

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Estandarización de la Técnica de PCR para el Diagnóstico de Parvovirus Canina a Partir de Muestras de Sangre y Materia Fecal

Nasly Berene Rebeca Carrero Becerra

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de Pamplona

Diciembre 2022



Nota del autor

Trabajo de grado, Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Medicina Veterinaria, Universidad de Pamplona, Pamplona N.S

La correspondencia relacionada con este documento deberá ser enviada:

nasly.carrero@unipamplona.edu.co

**Estandarización del Diagnóstico de Parvovirus Canina Mediante PCR a Partir de
Muestras de Sangre y Materia Fecal**

Nasly Berene Rebeca Carrero Becerra

Trabajo de grado como requisito para optar al título de Médico Veterinario

Director

Jesús Alberto Mendoza Ibarra DMV M. Sc.; Ph. D

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Medicina Veterinaria

Universidad de Pamplona

Pamplona, Norte de Santander, Colombia

2022

Dedicatoria

A Dios y a mi hijo, quienes con su presencia en mi vida me han permitido levantarme de cada tropiezo, secar toda lágrima derramada, abrazar la vida y sentirla como un regalo. A mi abuela QEPD, quien fue el pilar para mi evolución personal.

Agradecimientos

Agradezco a Dios, porque sin él nada de esto hubiera sido posible, a mi hijo que con su amor, felicidad y compañía me impulsó a lograr todos mis objetivos.

Agradezco a mis profesores, que, con su esfuerzo, fueron el pilar de mi formación profesional.

Agradezco a mi director de tesis DMV M. Sc.; Ph. D. Jesús Alberto Mendoza Ibarra, por su paciencia, disposición y colaboración durante este proceso.

Agradezco a todas las personas que me apoyaron y motivaron durante estos últimos meses, en especial al grupo CEDIMOL, quienes, con sus consejos, sabiduría, alegría y aprecio, permitieron no darme por vencida.

Agradecida con la clínica veterinaria Vetmedical, por su colaboración y apoyo para la obtención de las muestras para llevar a cabo este trabajo.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	4
Introducción	11
Descripción del Sitio de Pasantía	12
Descripción de las Actividades de Pasantía	13
Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I	16
1.1 Planteamiento del Problema	16
1.2 Justificación	18
1.3 Objetivos.....	19
1.3.1 Objetivo general	19
1.3.2 Objetivos específicos	19
Capítulo II	20
2.1 Introducción	20
2.2 Revisión Bibliográfica	22
2.2.1 Etiología	22
2.2.2 Epidemiología	26
2.2.3 Patogenia	29
2.2.4 Manifestaciones clínicas	32
2.2.4.1 Forma Gastrointestinal.	32
2.2.4.2 Forma Neurológica.	33

2.2.4.3 Forma Cardíaca	33
2.2.5 Métodos diagnósticos	33
2.2.5.1 Hemograma	34
2.2.5.2 Hemaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación	34
2.2.5.3 Microscopía Electrónica	34
2.2.5.4 Aislamiento Viral y Cultivo Celular	35
2.2.5.5 Inmunofluorescencia	35
2.2.5.6 Inmunocromatografía.	35
2.2.5.7 Ensayo de Inmunoadsorción Ligada a Enzimas (ELISA).	37
2.2.5.8 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)	37
Capítulo III	44
3.1 Metodología	44
3.1.1 Recolección y Conservación de las Muestras	45
3.1.1.1 Muestras de Sangre	45
3.1.1.1 Muestras de Hisopado rectal.	46
3.1.1.2 Vacunas	46
3.1.2 Extracción de ADN	46
3.1.2.1 Método Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico (PCI) en muestras de sangre	47
3.1.2.2 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) en Muestras de Sangre y Vacunas	47

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

3.1.2.3 Método de Enfriamiento Boiling Snap en Muestras de Hisopado	
Rectal y Materia Fecal	48
3.1.3 PCR de punto final	48
3.1.3.1 Selección y Verificación de los Cebadores	48
3.1.3.2 Condiciones de la PCR	49
3.1.3.3 Electroforesis	50
3.1.4 PCR en tiempo real	50
Capítulo IV	51
4.1 Resultados	51
4.1.1 Extracción de ADN	51
4.1.2 PCR en Punto Final	53
4.1.3 PCR en Tiempo Real (qPCR)	53
4.1.4 Determinación de la sensibilidad de la PCR e Inmunocromatografía	56
4.1.5 Curva de Sensibilidad	57
4.2 Discusión	58
Capítulo V	61
5.1 Conclusiones	61
5.2 Recomendaciones	62
5.3 Referencias	63
5.4 Anexos	72

Lista de Tablas

Tabla 1 Secuencia de Cebadores para el Diagnóstico de PCR en pacientes sospechosos a parvovirus canina	49
Tabla 2 Concentración de Ácidos Nucleicos Contenidos en Controles Positivos (vacunas)	52
Tabla 3	56
Tabla 4 Relación del Ct con las Unidades Virales de cada Dilución.....	58

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Taxonomía de la Familia Parvoviridae</i>	23
Figura 2 Esquema del Genoma del Parvovirus Canino	24
Figura 3 Variantes Antigénicas del CPV-2a.....	25
Figura 4 Distribuciones Geográficas Potenciales Previstas para CPV-2 en el Mundo	28
Figura 5	29
Figura 6 Tracto Gastrointestinal Normal vs Afectado por CPV-2	31
Figura 7 Principio del Test Inmunocromatográfico Parvovirus	36
Figura 8 Fundamento del Ensayo de Inmunoadsorción Ligada a Enzimas	37
Figura 9 Elementos Necesarios para la Elaboración de la PCR	40
Figura 10 Fases de la PCR.....	41
Figura 11 Mecanismo de incorporación del SYBR Green	42
Figura 12 Cinética de amplificación de la qPCR.....	43
Figura 13	45
Figura 14 Concentraciones de ADN en Sangre e Hisopado Rectal Mediante Espectrofotometría	51
Figura 15 Densidad Óptica 260/280 de Sangre e Hisopado rectal Mediante Espectrofotometría	52
Figura 16 Pacientes Positivos y Negativo según qPCR.....	54
Figura 17 Relación del Ct con el Método de Extracción de ADN	55
Figura 18	56
Figura 19 Curva de Sensibilidad en Diluciones de Vacunas	57

Lista de Anexos

Anexo A. Nomenclatura y Tipo de Muestras, Resultados Test Snap y Métodos de Extracción Empleados	72
Anexo B. Determinación de los Valores de Ct para el Diagnóstico Molecular de CPV-2 en Muestras de Sangre e Hisopado Rectal.....	75
Anexo C. Determinación de los Valores de Ct para el Diagnóstico Molecular de CPV-2 en Muestras de Sangre.....	75
Anexo D. Diagnostico mediante qPCR de muestras de sangre y materia fecal	76
Anexo E. Diagnóstico de Muestras negativas según test rápido	76
Anexo F Ct muestra PA-4 sangre e hisopado rectal (inhibido)	77

Introducción

El veterinario no es solo médico de animales, también tiene un papel importante en la salud humana y ambiental, así, por medio del conocimiento de las enfermedades que se transmiten de los animales a los humanos, contribuye a proteger la salud de todos, permitiendo de esta forma la conservación del ecosistema. Este es el fundamento del concepto “Una sola salud “. La responsabilidad de cada médico veterinario radica no solo en el tratar, sino también en adquirir la capacidad de avanzar en el campo de la ciencia, investigación, actualización médica, fomentando el desarrollo de herramientas necesarias para el crecimiento profesional.

El desempeño profesional como médico veterinario exige cada vez más preparación para enfrentar los diferentes problemas de salud, producción animal y tecnología para el diagnóstico molecular. Su principal misión es la de proteger la salud de los animales y los consumidores, para garantizar la inocuidad de los alimentos y el cumplimiento de las leyes y reglamentos.

La Universidad de Pamplona forma profesionales integrales en el área de la medicina veterinaria, con la habilidad de saber diagnosticar el estado de salud de los animales, utilizando diferentes herramientas que anticipen reacciones impredecibles, con destrezas para llevar a cabo procedimientos quirúrgicos mínimamente invasivos y con la capacidad de gestionar emergencias, sabiendo detectarlas y gestionarlas. Profesionales con habilidades en medicina interna, reproducción, laboratorio clínico, parasitología, imagenología, salud pública, epidemiología, y que además mediante el área de la investigación, proporcionen datos científicos fiables y renovados para detectar, controlar, predecir, prevenir y tratar enfermedades animales de todos los orígenes.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

La pasantía práctica en investigación es un requisito para obtener el título de médico veterinario, la misma se realizó en el centro de diagnóstico e investigación molecular en enfermedades parasitarias, tropicales e infecciosas (CEDIMOL), en la ciudad de Pamplona, durante el segundo semestre del año 2022, con una duración de 4 meses. En esta pasantía se trabajó en la estandarización del diagnóstico molecular del parvovirus canino, a partir de diferentes muestras clínicas. Se llevaron a cabo diferentes protocolos de extracción de ADN, y mediante el uso de primers descritos, se realizó la amplificación y determinación de secuencias del parvovirus canino, mediante análisis de reacción en cadena de polimerasa.

En el presente informe se describe el trabajo llevado a cabo durante el periodo de pasantía práctica en investigación, realizado en una población de caninos de la ciudad de Pamplona y Cúcuta con sintomatología de enfermedad gastrointestinal compatible con la enfermedad.

Descripción del Sitio de Pasantía

El Centro de Diagnóstico en Investigación Molecular (CEDIMOL), presta servicios desde el 13 junio del 2020, como laboratorio colaborador del INS, para atender la emergencia sanitaria del COVID-19 en Norte de Santander, posteriormente se inició la construcción de la sede del laboratorio en Pamplona ubicado en el edificio Eduardo Cote Lamus del campus de la Universidad. Actualmente, el laboratorio CEDIMOL está en el proceso de implementación de la división veterinaria, del cual hace parte este trabajo. Este es un laboratorio diseñado con el propósito de implementar pruebas de diagnóstico molecular, y ha tenido gran importancia en la salud pública de la región, ya que ha sido pionero en el desarrollo de estudios moleculares del SARS-CoV-2, actualmente está en cabeza de los bacteriólogos Dr., Raúl Rodríguez Martínez,

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Diana Patricia Bohada Lizarazo, Reynaldo Gutiérrez Marín y el médico veterinario Jesús Alberto Mendoza Ibarra.

CEDIMOL fomenta los procesos de investigación a nivel de pregrado y posgrado en enfermedades parasitarias, tropicales, e infecciosas, de importancia en la salud pública de la región, proponiendo soluciones que permitan el diagnóstico y el control de los agentes infecciosos, a través de la caracterización fenotípica y genotípica de los patógenos de relevancia en salud pública circundantes en la región. Su labor está orientada a docentes y estudiantes en la investigación básica y aplicada, así como capacitación en áreas de biología molecular, inclinado al diagnóstico molecular de bacterias, hongos, virus, parásitos, epidemiología de enfermedades infecciosas, investigación para hallar nuevos mecanismos de transmisión de enfermedades y la identificación y validación de nuevos biomarcadores diagnósticos.

El laboratorio cuenta con un área de toma de muestras, para el desarrollo de las técnicas moleculares se cuenta con un área sucia compuesta por el área de recepción de muestras, desembalaje e inactivación y extracción de ácidos nucleicos, y un área limpia compuesta por mezcla, master mix y amplificación de PCR, adicionalmente el laboratorio cuenta con los equipos necesarios para el desarrollo de técnicas de inmunofluorescencia, electroforesis, microscopía, microbiología e inmunología.

Descripción de las Actividades de Pasantía

Las actividades realizadas durante el periodo de pasantía práctica en investigación incluyeron la revisión bibliográfica, el análisis y discusión de artículos e informes científicos

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

relacionados con el parvovirus canino, además de estudios bioinformáticos para la determinación de primers de parvovirus canino y otras enfermedades de interés veterinario.

Adicionalmente, se llevaron a cabo seminarios, preparación de material, pruebas de extracción, determinación de concentración y calidad de ácidos nucleicos, colaboración en otros proyectos de investigación y club de revista.

Resumen

La parvovirus canina es una enfermedad causada por el Parvovirus canino (CPV), perteneciente a la familia *Parvoviridae* y al género parvovirus autónomo, su origen se debió a una mutación en la proteína VP2 del virus de la panleucopenia felina, desarrollándose una variante (CPV2) con la capacidad de infectar caninos sin importar su edad, siendo los cachorros los más propensos al contagio, esta enfermedad cursa con un cuadro intestinal agudo, que ha provocado una alta mortalidad de caninos a nivel mundial.

El presente trabajo se llevó a cabo mediante el muestreo, a partir de 27 pacientes de diferentes clínicas veterinarias de la ciudad de Pamplona y Cúcuta, con sintomatología compatible con Parvovirus canino (vómito, diarrea sanguinolenta y no sanguinolenta). De estos, 22 presentaron inmunocromatografía positiva para PCR (prueba rápida); 4 fueron negativos; y a uno no se le realizó prueba snap. Las muestras obtenidas fueron sangre e hisopado rectal. Inicialmente se estandarizaron los métodos de extracción de ADN utilizando fenol cloroformo alcohol isoamílico, boiling snap y un kit comercial. Asimismo, mediante una revisión bibliográfica se seleccionaron primers previamente descritos

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Se realizó el montaje de una PCR de punto final y una en tiempo real, utilizando las diferentes muestras y primers

Palabras claves: Parvovirus, variantes antigénicas, muestras, métodos de extracción, primers, PCR.

Abstract

Canine parvovirus is a disease caused by canine parvovirus (CPV), belonging to the Parvoviridae family and the autonomous parvovirus genus, its origin was due to a mutation in the VP2 protein of the feline panleukopenia virus, developing a variant (CPV2) with the ability to infect canines regardless of their age, puppies being the most prone to contagion, this disease presents with an acute intestinal condition, which has caused a high mortality of canines worldwide.

This work was carried out by sampling 27 patients from different veterinary clinics in the city of Pamplona and Cúcuta, with symptoms compatible with canine Parvovirus (vomiting, bloody and non-bloody diarrhea). Of these, 22 presented positive immunochromatography for PCR (rapid test); 4 were negative; and one did not have a snap test. The samples obtained were blood, rectal swab. Initially the DNA extraction methods were standardized using phenol chloroform isoamyl alcohol, boiling snap and a commercial kit. Likewise, through a bibliographical review, previously described primers were selected.

The assembly of an end-point PCR and a real-time PCR was carried out, using the different samples and primers.

Keywords: Parvovirus, antigenic variants, samples, extraction methods, primers, PCR.

Capítulo I

1.1 Planteamiento del Problema

El parvovirus canino es una enfermedad que afecta principalmente a cachorros que han perdido la inmunidad materna, debido que los títulos de anticuerpos derivados de la madre (MAD), los protegen las primeras semanas de vida, las infecciones suelen producirse en cachorros hasta los 6 meses de edad, no obstante pacientes con una carga parasitaria alta y sin esquema de vacunas pueden cursar con la enfermedad en edad adulta. (Pollock et al, 1993).

La infección ocurre por la exposición oronasal a heces infectadas con el virus, asimismo, el ser humano, instrumentos, insectos, roedores pueden servir de vectores, el virus puede ser albergado durante un largo tiempo en el pelaje del perro, además su estabilidad y resistencia en el ambiente le permite permanecer en objetos inanimados, como ropa, recipientes para alimento, pisos y jaulas durante 5 meses o más (Greene, 1990)

La parvovirus canina apareció en Colombia a principio de la década de 1980, los animales presentaban una gastroenteritis hemorrágica severa, acompañada de fiebre y leucopenia, el progreso de la enfermedad era rápido y los tratamientos implementados no detenían su evolución, se presentó con una alta tasa de morbilidad y mortalidad, que en la actualidad solo ha descendido con la aplicación de las vacunas. (Mogollón et al, 1984). En estudios realizados se ha comprobado que la probabilidad de infección en animales vacunados frente a los no vacunados es de 21.1% y 78.9% respectivamente (Aponte, 2020)

La mortalidad generada por el Parvovirus canino es del 70 %, en la población de cachorros infectados, y aunque los adultos presentan una menor probabilidad de presentar la

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

enfermedad solo un 1% de los que llegan a infectarse mueren, (Appel, 1979 citado en Tuteja, 2022). La alta mortalidad en cachorros se debe en gran medida a que la inmunidad humoral no se desarrolla completamente sino hasta que estos tienen un año de edad (Ling, 2012 citado en Tuteja et al, 2022)

Diversos estudios demuestran la alta prevalencia del CPV-2, (Gutiérrez et al, 2019) en un estudio realizado en 139 caninos de diferentes razas y sexos en la veterinaria Zamudio Pet Company de la ciudad de Cali, con sintomatología compatible con parvovirus canina demostró una prevalencia del 40%, por su parte (Duque et al, 2017) en un estudio efectuado en los departamentos de Santander y Antioquia en 71 caninos con sintomatología relacionada con CPV-2 evidencio una prevalencia del 84.85% y 56,41% respectivamente, asimismo en otro estudio (Pino et al, 2018) determinó que la prevalencia encontrada en una población de 160 caninos muestreados en la Habana, Cuba era del 95.63%, por lo anterior, se evidencia que por la alta prevalencia demostrada en diferentes estudios para esta enfermedad, se requiere de métodos diagnósticos que permitan una correcta y confiable detección de este virus.

La gastroenteritis en caninos es uno de los mayores motivos de consulta en las veterinarias de la ciudad de Pamplona, sin embargo, no todos los caninos con diarrea sanguinolentas o no sanguinolenta, con vómitos o sin ellos, están infectados necesariamente con CPV, ya que usualmente este es confundido con el Coronavirus canino, así como con otras afecciones patológicas como salmonelosis, leptospirosis, campilobacteriosis, entre otras enfermedades que cursan con sintomatología similar (Guerrero, 2009).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

¿Es la PCR el método diagnóstico más confiable para determinar la presencia de parvovirus canina en animales sospechosos?

1.2 Justificación

El diagnóstico de la parvovirus canina en la actualidad, se ha venido dificultando debido a que los signos clínicos evidenciados de la enfermedad inicial han ido cambiando, esto complica la obtención de un diagnóstico apropiado, por esta razón, se necesitan de pruebas diagnósticas con una alta sensibilidad y especificidad que permitan un rápido manejo de la enfermedad, los métodos diagnósticos de laboratorio elaborados en medicina veterinaria para el diagnóstico del parvovirus tales como; ensayos de hemaglutinación, cultivo celular, inmunofluorescencia, ELISA, inmunocromatografía y PCR, se han probado a lo largo de los años, sin embargo su sensibilidad y especificidad varían. En clínicas veterinarias las técnicas diagnósticas más usadas son la inmunocromatografía y la PCR (Faz et al, 2017).

En el diagnóstico clínico, el uso de la anamnesis e historia clínica, puede llevar a un diagnóstico presuntivo de cada caso, no obstante, un estudio realizado por Faz et al, 2017, donde determinó que la sensibilidad del diagnóstico clínico era de un 57.7%, por su parte Penelo, 2017, realizó un estudio comparativo con diferentes test inmunocromatográficos comerciales, ELISA y PCR en pacientes con sintomatología compatible con parvovirus canino, en los resultados se pudo evidenciar una diferencia en la sensibilidad de los diferentes test comerciales empleados para el estudio, desde un 47.2% hasta un 95.2%. por su parte el ELISA rápido reflejó una sensibilidad del 85.7% y la PCR un 100% de sensibilidad para el estudio.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

En otro estudio realizado por Drane et al, 1994, donde comparó la sensibilidad y especificidad de dos métodos diagnósticos para parvovirus canino; ensayo de ELISA y hemaglutinación, se evidenció que el ELISA tenía una sensibilidad del 87%, frente a la hemaglutinación, microscopía electrónica (EM) y aislamiento del virus (VI), donde su sensibilidad y especificidad fueron del 87% y 63% respectivamente

Según los métodos diagnósticos antes mencionados, se puede evidenciar que el método más confiable es la PCR por su alta sensibilidad, un correcto diagnóstico de este virus, permite establecer un adecuado tratamiento sintomático, y ayudará a disminuir la mortalidad de por sí elevada y que se suman también a las pérdidas económicas y afectivas para los propietarios.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Estandarizar la técnica de PCR para el diagnóstico de parvovirus canina a partir de muestras clínicas de sangre y materia fecal de animales sospechosos.

1.3.2 Objetivos específicos

Obtener muestras de sangre e hisopado rectal de caninos con sintomatología gastrointestinal y sospecha de parvovirus canina.

Desarrollar diferentes métodos de extracción de ADN a partir de las muestras de sangre e hisopado rectal de animales sospechosos

Establecer las condiciones ideales para implementar la técnica de PCR en el laboratorio Cedimol de la ciudad de Pamplona, Colombia.

Capítulo II

2.1 Introducción

El parvovirus canino del latín *Parvum* que significa; pequeño o diminuto, pertenece a la familia *Parvoviridae*, entre el mundo de los anticuerpos este virus es de los que posee menor diámetro, su tamaño oscila entre los 18 a 20 nm (Tattersal 2005, citado en Fonseca, 2018). Es un virus sistemático que desde su aparición a finales de 1970 ha generado una alta mortalidad y morbilidad en la población canina (Goddard et al, 2010)

Se cree que se originó a partir de una pequeña mutación en la cadena de aminoácidos de la proteína VP2 del virus de la panleucopenia felina, adquiriendo la capacidad de infectar a caninos (Chung et al, 2020). Es un virus ADN monocatenario, que no contiene envoltura y su principal fuente de replicación son células que poseen una alta tasa de división mitótica, además se caracteriza por ser muy resistente en distintos ambientes y extremadamente estable (Hoskins, 1998)

Desde su aparición por primera vez en 1978, se han descrito tres nuevas variantes antigénicas; en la década de 1980 se descubrieron las cepas CPV2a y CPV2b, y para la década del 2000 se describió la variante CPV2c, las cuales se diferencian por la posición de los aminoácidos presentes en la posición 426 de la proteína de la cápside VP2; la variante CPV2a se encuentra en la asparagina (Asn), la CPV2b en el ácido aspártico (Asp) y el CPV2c en el ácido glutámico (Glu) (Decaro et al, 2012)

Es un virus altamente contagioso, que provoca una gastroenteritis hemorrágica severa de aparición súbita, de rápido progreso, caracterizada por vómitos, diarrea sanguinolenta, no

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

sanguinolenta y en algunos casos provoca muerte por miocarditis (Guerrero, 2009). Se elimina por las heces, pero también por saliva y vómito en menor cantidad, aunque su capacidad para infectar se debe en mayor proporción por su estabilidad en el ambiente, se inactiva a través de la desinfección con glutaraldehído, hipoclorito de sodio (lejía doméstica) o formalina. (Hoskins, 1997).

El principal síntoma de la gastroenteritis viral es la diarrea, y esta se presenta en la fase virémica tardía, 3 a 5 días post infección, durante este periodo, el virus es excretado por las heces en grandes cantidades, en esta etapa el virus ha generado un daño en la superficie de absorción del intestino delgado, alterando el epitelio de la mucosa gástrica, con un consecuente aumento de presiones que conlleva a una pérdida de agua, electrolitos, proteínas y sangre, por ende los pacientes tendrán una marcada deshidratación, hipoproteinemia, anemia, caquexia, inapetencia, fiebre, neutropenia, linfopenia, y en muchos casos los paciente mueren por shock y/o sepsis. (Grant Maxie, 2007).

El diagnóstico de este virus es una herramienta clave para implementar un tratamiento adecuado, y así evitar falsos positivos o falsos negativos, que conllevan a un inadecuado manejo clínico, para esto es muy importante el uso de métodos diagnósticos con una alta sensibilidad y especificidad como la reacción en cadena de polimerasa (PCR); se puede amplificar una región específica donde probablemente se encuentra el virus y con esto obtener un correcto diagnóstico.

2.2 Revisión Bibliográfica

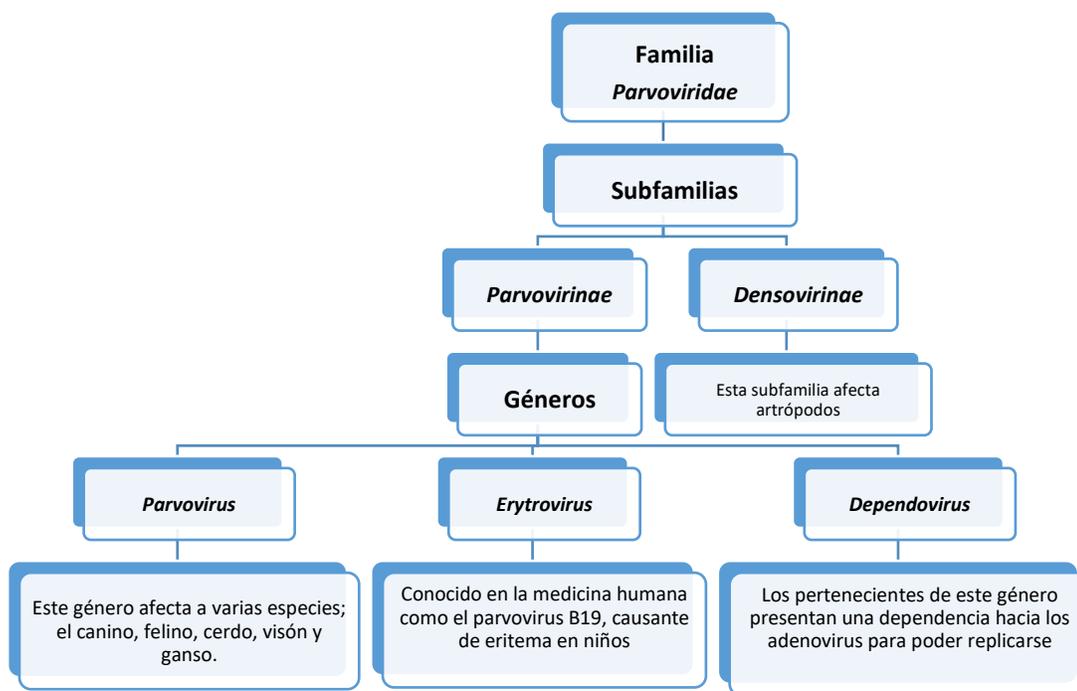
2.2.1 Etiología

El parvovirus canino se divide en dos tipos el CPV-1 y el CPV-2, pero no se relacionan entre sí. El CPV-1 es denominado el Virus del Minuto Canino, es un parvovirus autónomo que se aisló por primera vez en 1967 a partir de heces en perros sin ninguna patología aparente, sin embargo, se caracteriza por producir abortos, aunque en la mayoría de los casos este actúa de forma asintomática. (Mochizuki et al, 2002). Diez años más tarde en 1978 apareció el CPV-2 con una alta virulencia generando una pandemia que afectó a muchos cachorros, provocando una gastroenteritis súbita caracterizada por síntomas como diarrea hemorrágica, vómitos, con desenlaces fatales que generó una alarma para los médicos veterinarios en esa época (Hashimoto et al, 1994).

Se cree que el CPV-2 se originó a partir de seis o siete mutaciones generadas en la cadena de aminoácidos de la proteína de la cápside VP2 del virus de panleucopenia felina, evolucionando y adaptándose en los caninos (Oliveira et al, 2018). En aislamientos realizados en ambos virus se muestra que antigénicamente son muy parecidos, con una disparidad de un 2% en la secuencia de ADN genómico, que con la utilización de anticuerpos monoclonales (MAbs) concretos evidencia que presentan una desigualdad en el Ph de hemaglutinación, siendo más bajo en el FPV, así mismo en cultivos realizados para determinar su nivel de replicación se evidenció que las cepas del FPV no replica en células canina cultivadas, por su parte el CPV-2 si réplica en cultivos de células felinas, otra diferencia analizada es la leucopenia profunda que genera en gatos el FPV y en perros el CPV-2 produce una linfopenia relativa (Truyen & Parrish, 1992)

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

El parvovirus canino taxonómicamente pertenece a la familia parvoviridae, subfamilias parvovirinae y densovirinae (Figura 1), la primera se divide en los géneros parvovirus que afecta a una variedad de especies; canidos y felinos domésticos y salvajes, cerdos, gansos y visones, erythrovirus causante de eritema en niños y es conocido como el parvovirus B19 y dependovirus que requiere de la presencia de un adenovirus para poder replicarse, la segunda subfamilia afecta específicamente artrópodos (Cotmore et al, 2014).

Figura 1*Taxonomía de la Familia Parvoviridae*

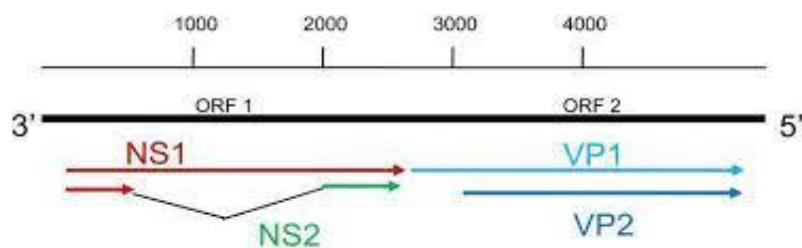
Fuente: Carrero (2022).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

El CPV es un virus diminuto, que no posee envoltura, contenido en un genoma de ADN monocatenario con polaridad negativa, su cápside es icosaédrica y mide aproximadamente 26 nm de diámetro, conformado por 60 copias de una combinación de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 (Parker & Parrish, 1997). Su genoma está compuesto por 5200 nucleótidos de ADN monocatenario (ssADN) e incluye dos marcos de lectura abiertos (ORF). El primero codifica para proteínas no estructurales (NS1 y NS2), que participan en la replicación de ADN, el transporte viral y ensamblaje de la cápside, y el segundo ORF codifica las proteínas estructurales de la cápside “VP1 y VP2” (Figura 2). La proteína VP2 tiene 582 residuos de aminoácidos y es la más abundante e inmunogénica cumpliendo un papel importante en el tropismo viral y la variedad del huésped (Véliz et al, 2021).

Figura 2

Esquema del Genoma del Parvovirus Canino



Fuente: Grecco (2014).

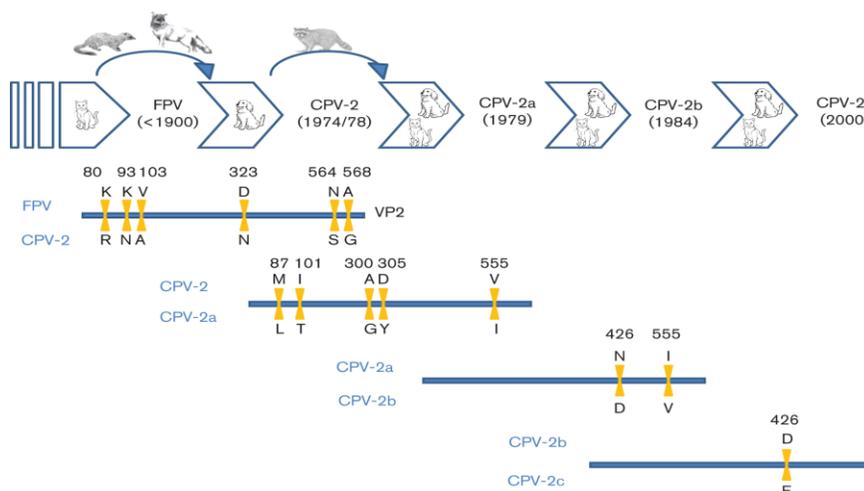
Nota: Esquema del genoma de parvovirus canino. Adaptado de (<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/8864/1/uy24-17255.pdf>).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Un año después, luego de la aparición del CPV-2 en 1979, se describió una nueva variante antigénica denominada CPV-2a, que tuvo una rápida distribución a nivel mundial sustituyendo la cepa original, diferenciándose de ésta por cinco sustituciones en la secuencia de la cápside que comprendía cambios en los residuos VP2 87 de Met a Leu, 300 de Ala a Gly y 305 de Asp a Tyr, esta nueva variante poseía la capacidad de infectar gatos. Cinco años más tarde en 1984 surgió una nueva variante antigénica, que se diferenciaba por un epítopo antigénico resultante de un reemplazo del residuo 426 de VP2 de Asn a Asp y de Ile a Val en el residuo 555. En el 2000 surgió otra nueva variante antigénica donde se sustituyó una Asp por Glu en la posición 426, esta presentó una rápida difusión en las poblaciones de caninos y su patogenicidad era mucho mayor, afectando a caninos adultos y gatos y fue denominada la variante CPV-2c. (Figura 3) (Hueffer et al, 2003).

Figura 3

Variantes Antigénicas del CPV-2a



Fuente: Miranda et al (2016).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Nota: Procesos evolutivos de CPV-2 en perros. Adaptado de (<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000540#tab2>).

2.2.2 Epidemiología

El parvovirus canino se encuentra disperso en todos los continentes, sus mutaciones y la alta virulencia le ha permitido permanecer resistente en diversos ambientes. Su aparición a finales de los años 70 fue reportada en diferentes países como Japón, Bélgica, Australia, EE. UU, etc., luego de su primera mutación se extendió hacia Francia, Dinamarca, entre los años 1979 y 1982 reemplazando en su totalidad a la cepa original, el CPV-2a obtuvo una mayor ventaja epidemiológica, causando infección con mayor facilidad en los caninos, debido a que desarrolló una gran analogía hacia los receptores de las células de los caninos, en comparación con la variante original. No obstante, no se mantuvo así durante mucho tiempo, en 1984 sorprendió con una nueva variante antigénica la CPV-2b reportada en EE. UU, seis años más tarde, para el año 2000 se registró una nueva mutación, mucho más virulenta que las anteriores denominada CPV-2c, notificada en Italia, aunque se menciona que cuatro años antes circulaba en Alemania, se incluye también en Sur América (Uruguay, Argentina, Brasil, Chile). La resistencia, adaptación, fácil diseminación, características fenotípicas y ventajas epidemiológicas son propiedades del virus que le ha permitido mantenerse estable durante muchos años, además de evolucionar mediante diversas variaciones antigénicas. (Pérez et al, 2014 citado en Tuteja et al, 2022).

El contagio ocurre mediante transmisión horizontal con el contacto a través de superficies contaminadas con el virus; heces, vómitos, secreciones, pelaje contaminado, agua o alimentos, también se ha evidenciado transmisión transplacentaria. Afecta en su mayoría a cachorros a partir de la sexta semana cuando ya han perdido la inmunidad maternal, sin embargo, deficientes

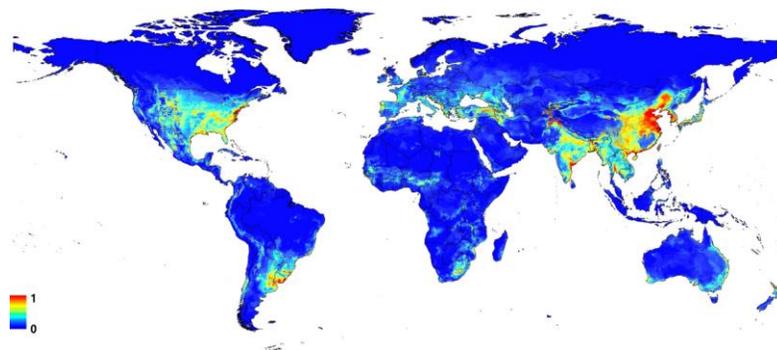
ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

condiciones de manejo, albergues con grandes poblaciones de caninos, parasitosis, estrés, enfermedades concurrentes pueden inducir a la presentación de la enfermedad en animales adultos (Guerrero, 2009). Se ha analizado que las condiciones ambientales; clima, geografía, están relacionados con la difusión y el contagio del virus. Mediante un estudio realizado por (Jiang, 2018) en el que analizó las variables bioclimáticas y altitudinales que influyen en la distribución potencial del CPV2 a nivel mundial, donde determinó que la isothermalidad, la altitud, la precipitación de noviembre, la temperatura máxima del mes más cálido, la precipitación del trimestre más cálido, son variables de gran importancia que cooperan en la distribución del virus, obteniendo un aporte del 77.7%. Asimismo informó que el elevado riesgo de incidencia del CPV-2 ocurre en la zona oriental de Asia, (incluyendo las áreas costeras centrales y orientales de China, Japón, Corea), del sur (que comprende gran parte de la India, Bangladesh, Myanmar, sur de Tailandia, noreste de Vietnam, centro de Camboya; incluyendo la zona central y oriental de América central y el este), Europa (centro y norte de Portugal, centro de Francia e Italia), sur de América del Norte (EE. UU, norte de México) y América del Sur (este de Argentina, Uruguay, sur y costa de Brasil y sur de Chile) (Figura 4).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Figura 4

Distribuciones Geográficas Potenciales Previstas para CPV-2 en el Mundo



Fuente: Jiang (2018).

Nota: Variables bioclimáticas y altitudinales influyen en la distribución potencial del parvovirus canino tipo 2 a nivel mundial. Adaptado de (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ece3.3994>).

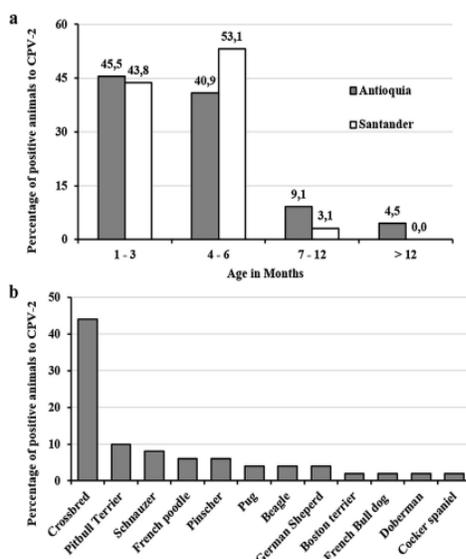
En Colombia el virus fue identificado por primera vez en 1982, se reporta que para esa época se presentó con una alta morbilidad y mortalidad en cachorros (Díaz, 2008). En un estudio efectuado por (Duque et al, 2017), donde el objetivo era realizar una caracterización de la presentación del CPV-2 en los departamentos de Antioquia y Santander, se determinó que la prevalencia del CPV-2 fue mayor en departamento de Santander con un 84.85% en comparación con Antioquia que obtuvo un 56.41%, para la diferenciación de las variantes el estudio demostró la presencia de CPV-2a y CPV-2b en los dos departamentos, pero no se evidenció la presencia de la variante CPV-2c en las muestras amplificadas. Según el rango de edad con base a muestras positivas el estudio detectó un mayor porcentaje de cachorros infectados entre los 4 y 6 meses siendo el departamento de Santander el que presentó más alto con 53.1%, (Figura 5a) no obstante

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

se evidenció infección en pacientes adultos mayores de un año con un 4.5%, y en cuanto a las razas más sensibles a las infección se determinó que las razas con más sensibilidad a presentar la infección son más mestizas y con menos prevalencia la Cocker Spaniel (Figura 5b).

Figura 5

Porcentaje y Distribución de Pacientes Positivos Según la Edad y la Raza



Fuente: Duque et al (2017).

Nota: Prevalencia del CPV-2 según la edad y la raza Adaptado de (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28284623/>)

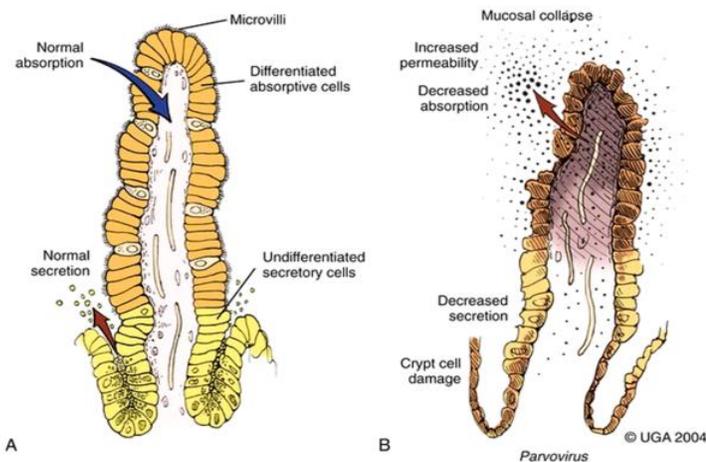
2.2.3 Patogenia

El virus luego de ingresar por vía oronasal, invade y se replica en tejidos con un alto grado de mitosis, como el tejido linfoide de la orofaringe, ganglios linfáticos mesentéricos y el

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

timo, tras haberse replicado en la faringe este se dirige hacia el torrente sanguíneo hasta llegar a la médula ósea, donde se encarga de infectar a los glóbulos blancos, causando de esta forma una profunda leucopenia, cinco días postinfección este causa viremia diseminándose hacia las criptas intestinales del intestino delgado causando diarrea. (Pollock et Coyne, 1993). Las células epiteliales del intestino maduran en las criptas de Lieberkühn y luego se dirigen del epitelio germinal de las criptas a las vellosidades, debido que la tarea de estas células es colaborar con la absorción de nutrientes y el virus daña las criptas de Lieberkühn genera una parálisis de las vellosidades, impidiendo un correcto funcionamiento. (Geeta, 2015 citado en Tuteja et al, 2022). Luego de la viremia este se localiza de manera predominante en el epitelio que recubre la lengua, mucosa oral, esófago, intestino delgado, tejido linfoide (timo, ganglios linfáticos y médula ósea) y se aísla también en pulmón, bazo, hígado, riñones y miocardio. Debido a la inflamación, colapso de las vellosidades y necrosis (Figura 6), la flora microbiana entérica gramnegativa normal cambia, generando infecciones bacterianas secundarias, adicionando complicaciones que pueden traer consecuencias graves como bacteriemia, endotoxemia y CID. El virus comienza a excretarse de forma activa a través de las heces 3 a 4 días posteriores a la infección, en ocasiones en esta etapa no existen signos clínicos, luego de 7 a 10 días, en la fase aguda se elimina de forma extensa a través de heces diarreicas (Guerrero, 2009).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Figura 6*Tracto Gastrointestinal Normal vs Afectado por CPV-2*

Fuente: Greene, 2005 citado en Tuteja (2022).

Nota: Comparativo entre un tracto gastrointestinal normal y otro afectado por CPV-2.

Adaptado de (<https://www-sciencedirect-com.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S0147957122000224>)

En algunos casos el virus puede replicarse en el músculo cardíaco, provocando miocarditis e insuficiencia cardíaca, y esto ocurre en casos de cachorros gestados por madres infectadas por CPV-2, o en cachorros que no recibieron los títulos de anticuerpos derivados de la madre (MAD) que los protegen de infecciones en las primeras 6 semanas de vida (Ford et al, 2017 citando en Tuteja et al, 2022)

2.2.4 Manifestaciones clínicas

La intensidad de los signos y síntomas clínicos varían con base a la edad, MAD, estado vacunal, duración de la enfermedad, entre otros. Sin embargo, estos se pueden presentar en tres formas; gastrointestinal, neurológica y cardíaca.

2.2.4.1 Forma Gastrointestinal. Los signos y síntomas clínicos del CPV-2 comienzan durante la fase virémica, aproximadamente de 5 a 7 días postinfección (Bamford & Zuckerman, 2021). Los pacientes muestran signos de dolor extremo, los primeros síntomas son la inapetencia, depresión, emesis en algunas ocasiones con hematemesis, diarrea intensa e hipertermia que fluctúa conforme aumentan los episodios de emesis y diarrea, resultando en normotermia o hipotermia. (Nandi & Kumar, 2010). La apariencia de la diarrea es variable en aspecto y consistencia, pudiéndose tornar de blanda a mucoide o líquida y hemorrágica, esto debido a que el epitelio de revestimiento de la mucosa intestinal se desprende y como consecuencia se excretan heces gelatinosas con coloración rojiza. Debido a los diversos episodios de vómito, diarrea e hipertermia, se pierden gran cantidad de líquidos, que conlleva a una deshidratación intersticial, que de no ser tratada a tiempo puede desencadenar a un shock hipovolémico súbito. (Mazzafarro, 2020).

La inmunosupresión es otro signo marcado y se caracteriza por linfopenia y posible panleucopenia, que unida al daño del revestimiento de células epiteliales, permiten el ingreso de bacterias y toxinas al torrente sanguíneo, lo que conlleva a septicemia, endotoxemia, inflamación sistémica, trastornos de la coagulación y shock séptico (Ford et al, 2017 citando en Franzo et al, 2019).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

2.2.4.2 Forma Neurológica. El daño en las vellosidades intestinales evita la absorción de nutrientes, que acompañada de la bacteriemia sistémica y la deficiencia de reservas de glucógeno hepático y muscular resultan en una baja importante de la glucemia, que trae como consecuencia una neuroglucopenia y convulsiones. (Mazzaferro, 2020)

2.2.4.3 Forma Cardíaca. La miocarditis es otro signo que suele presentarse en cachorros de perras que no han sido vacunadas, afectando a los cachorros menores de 3 meses, en la mayoría de los casos fallecen de manera súbita por insuficiencia cardíaca aguda entre las 4 y 8 semanas de edad (Mochizuki et al, 1996 citado en Nandi et Kumar, 2010) antes de sucumbir, estos se presentan con extremidades frías, disnea, mucosas de pálidas a cianóticas, y convulsiones, los cachorros mayores de 8 semanas suelen presentar insuficiencia cardíaca subaguda y presentan síntomas de taquipnea y disnea, acentuada durante el ejercicio, en casos más avanzados se evidencian con distensión abdominal, hepatomegalia y ascitis con líquido sanguinolento, estos cachorros no suelen presentar diarrea debido a que el virus se replica de forma predilecta en los miocitos cardíacos inmaduros, hay evidencia en una pequeña población de cachorros que sobreviven, pero quedan con secuelas y suelen morir en edad adulta por la misma causa (Carpenter et al, 1980 citado en Nandi et Kumar, 2010).

2.2.5 Métodos diagnósticos

El diagnóstico del *Parvovirus canino*, ha venido evolucionando a lo largo de los años, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas ha permitido disminuir la mortalidad y diseminación de este virus. No obstante, la sensibilidad y especificidad no es la misma para todas, lo que ha complicado la veracidad del diagnóstico, dificultando la implementación de un correcto tratamiento. Las principales pruebas diagnósticas usadas en Medicina Veterinaria para la

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

detección de parvovirus canina son el hemograma, hemaglutinación (HA) e inhibición de la hemaglutinación (IA), microscopia electrónica, aislamiento viral y cultivo celular, inmunofluorescencia, inmunocromatografía, ensayo de inmunoadsorción Ligada a Enzimas (ELISA), y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tuteja et al, 2022).

2.2.5.1 Hemograma. Debido a que el parvovirus canino se replica de forma activa en la médula ósea, causa anemia aplásica, un hallazgo al hemograma, es el recuento de linfocitos y leucocitos por debajo de los valores normales, aunque esto no determina un diagnóstico certero de la enfermedad, sirve como predictivo para establecer un diagnóstico presuntivo (Goddard et al, 2008)

2.2.5.2 Hemaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación. La HA y IA son técnicas que emplean el uso de eritrocitos frescos de cerdos, el CPV-2 tiene la capacidad de aglutinar estos glóbulos rojos, por su propiedad de unión al ácido siálico (SA), se analiza la presencia y/o ausencia del virus durante la etapa de excreción viral en materia fecal, o en tejidos frescos, al mezclar los eritrocitos con una suspensión de materia fecal, si estos aglutinan se confirma la presencia de CPV-2 (Flores, 1987). Esta técnica diagnóstica se ve dificultada, debido a que los eritrocitos deben estar frescos, además su sensibilidad es baja de un 65.3%, por eso se emplea muy poco para el diagnóstico de la parvovirus canina (Mazzaferro, 2020).

2.2.5.3 Microscopía Electrónica. Este método diagnóstico se implementa durante la fase aguda de la enfermedad, ya que en esta etapa hay abundantes partículas virales en las heces, pudiendo ser detectadas con tinción negativa e identificación con el uso de anticuerpos contra el parvovirus canino o virus de panleucopenia felina. (Nandi & Kumar, 2010)

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

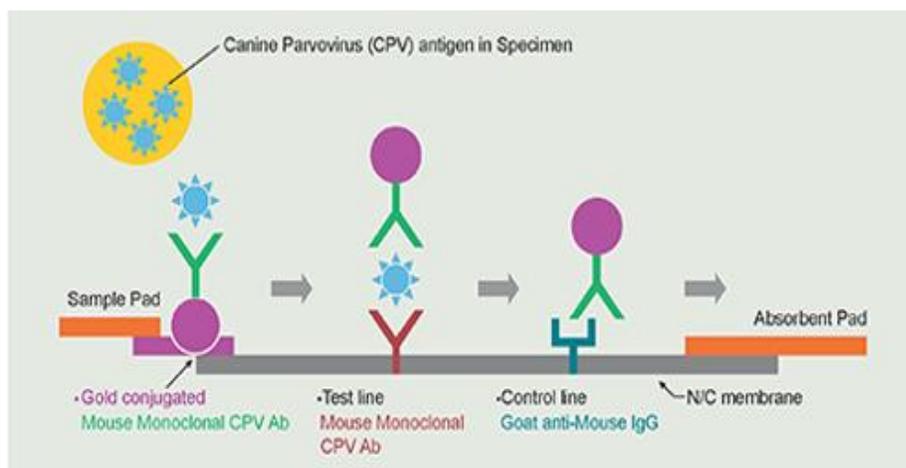
2.2.5.4 Aislamiento Viral y Cultivo Celular. El aislamiento viral, se usó ampliamente para el diagnóstico de CPV-2, su sensibilidad y especificidad son altas, aunque ha sido reemplazado por técnicas de Biología Molecular mucho más sensibles, económicas, rápidas y menos laboriosas. El cultivo celular se ejecuta con el uso de fragmentos de órganos o tejidos, en una base de vidrio, donde las células se pegan y llegan a proliferar por toda la superficie de este (Sandin, 2004).

2.2.5.5 Inmunofluorescencia. Este tipo de pruebas se fundamentan en la utilización de anticuerpos específicos de CPV-2, se realiza de forma directa o indirecta, sobre un portaobjetos se extiende la muestra clínica, y el anticuerpo es marcado con fluoresceína, o se emplea el uso de un segundo anticuerpo que este marcado con un fluorocromo, frente al anticuerpo primario, respectivamente. Al observar al microscopio, en un fondo oscuro se evidenciará la fluorescencia en el microorganismo (Sandin, 2004)

2.2.5.6 Inmunocromatografía. Es una de las técnicas diagnósticas más utilizadas en clínicas veterinarias, por su gran practicidad y rapidez, (Figura 7) se realiza en una placa compuesta por una membrana de nitrocelulosa o nylon, que contiene los anticuerpos contra el antígeno del CPV, absorbidos en la línea de reacción, en la línea control se encuentran los anticuerpos anti conjugados, los cuales son específicos frente a CPV y están marcados con una molécula de oro coloidal, que corre también por la membrana, y es detenido por el anticuerpo en la línea control y por el antígeno en la línea de reacción, en caso de no haber presencia de antígeno, este se mostrará solo en la línea control (Alonso, et al, 2005). En la actualidad existen una gran variedad de test de SNAP, que cuentan con alta especificidad, pero su sensibilidad es baja, de un 50% a 80%, esto debido que en etapas iniciales de la infección, hay un gran cantidad

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

de títulos de anticuerpos combatiendo el CPV en el lumen intestinal, reteniendo partículas virales, y como resultado, la carga viral que se excreta en las heces es baja, y el test requiere que las heces contengan, por los menos, 10×6 copias de ADN por miligramo de heces, para obtener un resultado positivo, de lo contrario se producen falsos negativos (Mazzaferro, 2020) por otro lado, las aplicaciones de vacunas vivas modificadas contra CPV suele arrojar falsos positivos en estas pruebas, debido a que se excretan partículas virales de 3 a 10 días posteriores a la vacunación. (Decaro et al, 2012)

Figura 7*Principio del Test Inmunocromatográfico Parvovirus*

Fuente: Modern Veterinary Therapeutics, s.f.

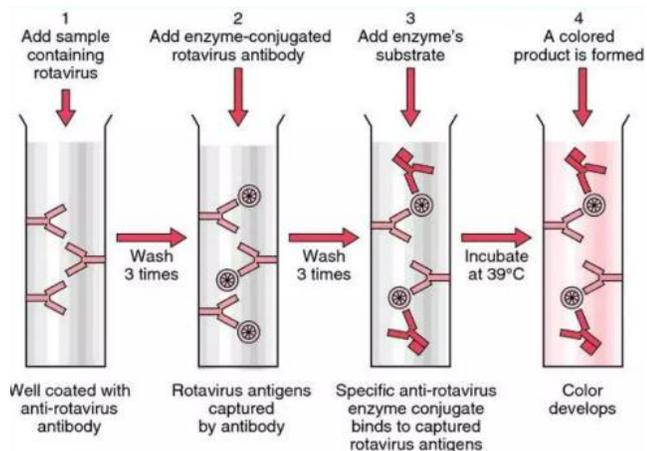
Nota: Fundamento del test de antígeno de parvovirus canino. Adaptado de <http://modernveterinarytherapeutics.com/canine-parvovirus-antigen-test-kit/#1470024579482-216f6257-8ba42f8c-ac46>

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

2.2.5.7 Ensayo de Inmunoadsorción Ligada a Enzimas (ELISA). Esta técnica permite la detección de anticuerpos IgM, específicos de CPV-2, es un método eficaz, rápido y con una alta sensibilidad, se fundamenta en el uso de un anticuerpo conjugado con una enzima, la más usada para esta técnica es la peroxidasa o fosfatasa alcalina, que crea un complejo antígeno anticuerpo, el cual amplifica la reacción, resultado en un producto de color (Figura 8) (Fierro, 2019).

Figura 8

Fundamento del Ensayo de Inmunoadsorción Ligada a Enzimas



Fuente: Chávez Libna (2016).

Nota: Procedimiento para llevar a cabo un Elisa. Adaptado de

<https://www.slideshare.net/libnachavez/prueba-elisa-64640059>

2.2.5.8 Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática de forma in vitro que permite obtener la amplificación de millones de veces de una secuencia de ADN de interés durante varios ciclos

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

con condiciones específicas y repetidas en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para esto, en la PCR es fundamental la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células (Tamay de Dios et al., 2013).

El método PCR usa ADN de diferentes orígenes, el cual es extraído mediante diferentes métodos, según la necesidad. Para la extracción del ADN de CPV-2 en muestras de sangre se usó el método de fenol cloroformo alcohol isoamílico y extracción mediante Kit High Pure PCR Template Preparation Roche ®, para las muestras de hisopado rectal se empleó el método de Boiling snap o Fast Boilin (Desai et al, 2020)

Fundamento del método fenol cloroformo alcohol isoamílico (PCI). Su fundamento se basa en la lisis celular, a través del manejo de detergentes con la subsiguiente eliminación de proteínas por medio de su extracción y la de componentes lipídicos con solventes orgánicos, obteniendo como resultado un ADN puro que es separado mediante la precipitación con soluciones alcohólicas (Salazar et al, 2013).

Fundamento del método por Kit High Pure PCR Template Preparation. Las células sanguíneas o el tejido se lisan mediante una breve incubación con un tampón de lisis especial y proteinasa K en presencia de sales caotrópicas como el clorhidrato de guanidina, que inactiva inmediatamente todas las nucleasas. Los ácidos nucleicos celulares se unen selectivamente a fibras de vidrio especiales envasadas en tubos de filtro de purificación de alta pureza. Los ácidos nucleicos unidos se purifican mediante una serie de pasos rápidos de lavado y centrifugación para eliminar los componentes celulares contaminantes. Finalmente, la elución baja en sal libera ácidos nucleicos de las fibras de vidrio. Este método simple elimina la necesidad de extracción

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

con solventes orgánicos y precipitación de ADN, lo que permite una rápida purificación de muchas muestras simultáneamente (Roche, 2022).

Fundamento del método Boiling Snap. El protocolo de extracción viral “Boiling snap” o “Fast boiling”, es un método que se fundamenta en la homogeneización de las muestras de materia fecal con un buffer fosfato salino (PBS), seguidamente se almacenan a temperatura de ebullición durante un periodo determinado de tiempo, con el objetivo de liberar los componentes celulares y virales, luego se llevan a bajas temperaturas generando un choque térmico que permite inhibir la actividad enzimática, posteriormente se precipitan los contaminantes y remanentes celulares en un ciclo de centrifugado y a continuación se extrae el sobrenadante que contiene el ADN viral que será usado como molde de la PCR (Schunck et al, 1995).

Para la realización de la PCR se deben tener en cuenta los siguientes elementos: (Figura 9) inicialmente, la muestra de ADN, la cual se añade en un tubo Eppendorf junto con los primers que son secuencias específicas del microorganismo a diagnosticar, es un par de secuencias una denominada forward y otra reverse, son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar. Los desoxinucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), estos son las bases nitrogenadas con las que se construirán las nuevas secuencias de ADN. la ADN polimerasa, la cual se encarga de la catálisis de la reacción, sintetizando las nuevas cadenas de ADN que llevan la secuencia blanco y finalmente, un cofactor de esta enzima que normalmente es Magnesio (Mg⁺), El magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción (Diz, 2020).

Figura 9*Elementos Necesarios para la Elaboración de la PCR*

Fuente: Diz (2020).

Nota: Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

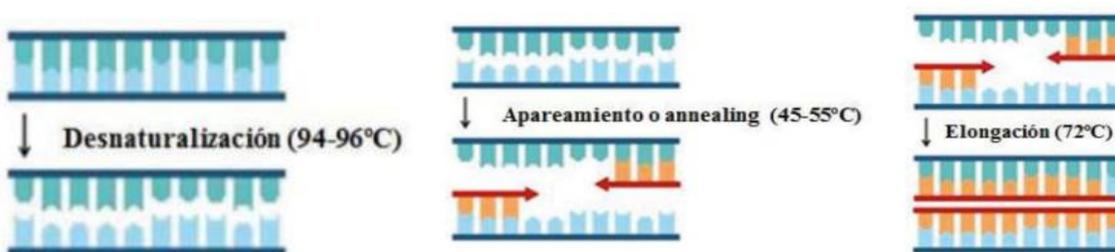
PCR de punto final. La PCR se lleva a cabo en tres fases principales: (Figura 10) fase de desnaturalización, en esta etapa se da el rompimiento de los puentes de hidrógeno de la secuencia. Las cadenas de ADN son calentadas y separadas a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos, esto depende de la cantidad de G-C y A-T en la secuencia. En la fase de hibridación o annealing, se da la unión de los primers a la secuencia concreta que se ha separado en la fase anterior. La temperatura en esta fase es mucho más baja y dependerá de los primers utilizados (45-55 °C) y finalmente, en la fase de elongación, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers conformado y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida. La Taq polimerasa agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional (Diz O, 2020).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Una vez realizada la amplificación de las secuencias de interés y conocer si el procedimiento fue el óptimo, se debe visualizar los mismos a través de un gel de agarosa entre 1.2 a 2% (Lee et al., 2012) dicha visualización se basa en un proceso de migración de acuerdo al tamaño de los amplicones y por la polaridad influida por dos campos eléctricos (Tamay de Dios et al., 2013; Diz O, 2020).

Figura 10

Fases de la PCR



Fuente: Diz (2020)

Nota: Fase de desnaturalización, annealing y elongación en una PCR de punto final

PCR en tiempo real. El término PCR en tiempo real se refiere a la detección de los productos amplificados cuando esta sucede en cada ciclo de la reacción, de esta forma se combina la amplificación y la detección en una misma etapa mediante una señal de fluorescencia (Tamay de Dios et al., 2013).

Entre las características más destacables de la PCR en tiempo real se encuentra su alta especificidad, sensibilidad y eficiencia; mayor rango de detección, rapidez en la visualización del

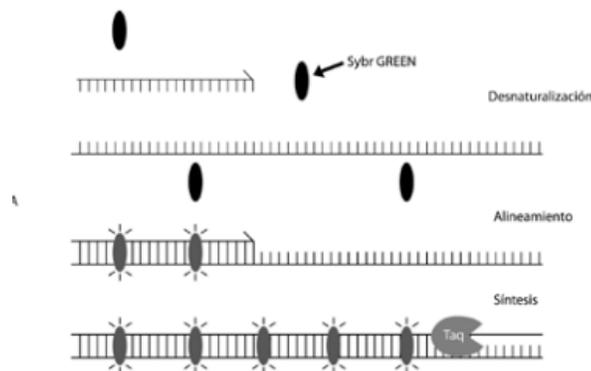
ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

amplificado debido a que no es necesario realizar una electroforesis y finalmente, permite detectar diferencias de una sola copia del ADN (Wong & Medrano 2005, Aguilera et al., 2015).

En las amplificaciones por PCR en tiempo real, se utiliza un sistema basado en reporteros fluorescentes o conocidos también como fluoróforos (Foy & Parkes, 2001). Estos fluoróforos emiten fluorescencia cuando se unen al ADN. Uno de los reporteros más utilizado es SYBR Green, el cual se intercala en el surco menor del ADN de doble cadena. La fluorescencia emitida está relacionada con la cantidad de ADN, es decir, mientras más ADN de doble cadena se encuentre en el tubo de reacción, mayor será la unión y la señal de fluorescencia del SYBR Green (Figura 11) (Aguilera et al., 2015).

Figura 11

Mecanismo de incorporación del SYBR Green



Fuente: Aguilera et al, 2015

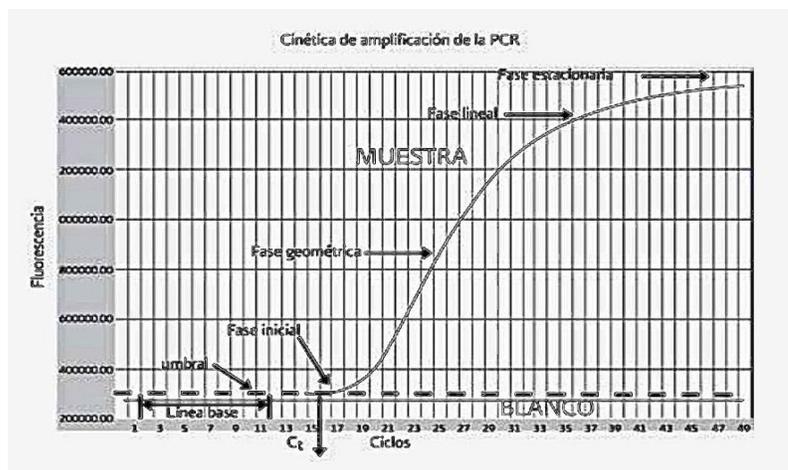
Nota: Mecanismo de incorporación del SYBR Green en PCR en tiempo real.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

La cinética de la amplificación se divide en cuatro fases: inicial o basal, se da entre los primeros 10 a 15 ciclos en este punto la fluorescencia es insuficiente. (Figura 12) En la fase geométrica, los reactivos de la reacción se encuentran abundantemente por lo que la amplificación tiene una eficiencia cercana al 100%, en esta etapa, la curva se hace evidente debido a que se genera el C_t (Cycle threshold), el cual consiste en el número de ciclos que se necesitan para que la curva alcance un umbral en la señal emitida por la fluorescencia, este es proporcional a la cantidad de ADN contenido en una muestra, entre más concentrado, menos ciclos (C_t) se necesitaran para alcanzar el umbral, posterior a esta etapa se refleja una fase lineal, correspondiente al momento en que los reactivos empiezan a ser limitantes en la reacción y se presenta un decaimiento de la actividad enzimática en la amplificación. Finalmente, en la fase estacionaria la reacción está saturada por lo tanto la amplificación se detiene debido a que cada uno de los componentes de la reacción se agotaron por lo tanto la cantidad de amplificados será el mismo, aunque se incrementen los números de ciclos (Aguilera et al., 2015).

Figura 12

Cinética de amplificación de la qPCR



ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Fuente: Aguilera et al, 2015.

Nota: Mecanismo de amplificación en PCR en tiempo real.

Por todo lo anterior, la PCR en tiempo real ha sido ampliamente utilizada como una herramienta esencial en el diagnóstico molecular para la detección de microorganismos como los virus a nivel de presencia/ausencia o determinación de carga viral, haciendo uso de diferentes tipos de muestras como tejidos frescos, secreciones corporales, sangre total, plasma, leucocitos, materia fecal entre otros. De esta forma, se establece que la PCR en tiempo real es una alternativa para el diagnóstico oportuno, confiable y reproducible de la parvovirus canina (CPV-2).

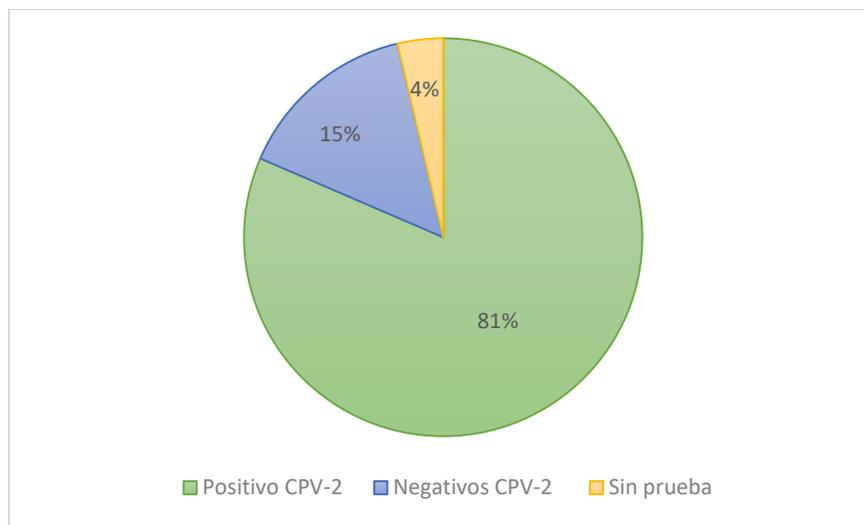
Capítulo III

3.1 Metodología

Se muestrearon 27 caninos (Anexo A) en veterinarias de la ciudad de Pamplona y Cúcuta en Norte de Santander, los criterios de inclusión empleados para este estudio fueron pacientes únicamente con sintomatología gastrointestinal, compatible a CPV-2 (vómitos, diarrea sanguinolenta y no sanguinolenta), sin importar la raza, el sexo ni la edad. Los caninos muestreados 22/27 (81%) presentaban test CPV Ag positivo, 4/27 (15%) negativo y sin test 1/27 (4%) (Figura 13), los rangos de edad oscilaron entre los 2 meses y 2 años de edad, de diferentes razas. En general se tomaron muestras de sangre por venopunción e hisopados rectales. Las muestras fueron tomadas durante la consulta y/o hospitalización.

Figura 13

Pacientes Positivos y Negativos según Test Snap



Fuente: Carrero (2022).

3.1.1 Recolección y Conservación de las Muestras

3.1.1.1 Muestras de Sangre. Las muestras de sangre fueron tomadas por venopunción en vena cefálica y/o yugular, con previa asepsia se hizo punción con el uso de una jeringa y aguja hipodérmica de 3 ml, recolectadas en tubos con EDTA, un volumen de sangre entre 200 a 500 μ l fue utilizado para realizar precipitación de glóbulos blancos mediante la utilización de un buffer de lisis de rojos (NH_4CL , EDTA y NaHCO_3) y lavados a una proporción 1:3, donde se añadieron 300 μ l de sangre y 900 μ l de buffer de lisis, se dejó reposar durante 10 minutos y se llevó a centrifugar durante 10 min a 3000 RPM, se descartó el sobrenadante, se agregó 900 μ l de buffer de lisis al pellet y se llevó a centrifugar por 10 min a 3000 RPM, se repitió el procedimiento hasta que la muestra quedó clarificada y libre de glóbulos rojos, se eliminó el

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

sobrenadante, los glóbulos blancos obtenidos se resuspendieron en 100 μ l de buffer de lisis de High Pure PCR Template Preparation Kit Roche.

3.1.1.1 Muestras de Hisopado rectal. Las muestras fueron tomadas introduciendo un hisopo de algodón estéril, 3 cm en el canal anal ejecutando movimientos circulares, se conservaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml que contenía 500 μ l fosfato buffer salino (PBS), su transporte y almacenamiento fue a 4°C hasta su uso. Previo a la extracción se centrifugaron por 2 minutos a 5000 RPM, se descartó el sobrenadante, se añadió 200 μ l de PBS y se homogeneizó con vortex durante 2 minutos, se giró el hisopo dejando el Cotton en la parte superior del tubo y se centrifugaron a 8000 RPM durante 10 minutos, se tomaron 200 μ l del sobrenadante y se llevaron a un tubo Eppendorf. Se tomaron 200 μ l de materia fecal y se les añadió 1 ml de PBS, se agitaron en vortex durante 1 minuto y se centrifugaron a 7000 RPM por 5 minutos, se extrajeron 200 μ l de sobrenadante y se llevaron a un tubo Eppendorf.

3.1.1.2 Vacunas. Se emplearon 2 vacunas vivas liofilizada de Procyon® Dog Pv (MSD) con 10x5 partículas virales contenidas en un vial de 1 ml, destinadas como control positivo para la PCR, cada ml de contenido se llevó a un tubo Eppendorf se centrifugó a 7000 RPM durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 ml de PBS, se centrifugó a 7000 RPM durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se le adicionaron 100 μ l de buffer de elución al precipitado.

3.1.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante tres diferentes métodos diagnósticos; fenol cloroformo alcohol isoamílico para las muestras de sangre, High Pure PCR Template

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Preparation Kit (Roche) para muestras de sangre y el método de enfriamiento *Boiling snap* para las muestras de hisopado rectal.

3.1.2.1 Método Fenol Cloroformo Alcohol Isoamílico (PCI) en muestras de sangre.

Se agregaron 500 µl de fenol a las muestras de glóbulos blancos y vacunas y se mezcló por inversión, se centrifugó a 12000 RPM por 6 min, se extrajo la fase acuosa y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml, se agregaron 500 µl de fenol cloroformo alcohol isoamílico y se centrifugó a 12000 RPM por 6 min, se llevó la fase acuosa a un nuevo tubo Eppendorf y se agregaron 500 µl de cloroformo, se centrifugó a 12000 RPM por 10 min, la fase acuosa se llevó a otro tubo Eppendorf y se agregaron 500 µl de alcohol absoluto y 30 µl de acetato de sodio, se centrifugó a 12000 RPM por 10 min, se eliminó el sobrenadante. Para la precipitación del ADN se agregó 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 RPM por 10 min, se descartó el alcohol y se dejaron secar los tubos por 2 horas y luego se agregó 100 µl de buffer de elución de High Pure PCR Template Preparation Kit Roche.

3.1.2.2 High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) en Muestras de Sangre y

Vacunas. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante del High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Se agregaron 200 µl de la muestra y se le adicionó 200 µl de tampón de binding más 40 µl de proteinasa k, se mezcló e incubó durante 10 minutos a 70°C, se agregó 100 µl de isopropanol y se mezcló durante 15 segundos, se llevó la columna de centrifugación viral proporcionada por el fabricante a un tubo colector y se agregó la mezcla, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 RPM, se descartó el flujo continuo y el tubo colector, la columna se llevó a un nuevo tubo colector, se añadió 500 µl del tampón de eliminación de inhibidores, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 RPM, se descartó el flujo continuo y el tubo

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

colector, se lavó la columna con 500 µl de tampón de lavado, se centrifugó durante 1 minuto a 8000 RPM, se descartó el flujo continuo y se centrifugó a 13000 RPM durante 10 segundos, se descarta el tubo colector y la columna se llevó un tubo Eppendorf, se añadieron 100 µl de tampón de elución atemperado a 70°C, se centrifugó a 8000 RPM durante 1 minuto y el precipitado (ADN purificado) se guardó a -20°C.

3.1.2.3 Método de Enfriamiento Boiling Snap en Muestras de Hisopado Rectal y Materia Fecal. Las muestras fecales fueron llevadas al baño serológico a 95°C durante 10 minutos, inmediatamente se colocaron a -20° C durante 10 minutos, posteriormente se centrifugaron a 5000 RPM por 5 minutos, el sobrenadante fue llevado a un nuevo Eppendorf, se guardó a -20°C.

El ADN resultante de las extracciones fue analizado mediante espectrofotometría de luz UV a 260-280, donde se midió la calidad y concentración del ADN, utilizando un NanodropTM 2000 de la marca Thermo Scientific de Fisher.

3.1.3 PCR de punto final

3.1.3.1 Selección y Verificación de los Cebadores. Se realizó revisión de literatura donde se compararon los cebadores usados por diferentes autores, el par de cebadores que tuvieron mejores resultados en las PCR realizada en diferentes estudios fueron los diseñados por (Pereira et al, 2000) donde se obtuvo una amplificación del genoma de 681 pb, usando un primer *forward* (F) 5'- GAAGAGTGGTTGTAAATAATA-3' y uno *reverse* (R) 5'- CCTATATCACCAAAGTTAGTAG-3' (Tabla 1), asimismo, se llevó a cabo un proceso de bioinformática de los cebadores, donde fueron verificados en la base de datos del GenBank con

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

la herramienta Primer-BLAST, mediante el número de accesoión M38245.1, proporcionado por (Buonavoglia et al, 2001).

Tabla 1

Secuencia de Cebadores para el Diagnóstico de PCR en pacientes sospechosos a parvovirus canina

Nombre del microorganismo	Nombre del primer	Secuencia	Longitud # de bases	Posición del nucleótido	Tamaño del producto	N° accession GenBank
	P2s	5'-GAAGAGTGGTTGTAATAATA-3'	21	3025-3045		
<i>Parvovirus canino</i>	P2as	5'-CCTATATCACCAAAGTTAGTAG-3'	21	3685-3706	681pb	M38245

Fuente: Pereira et al, 2000 citado en Buonavoglia et al (2001).

Nota: Cebadores utilizados para el genotipado y el análisis de secuencias. Adaptado de <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/0022-1317-82-12-3021>

3.1.3.2 Condiciones de la PCR. La reacción se llevó a cabo con el uso de un termociclador SimpliAmp™ de Applied Biosystem™ (Thermo Fisher Scientific). Se tomaron como referencia las condiciones usadas por Pereira et al, 2000, para ejecutar la PCR, esta se realizó mediante dos experimentos, en el cual se montaron cinco muestras, un control positivo y un control negativo, donde se usaron dos diferentes master mix, el primer experimento se realizó con las siguientes condiciones: 12,5 µl de GoTaq® Master Mixes (Promega), 1 pmol/µl de primer forward, 1 pmol/µl de primer reverse, 5 µl de ADN, 5.5 µl de agua libre de nucleasas, para un volumen total de reacción de 25 µl, el segundo experimento se llevó a cabo con 14,25 µl de Master mix de Roche, 1 pmol/µl de primer forward, 1 pmol/µl de primer reverse, 3 µl de

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

ADN, 0,75 µl de Taq polimerasa, para un volumen total de reacción de 20 µl. La amplificación se efectuó con un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ (Fisher Scientific) de 96 pocillos, a una desnaturalización inicial a 95°C durante 7 minutos, 30 ciclos de desnaturalización final a 95°C por 30 segundos, anillamiento a 55°C durante 1 minuto, extensión inicial a 72°C por 1 minuto y extensión final a 72°C por 7 minutos.

3.1.3.3 Electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa preparado al 2% con Tris Borato EDTA, teñido con 3µl de colorante 6x HydraGreen™ Safe Loading Buffer y un marcador de peso molecular GeneRuler 100pb ADN Lader, el corrido se realizó a 80 V constantes durante 1 hora.

3.1.4 PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un termociclador Applied Biosystems™ sistema QuantStudio 5 qPCR (Bloque de 96 de pozos de 0,2ml) de Thermo Fisher Scientific. La mezcla de PCR para una reacción final de 20 µl, contenía; 16,25 µl del mix de PCR en tiempo real (nucleótidos, MgCl₂, buffer y primers marcados con Sybr green), 0,75 µl de Taq-pol y 3 µl de la muestra, las condiciones fueron: desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C donde se activó la Taq polimerasa, y 45 ciclos continuos de desnaturalización a 95°C durante 10 segundos, luego a 60°C durante 30 segundos, luego el anillamiento a 95°C durante 30 segundos y extensión durante 10 segundos más, posterior se llevó a segundos para llevar a cabo el ciclo de extensión a 72°C durante 15 segundos.

Capítulo IV

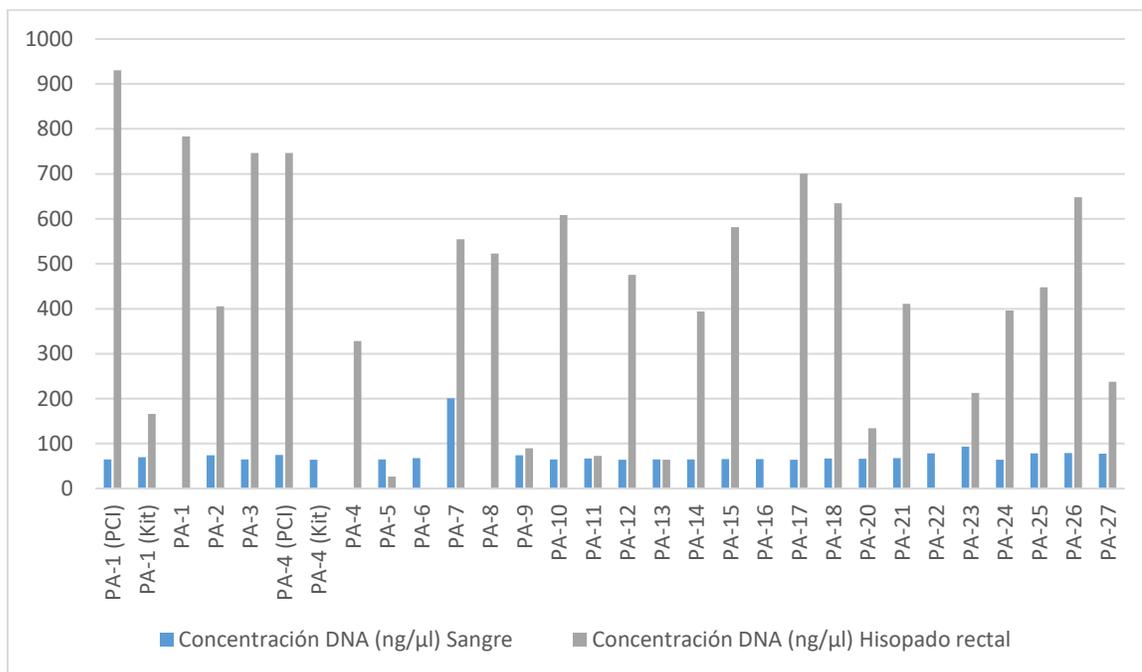
4.1 Resultados

4.1.1 Extracción de ADN

Los análisis de espectrofotometría permitieron determinar las concentraciones y calidad de ADN obtenido a partir de la extracción (Figura 14, 15).

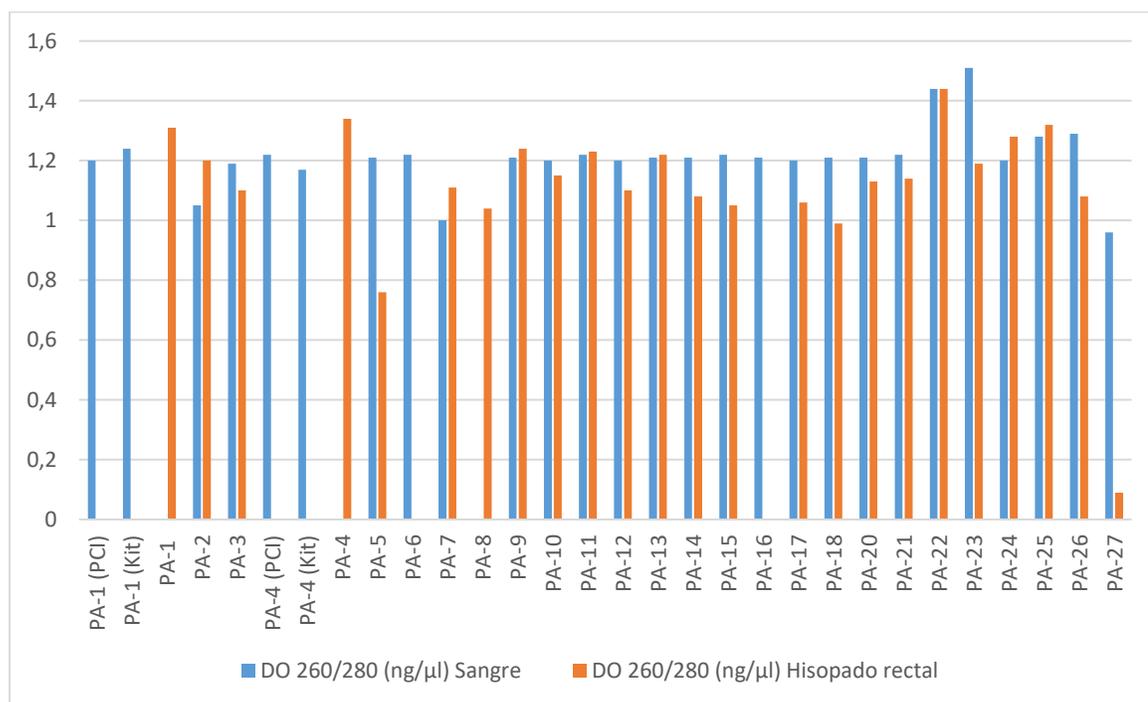
Figura 14

Concentraciones de ADN en Sangre e Hisopado Rectal Mediante Espectrofotometría



Fuente: Carrero (2022).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Figura 15*Densidad Óptica 260/280 de Sangre e Hisopado rectal Mediante Espectrofotometría*

Fuente: Carrero (2022).

El análisis de espectrofotometría realizado en las muestras de vacunas (Tabla 2), mostro una concentración de ADN similar a las obtenidas en las muestras de sangre, estos controles se emplearon en la PCR como controles positivos para verificar que esta se hizo correctamente.

Tabla 2*Concentración de Ácidos Nucleicos Contenidos en Controles Positivos (vacunas)*

Código muestra	Concentración ADN (ng/μl)	Relación 260/280
VA-1	86, 6	1, 27
VA-2	86, 1	1, 28

Fuente: Carrero (2022).

4.1.2 PCR en Punto Final

El procedimiento se llevó a cabo mediante protocolo previamente descrito, en la electroforesis, no se observaron bandas de ADN, se repitió dos veces el protocolo, en un primer experimento se aumentó el doble la cantidad de cebadores en la mezcla, se disminuyó 5°C la temperatura de anillamiento, tomando en cuenta la cantidad de Adeninas y Timinas que poseen los oligos, en un segundo experimento se trabajó el mix de forma individual, de manera que se pudiera usar los mismos volúmenes y condiciones de PCR que emplea Pereira et al, 2000, pero el resultado para ambos fue negativo, posiblemente los cebadores no fueron sintetizados correctamente.

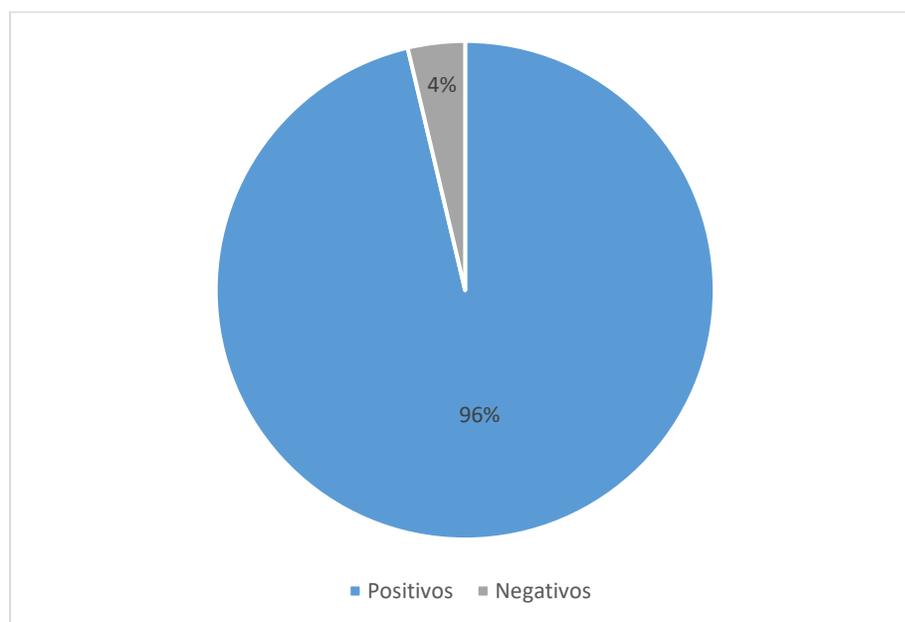
4.1.3 PCR en Tiempo Real (qPCR)

Se procesaron 52 muestras de sangre e hisopado rectal de un total de los 27 pacientes muestreados (Anexo B, C, D), teniendo como referencia dos controles positivos de vacunas. La lectura de los datos se llevó a cabo mediante el software de QuantStudio™ Design & Analysis v1.5, donde se evidencio que el 96% de los pacientes muestreados fueron positivos para CPV-2 y un 4% negativos por qPCR (Figura 16)

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Figura 16

Pacientes Positivos y Negativo según qPCR



Fuente: Carrero (2022).

Se analizaron los rangos de Ct (Cycle threshold) o umbral del ciclo con respecto al método de extracción de ácidos nucleicos (Figura 17) Estos valores mostraron un Ct menor en las muestras de hisopado rectal frente a las muestras de sangre, esto indica que los pacientes se encontraban en la fase aguda de la enfermedad donde el virus se encuentra alojado de forma predilecta en tracto gastrointestinal, por ende la viremia en esta fase es menor como es el caso de las muestras PA; 11, 23 y 24, estos resultado también demuestran que en extracción se obtienen mayores cantidades de partículas virales en las muestras de hisopado rectal, por su parte Ct's muy elevados en ambas muestras, demuestra que estos pacientes se encontraban finalizando la enfermedad, en estos casos la viremia y la carga viral en intestino son bajas.

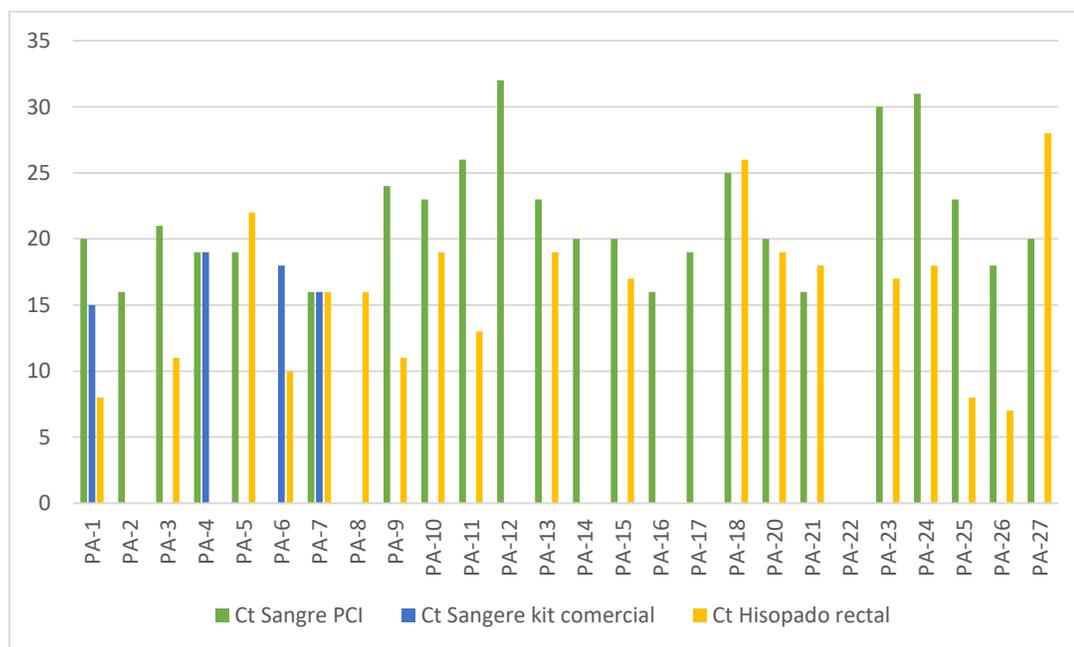
ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Se pudo observar que las muestras PA; 4, 12, 14 y 17 de hisopado rectal, fueron negativas en la qPCR, a pesar de que su resultado en sangre fue positivo, y esto está relacionado con los inhibidores que tiene la materia fecal, entre más restos celulares, bacterias entre otros, esta tenga, mayores son las probabilidades de que se inhiba, no permitiendo su correcta lectura en la PCR.

Por su parte se evidencio que las muestras PA; 12, 14, 16 las cuales fueron negativas al test snap, resultaron positivas en la qPCR (Anexo E, F), demostrando de esta forma la alta sensibilidad de la PCR frente a las pruebas rápidas.

Figura 17

Relación del Ct con el Método de Extracción de ADN



Fuente: Carrero (2022).

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

4.1.4 Determinación de la sensibilidad de la PCR e Inmunocromatografía

Se determinó la sensibilidad del diagnóstico mediante qPCR e Inmunocromatografía en las muestras de los pacientes positivos y negativos (Tabla 3), tomado en cuenta la fórmula de sensibilidad, se obtuvo para este estudio una sensibilidad del 96.1% en la qPCR y un 84.6% para la Inmunocromatografía (Figura 18).

Tabla 3

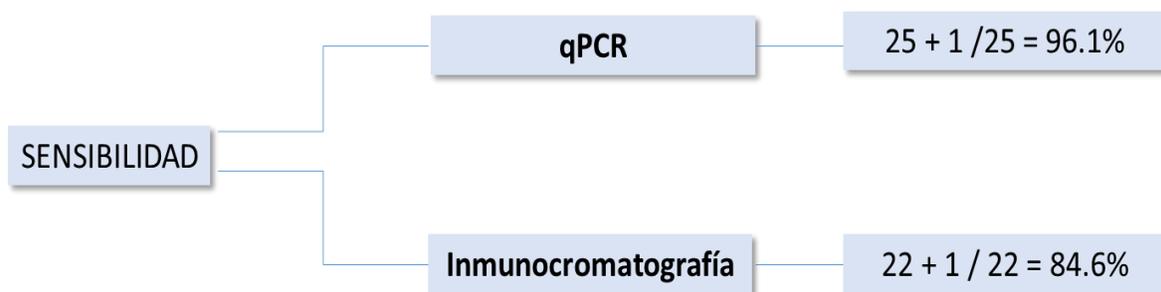
Pacientes positivos y negativos por Inmunocromatografía y PCR

Técnica	Positivos	Negativos	Total
PCR	25	1	26
Inmunocromatografía	22	4	26

Fuente: Carrero (2022)

Figura 18

Sensibilidad de la qPCR e Inmunocromatografía

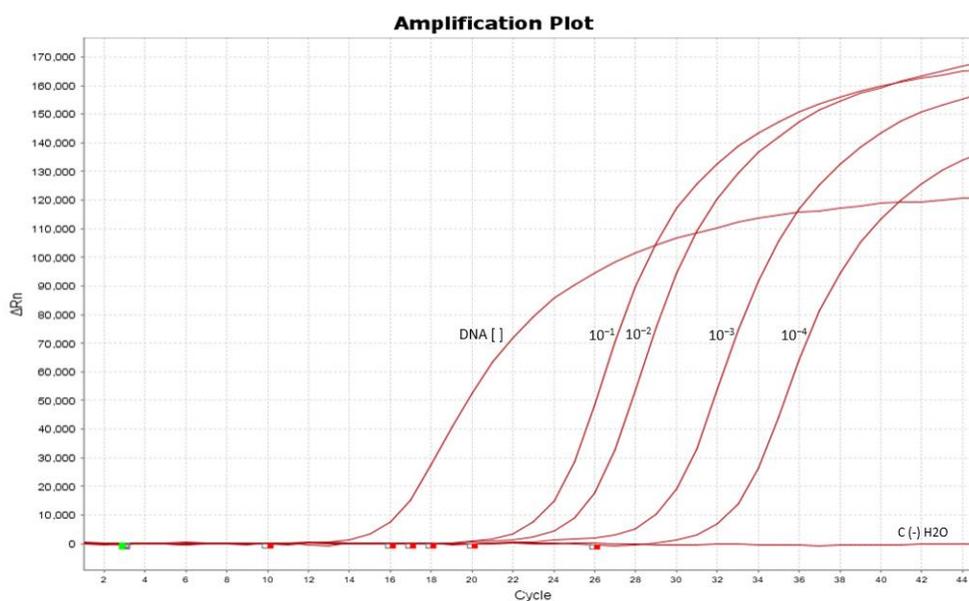


Fuente: Carrero (2022)

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

4.1.5 Curva de Sensibilidad

Se realizaron diluciones seriadas de la vacuna para conocer el término de concentración de 10^5 unidades virales, y determinar cuántas partículas virales detecta la qPCR en diluciones desde de 10^{-1} hasta 10^{-4} , estas fueron relacionadas con el Ct obtenido en la prueba (Figura 19).

Figura 19*Curva de Sensibilidad en Diluciones de Vacunas*

Fuente: Carrero (2022).

En la Tabla 4, se observa la relación del Ct con las unidades virales presentes en cada muestra, de acuerdo a este estudio el Ct del ADN concentrado se obtuvo con 259.8 ng/ μ l totales de virus y alcanzó a detectar 0,025ng/ μ l de partículas virales en una dilución de 10^{-4} .

Tabla 4*Relación del Ct con las Unidades Virales de cada Dilución*

Tipo de muestra	Diluciones	Concentración de ADN (ng/μl)	Rango Ct
	ADN concentrado	258, 8	16
	10 ⁻¹	25, 98	23
Vacuna	10 ⁻²	2, 59	25
	10 ⁻³	0,25	29
	10 ⁻⁴	0,025	32

Fuente: Carrero (2022).

4.2 Discusión

La PCR y sus variantes como la PCR en tiempo real o qPCR ha sido una técnica de alta especificidad y sensibilidad para el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas incluyendo la parvovirus canina (Bolívar et al, 2014). La técnica se inicia con el proceso de extracción, la cual puede ser realizada por diversos métodos. En el presente trabajo se utilizó Fenol cloroformo en muestras de sangre y Boiling snap en muestras de hisopado rectal, se obtuvieron mayores concentraciones de ADN a partir de muestras de hisopado rectal frente a las muestras de sangre.

Los kits de extracción de ADN, tienen ventajas en cuanto al tiempo empleado para la extracción, ya que requiere de menos tiempo para llevarse a cabo, además de extraer un ADN mucho más puro comparado con otros métodos de extracción (Alejos et al, 2014) La extracción mediante el método de kit comercial High Pure PCR Template Preparation (Roche), mostró una concentración de ADN y DO similares a las obtenidas a través del método de fenol cloroformo, y

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

tenía poca diferencia en los tiempos, sin embargo el costo de este método es muy elevado, por lo que se determinó hacer la extracción mediante fenol cloroformo.

El método de enfriamiento Boiling snap, es un método rápido, fácil y muy barato para confirmar el diagnóstico molecular de CPV-2 (Desai et al, 2020), en este estudio se obtuvieron buenos resultados en las concentraciones de ADN tanto en espectrofotometría como en la qPCR, sin embargo, se demostró que el ADN extraído mediante este método no es altamente puro, influyendo en el resultado de la qPCR, donde se evidenciaron muestras inhibidas, relacionando esto con lo descrito por Peist et al, 2001, donde señala que los inhibidores de la PCR interfieren en el proceso de amplificación del DNA, actuando a diferentes niveles, ya sea mediante la degradación o enlace de ácidos nucleicos o a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo su unión con cualquier DNA polimerasa, por esta razón los reactivos de la reacción se vieron influenciados, no permitiendo la visualización de la curva. Asimismo, Wilson (1997), señala que la materia fecal, además de contener partículas virales, también contiene restos celulares, proteínas, azúcares, bacterias, bilirrubinas y ácidos biliares, que interfieren con el resultado de la PCR siendo estos los inhibidores responsables de los resultados antes descritos.

Mediante el método de fenol cloroformo alcohol isoamílico se obtuvieron altas concentraciones de ADN, así mismo la relación 260/280 resultante debe estar entre 1,60 a 2,0 para determinar la calidad del ADN en cuanto a la presencia de contaminaciones bien por proteínas o por RNA (Guzmán et al, 2018), sin embargo la relación 260/280 para este estudio resultó por debajo de los rangos de pureza, estos oscilaron entre 0,98 a 1,3, lo que indica la presencia de contaminantes, que en este caso pueden ser fenoles o proteínas, evidenciando que este método de extracción no dejó un ADN completamente puro, por lo que deben tomarse las

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

medidas respectivas, para mejorar la calidad del DNA. Sin embargo, a pesar de la presencia de un ADN no tan puro, esto no interfirió en la PCR, ya que ninguna de las muestras de sangre se vieron inhibidas por estos contaminantes.

En el presente trabajo se utilizó la técnica descrita por Pereira et al, 2000, para el desarrollo de la PCR de punto final y no se obtuvieron resultados ni de los controles positivos ni de las muestras, a pesar de que se hicieron diferentes cambios entre los que se incluyeron las concentraciones de cloruro de magnesio, la concentración de los primers, y la utilización de diferentes polimerasas, siendo esto los puntos críticos de dicha técnica (Green & Sambrook, 2012). Por lo anterior se decidió continuar con el estudio de nuevos primers y realizar nuevas síntesis de oligos.

El diagnóstico de la parvovirus canina mediante test snap o prueba rápida de inmunocromatográfica, muestra una sensibilidad del 50% a 80% (Mazaferro, 2020) frente al diagnóstico a través de la PCR que posee una sensibilidad del 90% (Buonavoglia et al, 2001), en el presente estudio se muestrearon 27 (100%) pacientes, de los cuales cuatro 4 (15%) fueron negativos mediante test snap, sin embargo, el resultado de la PCR para tres de estos, fue positivo, pudiendo estar relacionado con el nivel de sensibilidad obtenido en este trabajo, donde se obtuvo una sensibilidad del 96.1% para la qPCR y un 84.6% para inmunocromatografía, toda vez que la qPCR mostró que concentraciones de 25 picogramos los cuales equivalen a más o menos 10 unidades virales, fueron suficiente para determinar la presencia del agente en una muestra, demostrando de esta forma la alta sensibilidad que posee la PCR, tanto de punto final, como en tiempo real (Cáceres, 2017; Farias, 2021), esto comparado con las pruebas rápidas.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

La concentración de ADN contenida en una muestra esta proporcionalmente relacionada con el valor del Ct obtenido en la qPCR, debido a que, entre mayor sea la carga viral se reflejara un Ct más bajo, contrario a un Ct más alto, indica menor carga viral en la muestra. (Serrano et al, 2021), esto se relaciona con los resultados de la qPCR de este estudio, debido a que se mostraron valores de Ct en su mayoría bajos, para las muestras de materia fecal, que comparados con los valores obtenidos en sangre eran un poco mas altos, relacionando estos resultados con la etapa de la enfermedad, debido a que, en su fase aguda, el virus migra desde el sistema circulatorio hacia el tracto gastrointestinal teniendo mayor predilección por este, por lo que en las muestras con menor Ct en sangre determinaban que la viremia se había disminuido por la migración del virus hacia el intestino

El proceso de estandarización de una técnica molecular es importante para cada laboratorio y se emplea de forma individual, puesto que cada uno tiene unas condiciones particulares que no permiten emplear el mismo protocolo entre un laboratorio y otro, debido a que en muchas ocasiones no se obtienen los mismos resultados (Bolívar et al, 2014). El presente trabajo describió las condiciones en el diagnóstico molecular de parvovirus canino mediante PCR para el laboratorio CEDIMOL

Capítulo V

5.1 Conclusiones

La PCR es una prueba de alta sensibilidad utilizando muestras de sangre s hisopado rectal, sin embargo, en esta última pueden encontrarse contaminantes que pueden inhibir la reacción dando lugar a falsos negativos, por lo que debe tratar de corregirse esta limitación al momento de estandarizar la técnica como método diagnostico

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

De acuerdo a este trabajo de investigación, la mejor muestra para hacer diagnóstico de parvovirus canina es la de sangre, ya que a pesar de que la viremia disminuye por la migración del virus hacia el tracto gastrointestinal, este se puede detectar en las muestras de sangre mediante la PCR, contrario a las muestras de hisopado rectal, que a pesar de tener alta carga viral en muchas ocasiones se ve inhibida por contaminantes, evitando de esta forma obtener un diagnóstico preciso y confiable de esta enfermedad.

Las muestras obtenidas a partir de hisopados rectales mostraron mayores concentraciones de ADN que las obtenidas a partir de las muestras de sangre

Los hisopados rectales en general muestran mayores concentraciones virales frente a las muestras de sangre, de acuerdo a los Ct evidenciados en las curvas de qPCR.

El método de detección molecular qPCR empleado en este estudio permitió detectar muestras que fueron negativas en test snap, ratificando de esta forma que esta es una excelente herramienta diagnóstica para la detección de CPV-2 con el uso de muestras de sangre e hisopado rectal

5.2 Recomendaciones

Se recomienda emplear otro método de extracción de ADN diferente al Boiling snap en muestras de materia fecal para el diagnóstico de la parvovirus canina, debido a la posibilidad de un resultado negativo en la PCR, debido a los inhibidores presentes en estas.

Se recomienda hacer uso de dos diferentes pares de primers en próximos estudios, para el diagnóstico molecular en general, con el fin de optimizar y obtener mejores resultados en la visualización de los amplificadores en la PCR de punto final.

5.3 Referencias

- Aguilera, P., Tachiquin, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chánez, M. (2015). PCR en tiempo real. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I)*, 175-198. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcrtiempo.pdf>
- Alejos , L., Aragón , M., & Cornejo , A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo , A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-25). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales,. Obtenido de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>
- Alonso, C., Bartolomé, R., Domínguez, J., Matas, L., & Rabella , N. (2005). *Procedimientos de microbiología clínica*. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Obtenido de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1a.pdf>
- Aponte, F., & Lopez, R. (2020). Factors that predisposed to canine parvovirus in a hospital of Cuautitlan, Mexico. *Revista Veterinaria UNNE*, 31(1), 22-45.
doi:doi:10.30972/vet.3114618

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Bamford, D., & Zuckerman, M. (2021). *Encyclopedia of Virology Fourth Edition* (Vol. II).

Elsevier Ltd.

Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina Instituto de Inmunología Clínica*, 3(1), 25-33. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4796903>

Buonavoglia, C., Martella, V., Pratelli, A., Tempesta, M., Cavalli, A., Buonavoglia, D., . . .

Carmichael, L. (2001). Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy.

Journal of general virology, 82(12), 3021-3025. doi:10.1099/0022-1317-82-12-3021

Cáceres, A. (2017). *Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa para la*

detección de parvovirus canino. Obtenido de

<https://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/165721/Implementacion-de-la-reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa-para-la-deteccion-de-parvovirus-canino.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Chung, H., Kim, S., Nguyen, V., Shin, S., Young, J., & Kyung, B. (2020). New genotype classification and molecular characterization of canine and feline parvoviruses. *Journal of Veterinary Science*, 21(3), 1-13. doi:doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e43

Cotmore, S., McKenna, M., Chiorini, J., Mukha, D., Pintel, D., Qiu, J., & Davison, A. (2014).

The family Parvoviridae. *Archives of virology*, 159(5), 1239-1247. doi:10.1007/s00705-013-1914-1

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

- Decaro, N., & Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*, *155*(1), 1-12. doi:10.1016/j.vetmic.2011.09.007
- Desai, D., Kalyani, I., Ramani, U., Makwana, P., Patel, D., & Vala, J. (2020). Evaluation of three different methods of viral DNA extraction for molecular detection of canine parvo virus-2 from faecal samples of dogs. *Journal of entomology and zoology studies*, *8*(3), 479-481. Obtenido de <https://www.entomoljournal.com/archives/2020/vol8issue3/PartH/8-3-3-609.pdf>
- Diaz, C., Correa, J., & Vera, V. (2008). Molecular aspects of canine parvovirus and its consequences in the disease. *Revista de Medicina Veterinaria Universidad de la Salle*, *15*. Obtenido de <https://ciencia.lasalle.edu.co/mv/vol11/iss15/5/>
- Diz, O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *N Punto*, *3*(30), 88-111. Obtenido de <https://www.npunto.es/content/src/pdf-articulo/5f69a919884e7Art5.pdf>
- Drane, D., Hamilton, R., & Cox, J. (1994). Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Veterinary Microbiology*, *41*(3), 293-302. doi:doi.org/10.1016/0378-1135(94)90109-0
- Duque, Y., Echeverri, M., Trejos, J., & Ruiz, J. (2017). Prevalence and molecular. *epidemiology of Canine parvovirus 2 in diarrheic dogs in Colombia, South America: A possible new CPV-2a is emerging?*, *201*, 56-61. doi:10.1016/j.vetmic.2016.12.039

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Farías Román , M. (2021). *Diagnóstico del virus Distemper y parvovirus canino a través de kits rápidos y qPCR en la ciudad de Latacunga*. Obtenido de

<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/7917/1/PC-002061.pdf>

Faz, M., Martínez, J., & Fajardo, R. (2017). Reliability of clinical diagnosis and laboratory testing techniques currently used for identification of canine parvovirus enteritis in clinical settings. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79(1), 213-217.

doi:10.1292/jvms.16-0227

Fierro, E. (2019). *Diagnóstico de parvovirus en caninos machos y hembras mediante la técnica de Elisa cualitativa y cuantitativa*. Obtenido de

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17627/1/UPS-CT008378.pdf>

Flores, R. (1987). Parvovirus canina y aspectos de inmunización. *Ciencia Veterinaria FMVZ/UNAM*, 131-159. Obtenido de

<https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol4/CVv4c5.pdf>

Fonseca, E. (2018). Canine parvovirus (CPV) phylogeny is associated with disease severity. *Emerging infectious diseases*, 24(2), 293. doi:10.3201/eid2402.ET2402

Foy, C., & Parkes, H. (2001). Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clinical Chemistry*, 47(6), 990-1000. Obtenido de

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11375283/>

Franzo, J., Tucciarone, C., Casagrande, S., Caldín, M., Cortey, M., Furlanello, T., & Drigo, M. (2019). Canine parvovirus (CPV) phylogeny is associated with disease severity.

Scientific Reports, 29(1), 11266. doi:10.1038/s41598-019-47773-6.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

- Goddard, A., & Leisewitz, A. (2010). Canine parvovirus. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*, 40(6), 1041-1053. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.007
- Grant Maxie, M. (2007). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals* (Vol. II). Elsevier.
- Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning a laboratory manual fourth edition*. Cold Spring Harbor. Obtenido de <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>
- Greene, C. (1990). *Infectious Diseases of the dog and cat*. Georgia: W. B. Saunders .
- Guerrero, M. (2009). *Principales enfermedades infecciosas en los mamíferos domésticos*. Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Gutiérrez, N., Suarez, M., Rodríguez, A., & Londoño, M. (2019). *Factores predisponentes y prevalencia de CPV-2 en la clínica veterinaria Zamudio Pet Company, Cali, Colombia (2011-2019)*. Universidad Tecnológica de Pereira. Obtenido de <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/be6cf688-8e5f-4ea3-9fab-308b3a24458a/content>
- Guzmán, L., Cortés, M., Pichardo, J., & Arteaga , R. (2018). Comparación de protocolos de aislamiento de DNA a partir de semilla de soya. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(8). doi:doi.org/10.29312/remexca.v9i8.872
- Hashimoto, A., Schlafer, D., & Carmichael, L. (1994). Minute virus de los caninos (MVC, parvovirus canino tipo-1): patogenicidad para cachorros y estimación de seroprevalencia.

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 6(2), 165-174.

doi:10.1177/104063879400600206

Hoskins, J. (1997). Canine parvovirus infection. En R. Morgan, *Handbook of small animal practice* (págs. 1131-1134). W.B. Sanders company.

Hoskins, J. (1998). Infectious diseases of the dog and cat. En C. Greene, *Infectious diseases of the dog and cat* (págs. 40-48). W. B. SaundersCompany.

Hueffer, K., Parker, J., Weicher, W., Geisel, R., Sgro, J., & Parrish, C. (2003). The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from VirusSpecific Binding to the Canine Transferrin Receptor. *Journal of virology*, 77(3), 1718-1726.

doi:10.1128/JVI.77.3.1718–1726.2003

Jiang, F. (2018). Bioclimatic and altitudinal variables influence the potential distribution of canine parvovirus type 2 worldwide. *Ecology and Evolution*, 8(9), 4534-4543.

doi:10.1002/ece3.3994

Mazzaferro, E. (2020). Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Elsevier*, 50(6), 1307 - 1318.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>

Mochizuki, M., Hashimoto, M., Hajima, T., Takiguchi, M., Hashimoto, A., Une , Y., . . .

Carmichael, L. (2002). Virologic and Serologic Identification of Minute Virus of Canines (Canine Parvovirus Type 1) from Dogs in Japan. *Journal of clinical microbiology*,

40(11), 3993-3998. doi:10.1128/JCM.40.11.3993–3998.2002

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Mogollón, J., Cortés, E., Benavides, O., & Forero, G. (1984). Parvovirosis canina en Colombia.

2: Aislamiento y serología. *Revista ICA*, 19(2), 201-207. Obtenido de

<http://hdl.handle.net/20.500.12324/23417>

Nandi, S., & Kumar, M. (2010). Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian journal of*

virology, 21(1), 31-44. doi: 10.1007/s13337-010-0007-y

Nandi, S., & Kumar, M. (2010). Canine Parvovirus: Current Perspective. *Indian Journal of*

Virology, 21(1), 31-44. doi:10.1007/s13337-010-0007-y

Oliveira, P., Cargnelutti, J., Masuda, E., Fighera, R., Kommers, G., Da Silva, M., . . . Flores, E.

(2018). Aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da infecção pelo parvovirus canino 2c em cães do Sul do Brasil. *Pesquisa veterinaria brasileira*, 38(1), 113-118.

doi:10.1590/1678-5150-PVB-5122

Parker, J., & Colin, P. (1997). Canine Parvovirus Host Range Is Determined by the Specific Conformation of an Additional Region of the Capsid. *Journal of virology*, 71(12), 9214-

9222. doi:10.1128/JVI.71.12.9214-9222.1997

Peist, R., Honsel, D., Twiwing, G., & Loeffert, D. (2001). PCR inhibitors in plant DNA

preparations. *Qiagen news*, 7-9. Obtenido de

https://www.researchgate.net/publication/286051675_PCR_inhibitors_in_plant_DNA_preparations

Penelo, S. (2017). *Estudio y caracterización de cepas de parvovirus canino en España [Tesis doctoral]*. Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/44209/>

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

- Pereira, C., Monezi, T., Mehnert, D., D'Angelo, M., & Durigon, E. (2000). Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Veterinary microbiology*, 75(2), 127-133. doi:10.1016/s0378-1135(00)00214-5
- Pino, D., Márquez, M., Rojas, N., & Torres, M. (2018). Seroprevalencia de Parvovirus canino en perros del municipio Boyeros, La Habana, Cuba. *Revista de salud animal la Habana*, 40(1), sp. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000100004
- Pollock, R., & Coyne, M. (1993). Canine parvovirus. *Veterinary clinics of North America: small animal practice*, 23(3), 555-568. doi:10.1016/S0195-5616(93)50305-4
- Puentes, R., Eliopulos, N., Finger, P., Castro, C., Nunes, C., Furtado, A., . . . Hübner, O. (2010). Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV). *Veterinaria (Montevideo)*, 46, 47-49. Obtenido de <https://www.revistasmvu.com.uy/index.php/smvu/article/view/168/104>
- Roche. (2022). *Life science roche*. Obtenido de <https://lifescience.roche.com/global/en/products/others/high-pure-pcr-template-preparation-kit-3684811.html>
- Sandin, M. (2004). *Métodos de estudio y diagnóstico viral*. Hipertextos del área de biología. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/viruslocal/diagnostico%20viral.htm>
- Sandoval , A., Martínez , A., & López , D. (2013). Extracción de ácidos nucleicos. En A. Salazar, A. Sandoval, & J. Armendáriz, *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (pág. sp). McGraw Hill Medical. Obtenido de

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743658#1118679546>

Schunck, B., Kraft, W., & Truyen, U. (1995). A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *Journal of Virological Methods*, 5(3), 427-433. doi:10.1016/0166-0934(95)00069-3

Serrano, A., Ruiz, A., Segura, A., Olmo, V., Mico, R., Barquilla, A., & Moran, A. (2021). Aplicación del valor umbral del número de ciclos (Ct) de PCR en la COVID-19. *Medicina de familia Semergen*, 47, 337-341. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.05.003>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos en la reacción en cadena de la polimeraza (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en salud*, 2(2), 70-78. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/invd/ir-2013/ir132d.pdf>

Truyen, U., & Parrish, C. (1992). Canine and Feline Host Ranges of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus: Distinct Host Cell Tropisms of Each Virus In Vitro and In Vivo. *Journal of virology*, 66(9), 5399-5408. doi:<https://doi.org/10.1128%2Fjvi.66.9.5399-5408.1992>

Tuteja, D., Bnu, K., & Mondal, B. (2022). Canine parvovirology – A brief updated review on structural biology, occurrence, pathogenesis, clinical diagnosis, treatment and prevention. *Microbiology and Infectious Diseases*, 82, 1-12. doi:10.1016/j.cimid.2022.101765

Véliz, A., Vidal, S., Siel, D., Guzman, M., Timoteo, H., Farias, V., & Lapierre, L. (2021). Molecular Analysis of Full-Length VP2 of Canine Parvovirus Reveals Antigenic Drift in

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

CPV-2b and CPV-2c Variants in Central Chile. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 11(8), 1-11. doi:10.3390/ani11082387

Wilson, I. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and environmental microbiology*, 63(10), 3741-3751. doi:10.1128/aem.63.10.3741-3751.1997

Wong, M., & Medrano, J. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. 39(1), 75-85. doi:10.2144/05391RV01

5.4 Anexos

Anexo A. Nomenclatura y Tipo de Muestras, Resultados Test Snap y Métodos de Extracción Empleados

Código muestra	Resultado Test snap	Tipo de muestra	Método de extracción
PA-1	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, Kit de extracción de ADN Roche®, boiling snap
PA-2	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-3	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-4	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, Kit de extracción de ADN Roche®, boiling snap

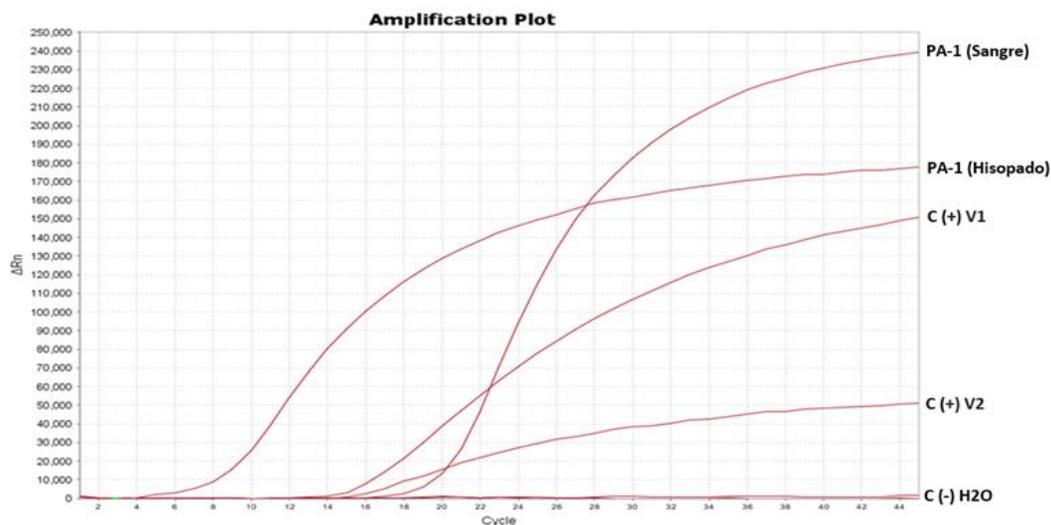
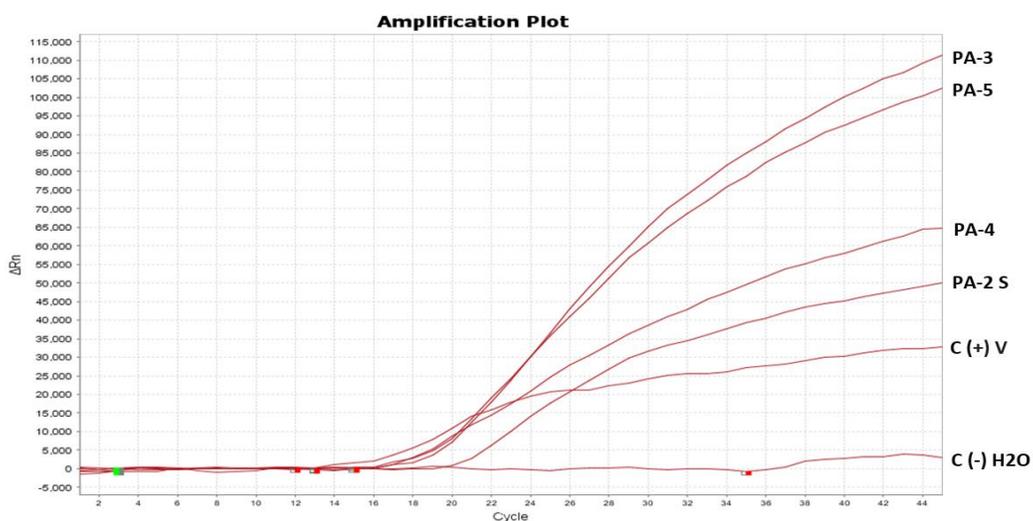
ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Código muestra	Resultado Test snap	Tipo de muestra	Método de extracción
PA-5	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-6	Positivo	Sangre, hisopado rectal	Kit de extracción de ADN Roche®, boiling snap
PA-7	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, Kit de extracción de ADN Roche®, boiling snap
PA-8	Positivo	Hisopado rectal	Boiling snap
PA-9	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-10	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-11	Positivo	Sangre, hisopado rectal, materia fecal	PCI, Boiling snap
PA-12	Negativo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-13	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-14	Negativo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-15	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-16	Negativo	Sangre	PCI
PA-17	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

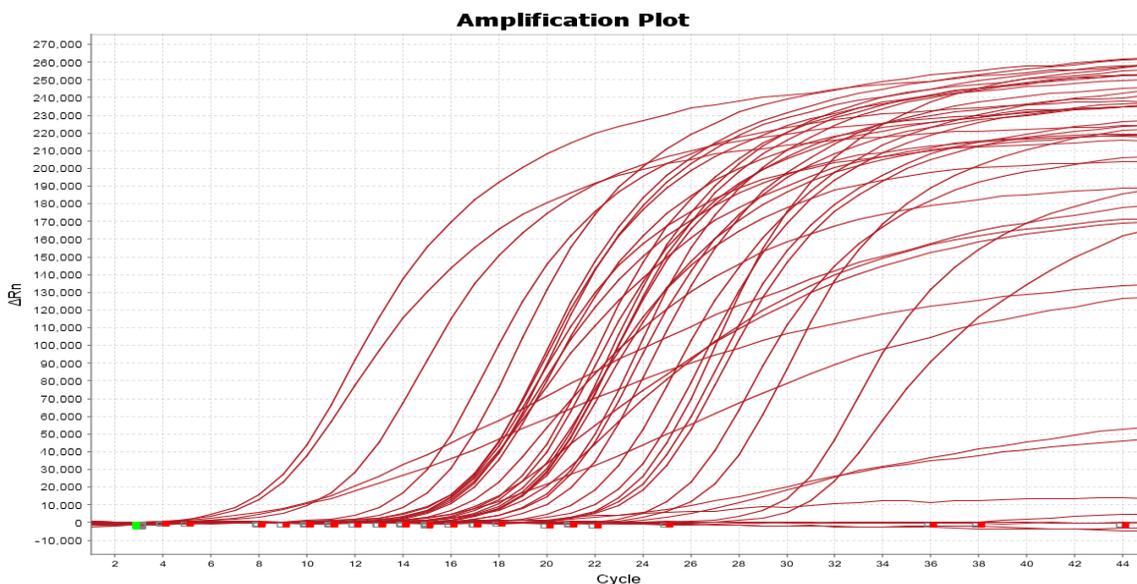
Código muestra	Resultado Test snap	Tipo de muestra	Método de extracción
PA-18	Positivo	Sangre	PCI
PA-19	Positivo	Materia fecal	-
PA-20	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-21	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-22	Negativo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-23	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-24	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-25	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-26	Positivo	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap
PA-27	No reporta	Sangre, hisopado rectal	PCI, boiling snap

ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Anexo B. Determinación de los Valores de Ct para el Diagnóstico Molecular de CPV-2 en Muestras de Sangre e Hisopado Rectal**Anexo C. Determinación de los Valores de Ct para el Diagnóstico Molecular de CPV-2 en Muestras de Sangre**

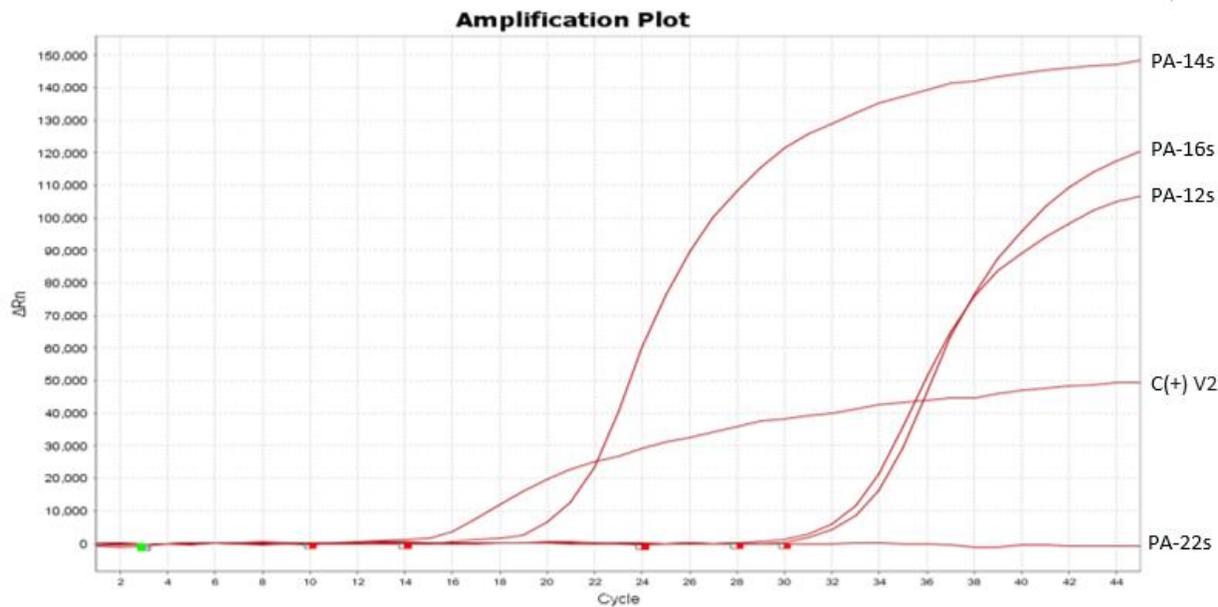
ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Anexo D. Diagnostico mediante qPCR de muestras de sangre y materia fecal



1

Anexo E. Diagnóstico de Muestras negativas según test rápido



ESTANDARIZACIÓN DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE CPV-2

Anexo F Ct muestra PA-4 sangre e hisopado rectal (inhibido)

