de colonias bacterianas.

La estadística descriptiva de las lesiones microscópicas de las cuatro capas intestinales y para la prueba de inmunohistoquímica se resumen en el (apéndice 2).

Se observó que las hembras fueron las más afectadas con el 65.22% (15 casos), el 100% de los casos corresponden a perros menores a seis meses de edad y la estación con mayor presentación fue el invierno con el 52.17% (12

casos), mientras que solamente el 4.35% (1 caso) se presentó en primavera. Las razas que presentaron mayor positividad a PVC-2 fueron Poodle y Schnauzer miniatura con el 17.39% cada uno (4 casos c/u), Pastor Alemán, Yorkshire Terrier y criollos con 8.70% cada uno (2 casos c/u), el resto de las razas que aparecieron en este estudio, solamente se presentaron en un 4.35% cada uno (1 caso c/u).

IV. ESTUDIO RETROSPECTIVO

En el presente estudio, se observó que en el período comprendido entre el 1 de enero de 1998 al 31 de diciembre del 2003, se recibieron un total de 2505 casos (100%) para su estudio *post-mortem* en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, de los cuales el 66.03% (1654 casos) correspondieron a perros y el 33.97% (851 casos) a otras especies. (Figura 11).

Del total de perros, el 11.49% (190 casos) presentaron lesiones microscópicas intestinales sugerentes a PVC-2 y en el 88.51% (1464 casos), la mortalidad se asoció a diversas patologías. (Figura 12).

En el año 2002 se observó la mayor cantidad de casos sugerentes a PVC-2 con 22.63% (43 casos) y en el año 1999 se presentó el menor número de casos 7.37% (14 casos). (Figura 13).

Con respecto al género, 55.26% (105 casos) correspondieron a hembras, 41.58% (79 casos) correspondieron a machos, y 3.16% (6 casos) no fueron especificados. (Figura 14).

De acuerdo a la edad de los perros con lesiones sugerentes a PVC-2 se presentó un mayor número en animales de 1 día a 2 meses de edad con

56.32% (107 casos). Los grupos de 9 a 10, de 11 a 12 meses y no especificados solo presentan 2 casos cada uno (1.05%). (Figura 15).

Por otro lado, en lo que corresponde a la estación del año, en otoño se presentó el mayor número de casos con 28.95% (55 casos) y en verano el menor número 19.47% (37 casos). (Figura 16).

En cuanto a la frecuencia de razas encontradas en perros con lesiones sugerentes a PVC-2 fueron: Rottweiler con 12.11% (23 casos), Poodle con 8.95% (17 casos), Chihuahueño y Basset Hound con 8.42% cada uno (16 casos c/u), Schnauzer miniatura con 6.32% (12 casos), Pastor Alemán con 5.26% (10 casos), Cobrador de Labrador con 4.74% (9 casos), Criollo con 3.68% (7 casos), Cocker Spaniel y Schnauzer estándar con 3.16% c/u (6 casos c/u), mientras que otras razas se presentaron con menos del 2.63% cada una (5 casos o menos c/u). (Apéndice 3)

DISCUSIÓN

En el intestino delgado las células epiteliales de las criptas maduran y migran del epitelio germinal a las puntas de las vellosidades (por lo general entre uno a tres días). Al llegar a estas últimas, las células epiteliales adquieren su capacidad de absorción y ayudan en la asimilación de nutrientes. El PVC-2 infecta el epitelio germinal de las criptas intestinales y origina la destrucción y colapso del epitelio. Como resultado, se acortan las vellosidades y se deteriora el recambio normal de células.^{19,29}

Las lesiones histopatológicas en intestinos de perros positivos a PVC-2 por inmunohistoquímica que se presentaron con mayor frecuencia en la mucosa fueron necrosis de criptas, presencia de células de regeneración, infiltrado inflamatorio mononuclear, atrofia y fusión de vellosidades, estas lesiones concuerdan con otros autores, los cuales refieren que dichas lesiones se presentan tanto en infecciones naturales en cachorros que presentaron diarrea hemorrágica, como en infecciones experimentales donde se utilizaron cachorros Beagle de 9 semanas de edad infectados por vía oral e intravenosa por PVC-2.^{39, 44, 46}

Cooper *et al.*, han informado la presencia de exudado purulento en el lumen intestinal. En este trabajo únicamente se encontraron 2 casos con presencia de escasos neutrófilos, que fueron asociados a infecciones bacterianas secundarias que causan complicaciones adicionales relacionadas con el daño intestinal.^{1,19}

A pesar de que existen varios informes de la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos en células descamadas de las criptas intestinales; en el presente estudio no se observaron en ningún caso.^{1, 32}

Se observó que la atrofia linfóide es la lesión que predomina en la submucosa, lo cual concuerda a lo descrito por Meunier.⁵⁸ Las lesiones en la capa muscular y serosa suelen ser mínimas e incluso pocas veces se han llegado a informar, sin embargo pueden destacar la congestión, edema y para el caso de la serosa presencia de fibrina, esto se debe a los cambios vasculares que se presentan durante la enfermedad.³²

De acuerdo a los resultados del estudio inmunohistoquímico, el 76.67% de los casos fueron positivos a esta técnica, este porcentaje es menor a los estudios realizados por Ku *et al.* y Svava *et al.*^{52,53} En 1994, Ku *et al.* realizaron en el Departamento de Patología de la Universidad Nacional de Seúl, un estudio retrospectivo del archivo de diagnóstico en donde se incluyeron 97 casos de cachorros con diagnóstico histopatológico sugerente a PVC-2, se les realizó la técnica de inmunohistoquímica aplicando el método estreptoavidina-biotina-peroxidasa, utilizando un anticuerpo monoclonal de origen murino; el 94% de los casos fueron positivos a esta técnica.⁵³ En estudios más recientes, Svava *et al.*, aplicaron a 20 perros con diagnóstico clínico e histopatológico de parvovirus canino tipo 2 la técnica de inmunohistoquímica a secciones de intestino y otros órganos utilizando el complejo estreptoavidina-biotina-peroxidasa con un anticuerpo policlonal; la positividad se detectó en el 95% de los casos en intestino delgado y en el 88.24% en varios órganos como hígado, riñón, bazo,

timo, linfonodos y pulmón, no se encontró en corazón.⁵² Las estructuras histológicas en donde se encontró la mayor cantidad de antígeno PVC-2 fueron: células epiteliales y necróticas de criptas intestinales, placas linfoides y células inflamatorias mononucleares en lámina propia, tanto en núcleo como citoplasma, en donde las células mononucleares y necróticas presentaron el mayor porcentaje de positividad.⁵² En este estudio las células necróticas y células inflamatorias mononucleares presentan mayor número de casos positivos, lo cual concuerda con Svava *et al.*, mientras que en las células epiteliales fue mínima, no existen informes sobre la positividad que se presenta en las células de regeneración.

En el presente estudio, se pudo observar que la localización del antígeno coincide con las lesiones histopatológicas, la positividad intensa se localiza en tejidos con lesiones histopatológicas mínimas y la más débil en tejidos con mayor grado de lesión, esto coincide con los estudios realizados por otros autores en donde se emplearon cachorros de entre 8 y 14 semanas de edad los cuales fueron inoculados por vía oral con PVC-2 de origen fecal.⁵⁸

En 1985, Carman *et al.* localizaron al antígeno utilizando un anticuerpo monoclonal con el método peroxidasa-antiperoxidasa en distintos órganos como timo, bazo, tonsilas, linfonodos, siendo más evidente en placas de Peyer y criptas intestinales adyacentes a las placas linfoides, así como cuerpos de inclusión intranucleares en intestino grueso.^{59, 60}

En el estudio estadístico las células de regeneración demostraron ser un indicador de la presencia del PVC-2. Autores como Miura *et al.*, mencionan que

la presencia de estas células son características en la infección por PVC-2, al igual que la necrosis de criptas intestinales y la presencia de cuerpos de inclusión,⁴⁶ estas últimas dos lesiones no fueron significativas en este estudio, sin embargo, las lesiones inespecíficas para asociar este virus son: hiperplasia de criptas, hiperplasia de células caliciformes, infiltrado inflamatorio supurativo, hemorragia, edema y colonias bacterianas, considerando que estas lesiones se pueden presentar en otras patologías digestivas.²¹ Actualmente, no hay ningún estudio con un análisis estadístico de las lesiones histológicas asociadas a PVC-2 por lo que el presente trabajo es el primero en su tipo.

Los casos negativos a PVC-2 por IHQ y con lesiones histopatológicas compatibles, pudiera sugerir la participación de otros agentes etiológicos que causan lesiones similares como pueden ser los coronavirus.⁴⁴ En estudios realizados por Turk *et al.* se demostró que tanto el rotavirus como el coronavirus canino en asociación con *Clostridium perfringens* son capaces de provocar necrosis de criptas intestinales, estos virus fueron detectados por la prueba de inmunofluorescencia; sin embargo, en México no existen informes con respecto a estos agentes.⁶¹

De acuerdo a las razas que presentan mayor predisposición a la enfermedad se observa que la raza Poodle es la más afectada a pesar que difiere con otros estudios, esto puede deberse a la popularidad de la raza en México. Más del 50% de los perros afectados fueron hembras y la época con mayor presentación fue el invierno, lo cual difiere con otros autores en donde la enfermedad se presentó principalmente en otoño y primavera.^{62, 63, 64}

En el presente estudio las razas más afectadas con lesiones sugerentes a PVC-2 fueron el Rottweiler, Poodle y Chihuahueño. En estudios realizados en Estados Unidos donde se confirmó el diagnóstico de PVC-2 por hemoaglutinación y/o ELISA algunos autores señalan que, la raza Rottweiler es la más afectada al igual que el Doberman Pinscher.^{27, 62, 63, 65} En México, en el período 1998-2003 no se informó ningún caso de enteritis hemorrágica sugerente a PVC-2 en el Doberman Pinscher, probablemente se debe a que esta raza es más popular en Estados Unidos que en México, sin embargo, en un estudio retrospectivo realizado en el Departamento de Patología de la FMVZ-UNAM en el período de 1987-1997, de casos sugerentes a PVC-2 el Rottweiler resultó ser nuevamente la raza más afectada y el Doberman Pinscher ocupó el séptimo lugar.²⁹ La edad de los cachorros afectados resultó ser en perros de 2 a 6 meses de edad lo cual concuerda con otros autores.^{29, 62, 63}

Sin una adecuada inmunización, muchos cachorros son afectados inmediatamente después de que los anticuerpos maternos disminuyen generalmente entre las 6 y 18 semanas de edad. El 90% de los anticuerpos que reciben los neonatos provienen de la madre y estos son captados dentro de las primeras 72 horas de vida, aunque los cachorros sean vacunados, los anticuerpos maternos pueden interferir con el virus vacunal dejando una ventana de susceptibilidad que puede durar varias semanas.⁶²

CONCLUSIONES

1. Fue posible demostrar la presencia de PVC-2 por la técnica de inmunohistoquímica en la mayoría de los casos sospechosos diagnosticados por histopatología, sin embargo, el porcentaje fue menor a lo referido en la literatura. Se recomienda el empleo de la técnica de IHQ para realizar estudios epidemiológicos en el futuro.
2. Las lesiones que se asociaron sensiblemente a PVC-2 fueron la presencia de células de regeneración y necrosis de criptas intestinales debido a la evidencia del antígeno por IHQ.
3. Las razas más afectadas en el estudio inmunohistoquímico fueron el Poodle y Schnauzer miniatura, hembras menores de 6 meses de edad que presentaron la enfermedad principalmente en invierno.
4. Es evidente la importancia de las diarreas en cachorros ya que el 11% de los casos remitidos a necropsias presentan lesiones sugerentes a PVC-2 en los últimos cinco años.

REFERENCIAS

1. Cooper BJ, Carmichael LE, Appel MJG, Greisen H. Canine viral enteritis II. morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. *Cornell Vet* 1979; 69: 134-144.
2. Martella V, Pratelli A. La parvovirosi del cane. *Obiettivi & Documenti Veterinari* 1998; 11: 7-12.
3. Appel MJG, Scout FW, Carmichael LE. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec* 1979; 105: 156-159.
4. Parrish CR. Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvoviruses. *Advances in Virus Research*. 1990; 38: 403-450.
5. Woods CB, Pollock RVH, Carmichael LE. Canine parvoviral enteritis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1980; 16: 171-179.
6. Smith JR, Farmer TS, Johnson RH. Serological observations on the epidemiology of parvovirus enteritis of dogs. *Aust Vet J* 1980; 56: 149-150.
7. Macartney L, Macartney CM. Canine parvovirus: development of immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Research in Veterinary Science* 1986; 40: 201-208.
8. Macartney L, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC. Canine parvovirus enteritis 1: clinical, haematological and pathological features of experimental infection. *Vet Rec* 1984; 115: 201-210.

9. Else RW. Fatal haemorrhagic enteritis in a puppy associated with a parvovirus infection. *Vet Rec* 1979; 106: 14-15.
10. Waner T, Mazar S, Nachmias E, Keren-Kornblatt e, Harrus S. Evaluation of a dot elisa kit for measuring immunoglobulin m antibodies to canine parvovirus and distemper virus. *Vet Rec* 2003; 152: 588-591.
11. Drane DP, Hamilton RC, Cox JC. Evaluation of a novel test for canine parvovirus. *Vet Microbiol* 1994; 41: 293-302.
12. Nho WG, Sur JH, Doster AR, Kim AB. Detection of canine parvovirus in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest* 1997; 9: 255-260.
13. Lacheretz A, Laperrousaz C, Kodjo A, Brajon N, Crevat D, Guillossou. Diagnosis of canine parvovirus by rapid immunomigration on a membrane. *Vet Rec* 2003; 152: 48-50.
14. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 1985; 230: 1046-1048.
15. Sherding RG. Virus intestinales en: Birchard SJ y Sherding RG. *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
16. Swango LJ. Canine viral diseases en: Ettinger SJ. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. USA: WB Saunders Company, 1989.

17. Agungpriyono DR, Uchida K, Tabaru H, Yamaguchi RY, Tateyama S. Subacute massive myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. *Vet Pathol* 1999; 36: 77-80.
18. Johnson BJ, Castro EA. Isolation of canine parvovirus from a dog brain with severe necrotizing vasculitis and encephalomalacia. *J Am Vet Med Assoc* 1984; 184: 1398-1399.
19. Hoskins JD. Enteritis Viral Canina en: Greene CE. *Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos*. 2da ed. México: Mc Graw Hill Interamericana, 2000.
20. Murphy, A.: *Veterinary Virology*. Third edition. Academic Press. USA. (1999).
21. Jones TC, Hunt RD, King NW. *Veterinary Pathology*. 6th ed. USA: Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
22. Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. Pathogenicity of minute virus of canines (mvc) for the canine fetus. *Cornell Vet* 1991; 81: 151-171.
23. Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. Parvovirus infection in wild carnivores. *Journal of Wildlife Diseases* 2001; 37: 594-607.
24. Truyen U. Canine Parvovirus Recent Advances in Canine Infectious Diseases (serial online) 26-Jan-2000 (cited 2002 Jan 10); A01060100. Available from: URL:

http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis:Camichael/truyen/chapter_frm.asp

25. Truyen U. Emergence and recent evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol* 1999; 69: 47-50.
26. McCarthy G. Canine parvovirus infection: a review. *Irish Vet J* 1980; 34:15-18.
27. Smith-Carr S, Macintire DK, Swango LJ. Canine parvovirus. part I. pathogenesis and vaccination. *The Compendium* 1997; 19: 125-132.
28. Harcourt RA, Spurling NW, Pick CR: Parvovirus infection in a beagle colony. *J Small Anim Pract* 1980; 21: 293-302.
29. Ramos BR. Infecciones por parvovirus canino como causa de mortalidad: estudio retrospectivo (tesis de licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2000.
30. Amaro NM. Determinación de parvovirus canino en heces por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (tesis de licenciatura). México (D.F). México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2003.
31. Nakamura M, Nahikamura K, Miyasawa T, Tohya Y, Mochizuki M, Akashi H. Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 1085-1089.

32. Stephano HA. Epizootia de enteritis viral en México: posible infección por parvovirus. *Vet Méx* 1980; 11:141-148.
33. Stephano HA y Gómez ES. Enteritis hemorrágica en cachorros en México: observación de partículas similares a parvovirus en raspado de mucosa intestinal. *Vet. Mex* 1981; 12:103-104.
34. Basurto BL. Frecuencia de *Campylobacter yeyuni*, *Salmonella* spp y parvovirus canino en perros con gastroenteritis en la ciudad de México (Tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1988.
35. Soto MA. Lesiones histopatológicas y su posible asociación con la infección por parvovirus canino (Tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, (1986).
36. Águila TH. Determinación de anticuerpos contra el parvovirus canino en sueros de perros en México (Tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, (1982).
37. Fenner FJ, Gibbs EP, Murphy FA, Rott R, Studdert MJ, White DO. *Veterinary Virology*. 2nd ed. USA; Academic Press Inc. 1993.
38. El Manual Merck de Veterinaria. 4ta ed. España: Océano/Centrum, 1993.
39. Meunier PC. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet Pathol* 1985; 22: 60-71.

40. Appel MJG, Cooper BJ, Greisen H, Scott F, Carmichael LE. Canine viral enteritis. I: status report on corona and parvo-like viral enteritides. *Cornell Vet* 1979; 69: 123-133.
41. Carpenter JL, Roberts RM, Harpster NK, King NW. Intestinal and cardiopulmonary forms of parvovirus infection in a litter of pups. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176: 1269-1273.
42. Hajjar AH, Ladiges WC. Parvovirus disease in a canine research colony. *Laboratory Animal Science* 1990; 40: 544.
43. Black JW, Holscher MA, Powell HS, Byerly CS. Parvoviral enteritis and panleukopenia in dogs. *Vet Med Sm Anim Clin* 1979; 74: 47-50.
44. Nelson DT, Eustis SL, McAdaragh JP, Stotz I. Lesions of spontaneous canine viral enteritis. *Vet Pathol* 1979; 16: 680-686.
45. Fritz TE, Canine enteritis caused by a parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 174: 5- 6.
46. Miura K, Tsuchitani M, Narama I. Histopathological characteristics as diagnostic indicators in canine parvoviral enteritis. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48: 797-800.
47. Mann PC, Bush M, Appel MJG, Beehler BA, Montali RJ. Canine parvovirus infection in south american canids. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 177-779-783.

48. Fletcher KC, Eugster AK, Schmidt RE, Hubbard B. Parvovirus infection in maned wolves. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 175: 897-900.
49. Macintire DK, Smith-Carr S. Canine parvovirus. part II. clinical signs, diagnosis and treatment. *The Compendium* 1997; 19: 291-298.
50. Rodríguez MHA, Gómez RAM, Orozco EH, Alcántara VA y Cruz OH. La inmunoperoxidasa: generalidades y evaluación de 500 casos. *Rev Fac Med* 1986; 29: 155-166.
51. Chapa BJ. Generalidades de los métodos de inmunoperoxidasa. laboratorio de biología. Investigación Aplicada S.A. Tehuacan, Puebla, México.
52. Svára T, Juntos P, Pogacnik M, Gombac M, Hostnik P. Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. *Slov Vet Res* 2003; 40: 81-90.
53. Ku JL, Seo IL, Lim CH. Histopathological and immunohistochemical studies on the intestinal lesions related to the infected age in spontaneous canine parvovirus enteritis. *Korean J Vet Res* 1994; 34: 537-547.
54. Prophet EB, Mill B, Arrington JB, Sobin, LH. Métodos histotecnológicos del Instituto de patología de las fuerzas armadas (AFIP), 2ª ed. México: 1995.

55. Haines DM y Chelack BJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112.
56. Damián SM. Identificación de Virus Respiratorios en Pulmones Neumónicos de Perros Domésticos a través de Inmunohistoquímica (tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2004.
57. Johannsen MC. Evaluación de la prueba de conductividad eléctrica de la leche, como método alternativo de diagnóstico de mastitis subclínica en cabras lecheras. (Tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
58. Macartney I, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC. Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis. *Vet Rec* 1984; 115: 453-460.
59. Yasoshima A, Doi K, Kojima A, Okaniwa A. Electron microscopic findings on epithelial cells of lieberkühn's crypts in canine parvovirus infection. *Jpn J Vet Sci* 1982; 44: 81-82.
60. Carman RS. Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: histopathology and antigen identification in tissues. *Res Vet Sci* 1985; 38: 141-150

61. Turk J, Fales W, Miller M. Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). J Am Vet Med Assoc 1992; 200: 991-994.
62. Houston DM, Ribble CA, Head LL. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). J Am Vet Med Assoc 1996; 208: 542-546.
63. Glickman LT, Damanski LM, Patronek GJ. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. J Am Vet Med Assoc 1985; 187: 589-594.
64. Mason MJ, Gillet NA, Muggenburg BA. Clinical, pathological and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed beagle colony: 1978-1985. Am Anim Hosp Assoc 1987; 23: 183-192.
65. Hoskins JD. Update on canine parvoviral enteritis. Vet Med 1997; 694-709.

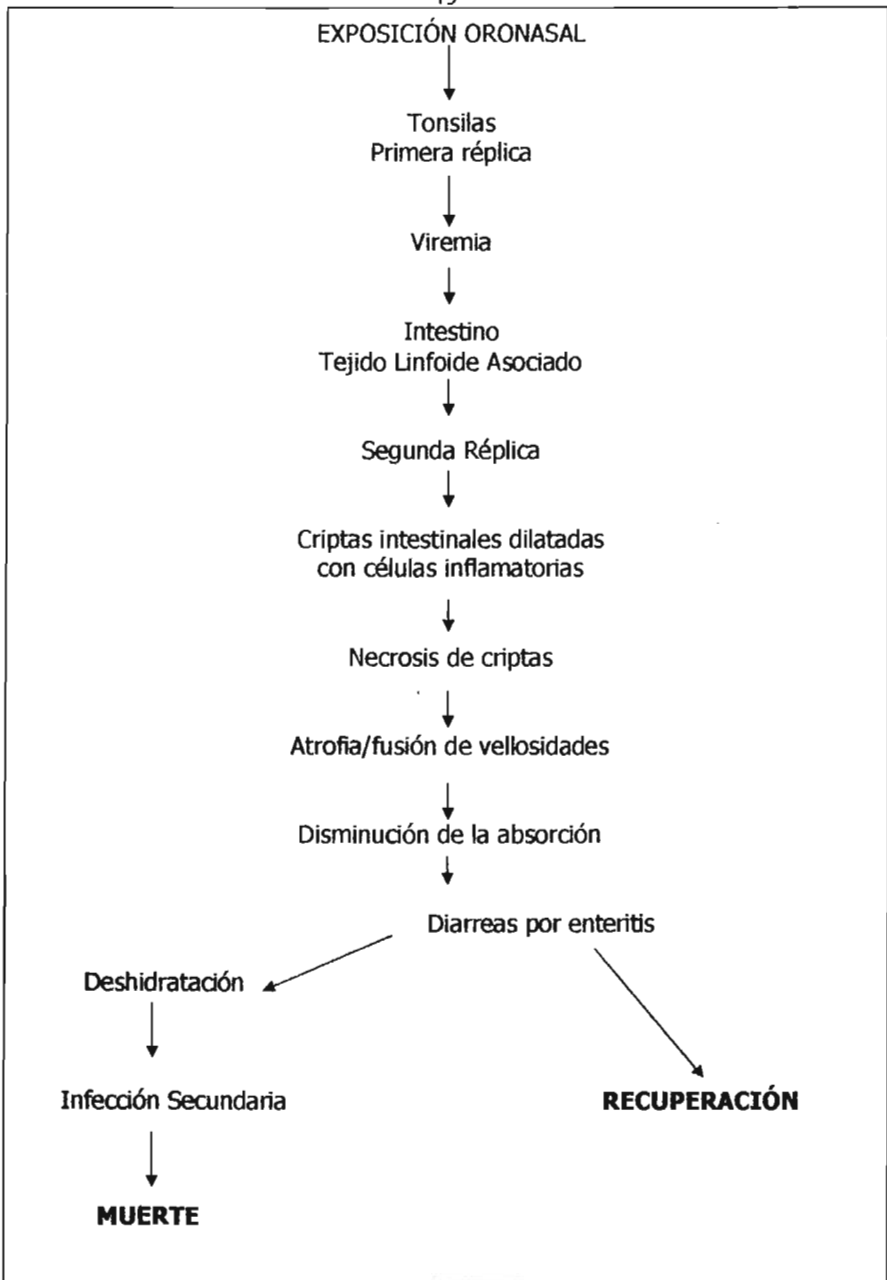


Figura 1. Patogenia secuencial de la infección por PVC-2. ¹⁹

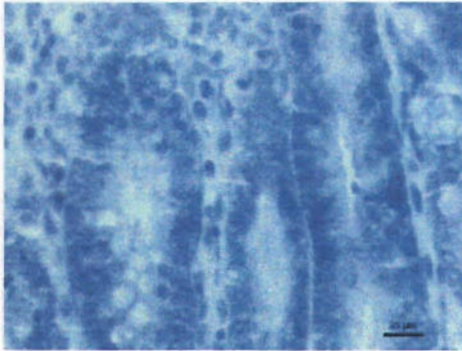


Figura 2. Testigo negativo: intestino delgado con lesiones sugerentes a PVC-2, sin utilizar anticuerpo primario. Técnica de inmunohistoquímica avidina-biotina-peroxidasa (ABP). Barra 35 μm .

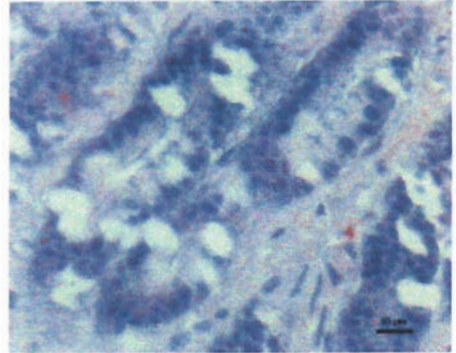


Figura 3. Testigo negativo: intestino delgado sin lesiones sugerentes a PVC-2, utilizando anticuerpo primario. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm .

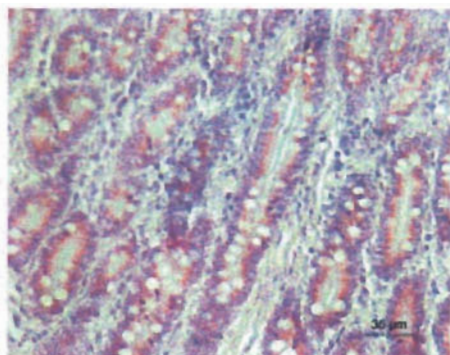


Figura 4. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra una inmunopositividad ligera en células epiteliales de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

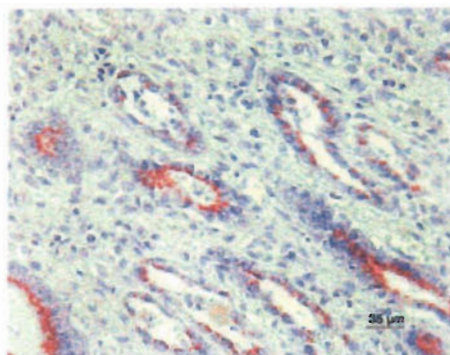


Figura 5. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra una inmunopositividad moderada en células necróticas de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

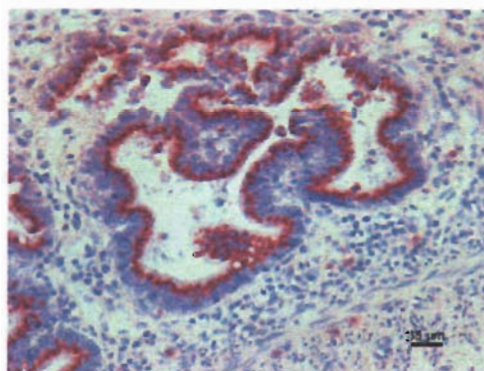


Figura 6. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra una inmunopositividad intensa en células epiteliales de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

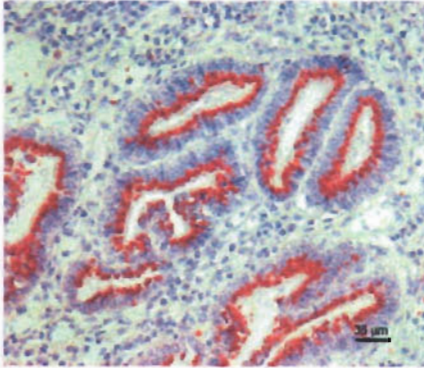


Figura 7. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra inmunopositividad en células epiteliales de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP) Barra 35 μ m.

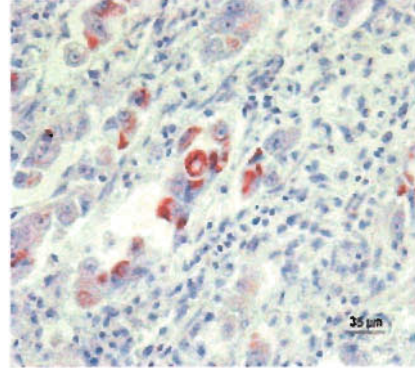


Figura 8. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra inmunopositividad en células de regeneración epiteliales de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP) Barra 35 μ m.

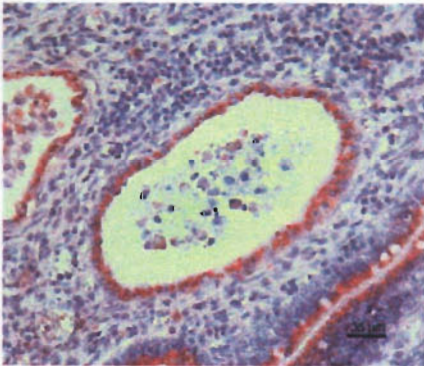


Figura 9. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra inmunopositividad en células epiteliales necróticas de criptas intestinales. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μ m.

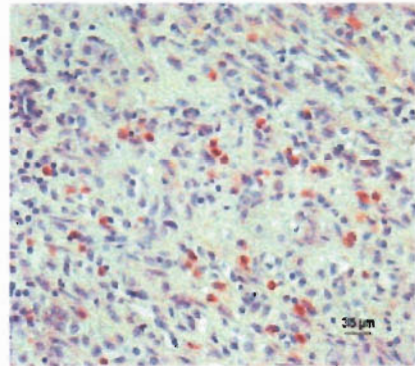


Figura 10. Intestino delgado con lesión de PVC-2 que muestra inmunopositividad en células inflamatorias mononucleares en la lámina propia. Técnica de inmunohistoquímica. Barra 35 μ m.

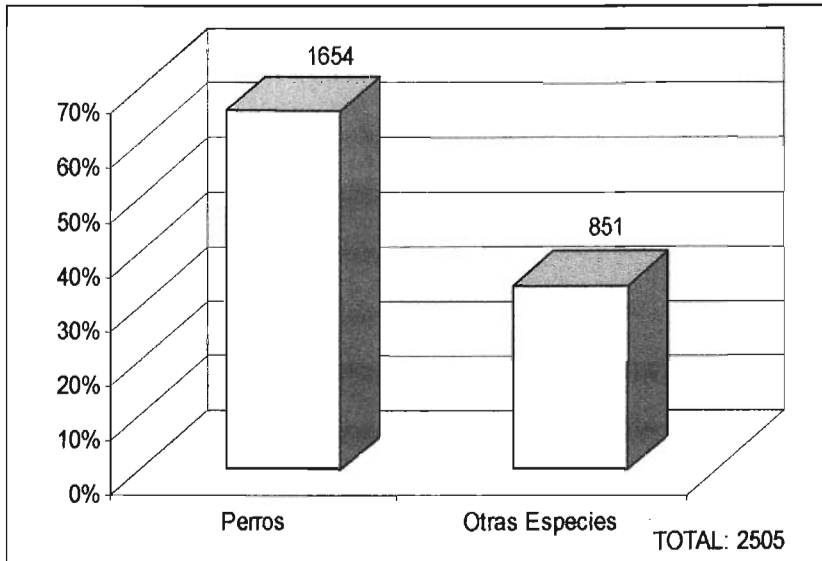


Figura 11. Casos de necropsias remitidos en el Departamento de Patología. (1998-2003). FMVZ-UNAM.

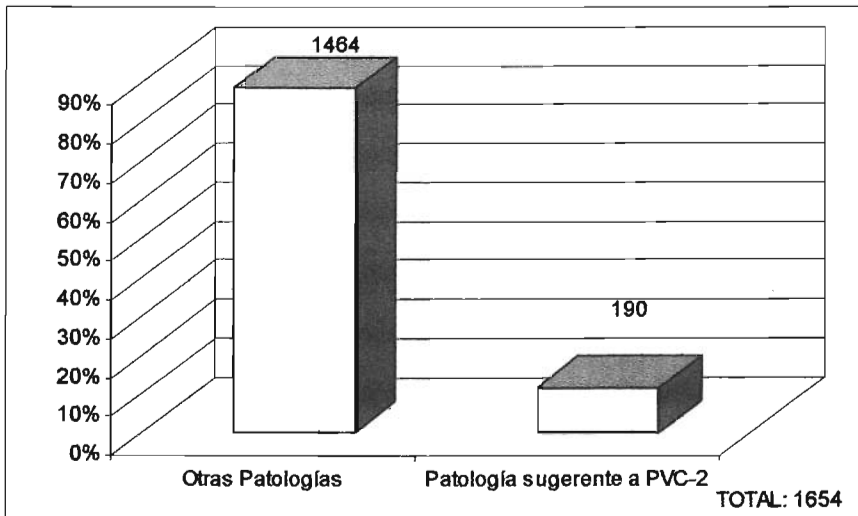


Figura 12. Casos sugerentes a PVC-2 en perros domésticos (1998-2003). Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

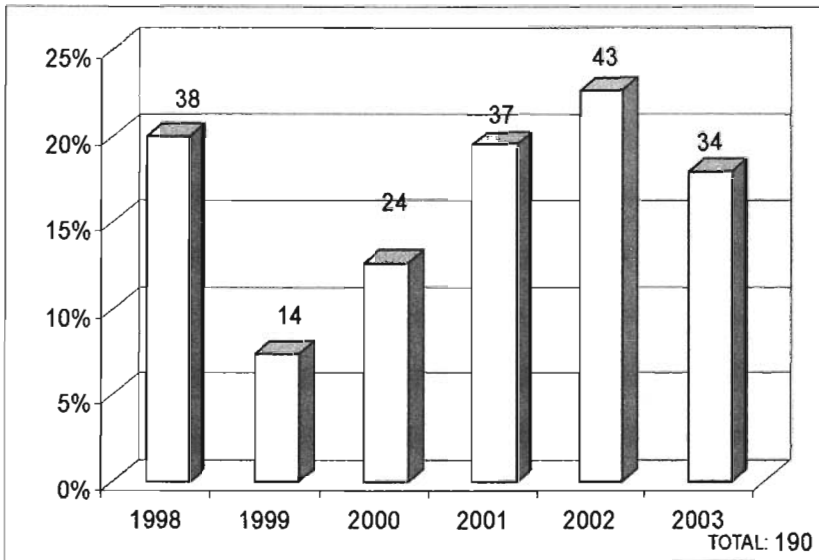


Figura 13. Casos sugerentes a PVC-2 de acuerdo al año (1998-2003).
Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

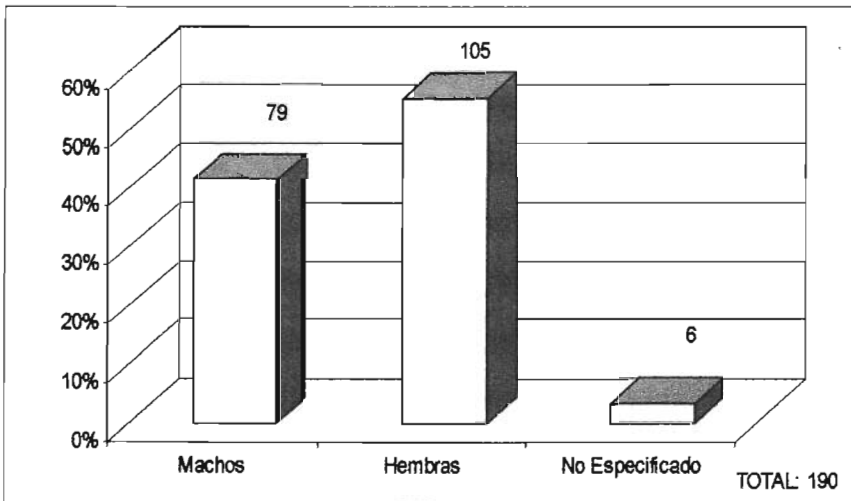


Figura 14. Casos sugerentes a PVC-2 de acuerdo al género (1998-2003).
Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

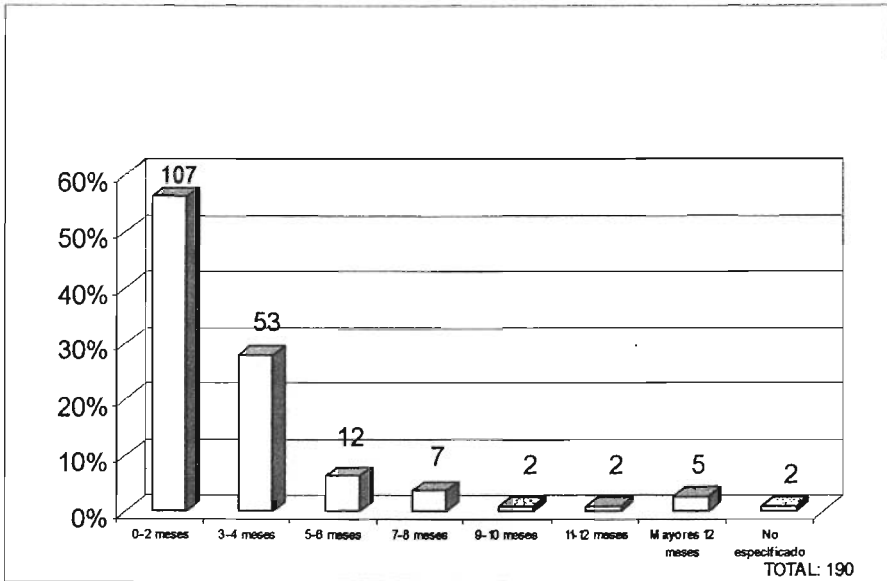


Figura 15. Casos sugerentes a PVC-2 de acuerdo a la edad (1998-2003)
Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

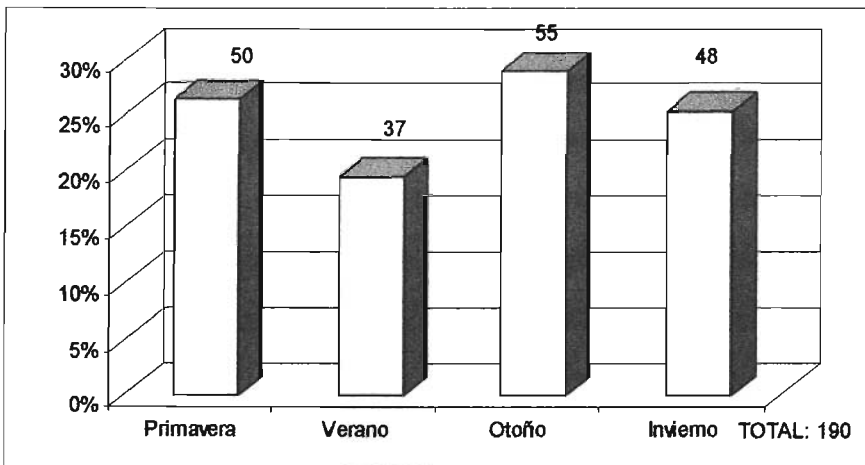


Figura 16. Casos sugerentes a PVC-2 de acuerdo a la estación del año (1998-2003).
Departamento de Patología. FMVZ-UNAM.

Cuadro 1. Efectos causados por parvovirus en animales. ^{20, 21}

| VIRUS | EFFECTOS |
|---|--|
| Panleucopenia felina | <i>Enfermedad neonatal generalizada, hipoplasia cerebelar, panleucopenia, enteritis.</i> |
| Parvovirus canino 1 | <i>Diarrea leve.</i> |
| Parvovirus canino 2 (subtipos 2a y 2b) | <i>Enfermedad neonatal generalizada, enteritis, miocarditis, linfopenia, leucoencefalomalacia y encefalitis.</i> |
| Parvovirus porcino | <i>Abortos, muerte fetal, momificación, infertilidad.</i> |
| Virus de la enteritis del mink | <i>Panleucopenia, enteritis.</i> |
| Virus de la enfermedad aleutiana del mink | <i>Enfermedad crónica de complejos inmunes, encefalopatía.</i> |
| Virus diminuto de los ratones | <i>Malformaciones fetales.</i> |
| Virus de la rata | <i>Malformaciones fetales.</i> |
| Virus H-1 de las ratas | <i>Malformaciones fetales.</i> |
| Parvovirus del ganso | <i>Hepatitis, miocarditis.</i> |
| Parvovirus del pato | <i>Hepatitis, miocarditis.</i> |

Cuadro 2. Razas, género y edad de 23 perros inmunopositivos a PVC-2 diagnosticados por inmunohistoquímica. Departamento de Patología, FMVZ-UNAM.

| No. DE CASO | RAZA | EDAD | GÉNERO |
|--------------------|---------------------|-------------|---------------|
| N02-05 | Akita | 2 meses | Macho |
| N02-06 | Dálmata | 2.5 meses | Macho |
| N02-12 | Schnauzer Miniatura | 6 semanas | Hembra |
| N02-13 | Poodle | 13 semanas | Macho |
| N02-35 | Dachshund | 2 meses | Hembra |
| N02-50 | Pastor Alemán | 30 días | Hembra |
| N02-63 | Poodle | 2.5 meses | Hembra |
| N02-81 | Sharpei | 2 meses | Hembra |
| N02-82 | Schnauzer Miniatura | 4 meses | Macho |
| N02-182 | Labrador | 7 semanas | Hembra |
| N02-280 | Schnauzer Miniatura | 2 meses | Hembra |
| N02-361 | Beagle | 2 meses | Macho |
| N03-40 | Pastor Alemán | 1.5 meses | Hembra |
| N03-110 | Criollo | 3 meses | Hembra |
| N03-440 | Yorkshire Terrier | 2 meses | Hembra |
| N03-468 | Rottweiler | 1.5 meses | Hembra |
| N03-499 | Chihuahueño | 3 meses | Macho |
| N04-115 | Poodle | 4 meses | Hembra |
| N04-140 | Schnauzer Miniatura | 8 semanas | Macho |
| N04-334 | Yorkshire Terrier | 4 meses | Hembra |
| N04-341 | Poodle | 9 Semanas | Hembra |
| N04-391 | Criollo | 3 meses | Hembra |
| N04-473 | Bóxer | 3 meses | Macho |

Cuadro 3. Frecuencia de lesiones histopatológicas en intestinos de perros inmunopositivos a PVC-2.

| LESION | No. DE CASOS | LIGERO | % | MODERADO | % | GRAVE | % |
|--|--------------|--------|--------|----------|-------|-------|-------|
| MUCOSA | | | | | | | |
| <i>Atrofia de vellosidades</i> | 22 | 4 | 18.18 | 13 | 59.09 | 5 | 22.73 |
| <i>Fusión de vellosidades</i> | 22 | 2 | 9.09 | 14 | 63.64 | 6 | 27.27 |
| <i>Necrosis de criptas</i> | 22 | 5 | 22.73 | 10 | 45.45 | 7 | 31.82 |
| <i>Infiltrado inflamatorio no supurativo</i> | 22 | 14 | 63.64 | 5 | 22.73 | 3 | 13.64 |
| <i>Células proclásticas</i> | 17 | 10 | 58.82 | 6 | 35.29 | 1 | 5.88 |
| <i>Necrosis superficial</i> | 16 | 6 | 37.50 | 5 | 31.25 | 5 | 31.25 |
| <i>Congestión</i> | 13 | 10 | 76.92 | 3 | 23.08 | 0 | 0.00 |
| <i>Reparación</i> | 11 | 6 | 54.55 | 3 | 27.27 | 2 | 18.18 |
| <i>Dilatación de criptas</i> | 7 | 4 | 57.14 | 3 | 42.86 | 0 | 0.00 |
| <i>Edema</i> | 6 | 4 | 66.67 | 2 | 33.33 | 0 | 0.00 |
| <i>Colonias bacterianas</i> | 4 | 2 | 50.00 | 2 | 50.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Hiperplasia de criptas</i> | 4 | 3 | 75.00 | 0 | 0.00 | 1 | 25.00 |
| <i>Hiperplasia de células caliciformes</i> | 3 | 0 | 0.00 | 1 | 33.33 | 2 | 66.67 |
| <i>Hemorragias</i> | 3 | 2 | 66.67 | 1 | 33.33 | 0 | 0.00 |
| <i>Infiltrado inflamatorio mixto</i> | 2 | 1 | 50.00 | 1 | 50.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Infiltrado inflamatorio supurativo</i> | 2 | 2 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Cuerpos de inclusión</i> | 0 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| SUBMUCOSA | | | | | | | |
| <i>Edema</i> | 19 | 10 | 52.63 | 8 | 42.11 | 1 | 5.26 |
| <i>Congestión</i> | 16 | 9 | 56.25 | 7 | 43.75 | 0 | 0.00 |
| <i>Infiltrado Inflamatorio no supurativo</i> | 9 | 7 | 36.84 | 1 | 5.26 | 1 | 5.26 |
| <i>Atrofia Linfoide</i> | 9 | 4 | 21.05 | 3 | 15.79 | 2 | 10.53 |
| <i>Hemorragias</i> | 7 | 4 | 57.14 | 3 | 42.86 | 0 | 0.00 |
| <i>Tejido de reparación</i> | 2 | 1 | 50.00 | 1 | 50.00 | 0 | 0.00 |
| MUSCULAR | | | | | | | |
| <i>Edema</i> | 19 | 11 | 57.89 | 8 | 42.11 | 0 | 0.00 |
| <i>Congestión</i> | 7 | 6 | 85.71 | 1 | 14.29 | 0 | 0.00 |
| <i>Infiltrado Inflamatorio</i> | 4 | 3 | 75.00 | 0 | 0.00 | 1 | 25.00 |
| <i>Hemorragias</i> | 3 | 1 | 33.33 | 2 | 66.67 | 0 | 0.00 |
| SEROSA | | | | | | | |
| <i>Edema</i> | 13 | 9 | 69.23 | 3 | 23.08 | 1 | 7.69 |
| <i>Infiltrado inflamatorio</i> | 7 | 7 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Congestión</i> | 6 | 5 | 83.33 | 1 | 16.67 | 0 | 0.00 |
| <i>Fibrina</i> | 5 | 3 | 60.00 | 1 | 20.00 | 1 | 20.00 |
| <i>Hemorragias</i> | 2 | 2 | 100.00 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |

Cuadro 4. Frecuencia y grado de inmunopositividad a PVC-2 empleando la técnica de inmunohistoquímica en intestino delgado.

| TIPO DE CÉLULA | CASOS POSITIVOS | PORCENTAJE |
|---|-----------------|------------|
| <i>Células Epiteliales</i> | 17 | 73.91 |
| <i>Grado 1</i> | 6 | 35.29 |
| <i>Grado 2</i> | 8 | 47.06 |
| <i>Grado 3</i> | 3 | 17.65 |
| <i>Células Necróticas</i> | 21 | 91.30 |
| <i>Grado 1</i> | 6 | 28.57 |
| <i>Grado 2</i> | 12 | 57.14 |
| <i>Grado 3</i> | 3 | 14.29 |
| <i>Células Proclásticas</i> | 18 | 76.26 |
| <i>Grado 1</i> | 7 | 38.89 |
| <i>Grado 2</i> | 8 | 44.44 |
| <i>Grado 3</i> | 3 | 16.67 |
| <i>Células Inflamatorias Mononucleares</i> | 20 | 86.96 |
| <i>Grado 1</i> | 11 | 55 |
| <i>Grado 2</i> | 9 | 45 |
| <i>Grado 3</i> | 0 | 0 |

Apéndice 1. Clasificación de la inmunopositividad observada en la técnica de inmunohistoquímica.

| GRADO | POSITIVIDAD | COLOR |
|--------------|--------------------|--------------|
| 1 | Ligera | Ocre claro |
| 2 | Moderada | Ocre |
| 3 | Intensa | Ocre oscuro |

Apéndice 2. Medias y desviaciones estándar de lesiones intestinales de acuerdo al grado* sugerentes a PVC-2 e inmunohistoquímica en 30 perros.

| LESIÓN | MEDIA | DESVIACIÓN ESTÁNDAR |
|--|--------------|----------------------------|
| MUCOSA | | |
| <i>Atrofia de vellosidades</i> | 1.96 | 0.72 |
| <i>Fusión de vellosidades</i> | 1.94 | 0.73 |
| <i>Necrosis Superficial</i> | 1.34 | 1.21 |
| <i>Dilatación de criptas</i> | 0.38 | 0.61 |
| <i>Necrosis de criptas</i> | 1.86 | 0.9 |
| <i>Hiperplasia de criptas</i> | 0.17 | 0.5 |
| <i>Células proclásticas</i> | 0.91 | 0.73 |
| <i>Cuerpos de inclusión</i> | 0 | 0 |
| <i>Hiperplasia de células caliciformes</i> | 0.28 | 0.83 |
| <i>Infiltrado inflamatorio mononuclear</i> | 1.37 | 0.75 |
| <i>Infiltrado inflamatorio supurativo</i> | 0.03 | 0.13 |
| <i>Infiltrado inflamatorio mixto</i> | 0.09 | 0.31 |
| <i>Congestión</i> | 0.51 | 0.63 |
| <i>Hemorragia</i> | 0.12 | 0.41 |
| <i>Edema</i> | 0.39 | 0.68 |
| <i>Colonias bacteriana</i> | 0.32 | 0.69 |
| <i>Reparación</i> | 0.69 | 0.88 |
| SUBMUCOSA | | |
| <i>Congestión</i> | 0.84 | 0.71 |
| <i>Edema</i> | 1.2 | 0.67 |
| <i>Hemorragia</i> | 0.41 | 0.58 |
| <i>Tejido de reparación</i> | 0.14 | 0.45 |
| <i>Infiltrado inflamatorio mononuclear</i> | 0.57 | 0.8 |
| <i>Atrofia linfoide</i> | 0.72 | 1 |
| MUSCULAR | | |
| <i>Edema</i> | 0.96 | 0.73 |
| <i>Congestión</i> | 0.35 | 0.52 |
| <i>Hemorragia</i> | 0.16 | 0.48 |
| <i>Infiltrado inflamatorio no supurativo</i> | 0.26 | 0.61 |
| SEROSA | | |
| <i>Edema</i> | 0.62 | 0.8 |
| <i>Congestión</i> | 0.26 | 0.5 |
| <i>Hemorragia</i> | 0.07 | 0.21 |
| <i>Fibrina</i> | 0.24 | 0.59 |
| <i>Infiltrado Inflamatorio no supurativo</i> | 0.24 | 0.38 |
| INMUNOHISTOQUÍMICA | | |
| <i>Células epiteliales</i> | 1 | 1.04 |
| <i>Células necróticas</i> | 1.2 | 0.95 |
| <i>Células proclásticas</i> | 1.02 | 0.99 |
| <i>Infiltrado inflamatorio mononuclear</i> | 0.98 | 0.79 |

*Grado1: Ligero

Grado 2: Moderado

Grado 3: Grave

Apéndice 3. Razas de perros con diagnóstico sugerente a PVC-2 en el período 1998-2003. Departamento de Patología, FMVZ-UNAM.

| RAZA | No. CASOS | PORCENTAJE |
|-----------------------------|------------------|-------------------|
| <i>Rottweiler</i> | 23 | 12.11% |
| <i>Poodle</i> | 17 | 8.95% |
| <i>Chihuahueño</i> | 16 | 8.42% |
| <i>Basset Hound</i> | 16 | 8.42% |
| <i>Schnauzer Miniatura</i> | 12 | 6.32% |
| <i>Pastor Alemán</i> | 10 | 5.26% |
| <i>Labrador</i> | 9 | 4.74% |
| <i>Criollo</i> | 7 | 3.68% |
| <i>Cocker Spaniel</i> | 6 | 3.16% |
| <i>Schnauzer Estándar</i> | 6 | 3.16% |
| <i>Dachshund</i> | 5 | 2.63% |
| <i>Beagle</i> | 5 | 2.63% |
| <i>Cobrador Dorado</i> | 5 | 2.63% |
| <i>Sharpei</i> | 4 | 2.11% |
| <i>Bóxer</i> | 4 | 2.11% |
| <i>Mastín Inglés</i> | 3 | 1.58% |
| <i>Pastor de Shetland</i> | 3 | 1.58% |
| <i>Dálmata</i> | 3 | 1.58% |
| <i>Xolozcuintle</i> | 3 | 1.58% |
| <i>Bulldog</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Schnauzer Gigante</i> | 2 | 1.05% |
| <i>San Bernardo</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Akita</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Pastor Belga</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Pug</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Pomerania</i> | 2 | 1.05% |
| <i>Samoyedo</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Mastín Napolitano</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Chow chow</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Maltés</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Springer Spaniel</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Afgano</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Fox Terrier</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Gran Danés</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Pastor Holandés</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Bull Terrier</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Bull Terrier Inglés</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Bichón Frisé</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Bulldog Francés</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Fila Brasileiro</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Dogo de Burdeos</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Brittany Spaniel</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Welsh Corgy Pembroke</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Rhodesian Ridgeback</i> | 1 | 0.53% |
| <i>Yorkshire Terrier</i> | 1 | 0.53% |
| TOTAL | 190 | 100% |