



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CORRELACIÓN DE LA CINÉTICA DE SEVERIDAD DE LA
ENFERMEDAD, CONTEO TOTAL DE LEUCOCITOS Y TÍTULOS DE
IgG CONTRA PARVOVIRUS CANINO EN PERROS NATURALMENTE
INFECTADOS
(VACUNADOS Y NO VACUNADOS)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

MVZ. EMyCPG. GABRIELA MARRÓN TORRES

El Cerrillo Piedras Blancas Toluca México, Noviembre de 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CORRELACIÓN DE LA CINÉTICA DE SEVERIDAD DE LA
ENFERMEDAD, CONTEO TOTAL DE LEUCOCITOS Y TÍTULOS DE
IgG CONTRA PARVOVIRUS CANINO EN PERROS NATURALMENTE
INFECTADOS
(VACUNADOS Y NO VACUNADOS)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA:

MVZ. EM_yCPG. GABRIELA MARRÓN TORRES

COMITÉ TUTORIAL:

DR. JOSÉ SIMÓN MARTÍNEZ CASTAÑEDA. TUTOR ACADÉMICO.

DR. ISRAEL ALEJANDRO QUIJANO HERNÁNDEZ. TUTOR ADJUNTO.

PhD. RAÚL CUAUHTÉMOC FAJARDO MUÑOZ. TUTOR ADJUNTO.

El Cerrillo Piedras Blancas Toluca México, Noviembre de 2018

DEDICATORIA

A mi chamaquito Leo, eres el mejor regalo que la vida me pudo haber dado. Gracias por elegirme como mamá, te amo mi bebé.

A mis abuelos Queta y Lorenzo que me cuidan desde el cielo <3.

A mi mamá Yolanda porque sin ella nada de esto hubiera sido posible, gracias madre!!!!

A mi hermano Hugo y sobrinos Martha y Alejandro que los regalaría si pudiera jajaja pero los quiero mucho.

A mi esposinoviejo Ricardo que ha estado a mi lado desde que me embarqué en este viaje, gracias por todo el apoyo, paciencia, amor y paciencia (sí, de nuevo jaja), gracias por todo! Te amísimo mil =)

A mi primique Miguel (alias Risas) jaja. A mi otra primique Tzaz y a sus chamaquines Mary y Mate. Vieja, tantas cosas que hemos vivido, la vez que fuiste a dar al hospital y otra que casi mueres jajaja muchas gracias por todo! Los quiero hartoo primos!

A mis tías María (alias Maricela jaja) y Estela, gracias por toooodo lo que han hecho por mí, por todo el apoyo que desde chiquita me han dado <3

A mis amigas Cintia, Lorena, Marina, Sara, Diana, por todo lo que hemos compartido juntas y aunque ya no nos vemos como antaño, la amistad sigue y seguirá por siempre. Las adoro amigas!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento al proyecto de investigación y particularmente al Centro de INVESTIGACIÓN Y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por generar el espacio adecuado para que este proyecto de investigación pudiera ser desarrollado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo mediante la beca de apoyo a estudiantes de posgrado, que hizo posible el poder concluir mis estudios.

Al Dr. José Simón Martínez Castañeda, por haberme dado (de nuevo) la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por los consejos, las pláticas, las llamadas de atención, por el apoyo y la exigencia, gracias a usted he ampliado mis horizontes y tuve la convicción de nunca quedarme con lo que ya sé, porque todo evoluciona y así debe ser el conocimiento de un médico veterinario. ¡Mil gracias por eso Doc!

Al Dr. Israel Alejandro Quijano Hernández, gracias por TODO el mega apoyo que me ha dado desde que entré al HVPE. Gracias por la perspectiva fresca y objetiva que siempre tiene y porque aunque está súper ocupado, siempre logra hacer un espacio para sus estudiantes.

Al PhD. Raúl Cuauhtémoc Fajardo Muñoz, por sus consejos y guía durante el desarrollo de mi trabajo de investigación, sus comentarios y aportes siempre fueron objetivos y de mucha utilidad durante mi formación.

A los Académicos, residentes y estancias del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, por la disposición para la recolección de información y muestras para este proyecto.

A los MVZ. EMyCPG. Orlando González, Miguel Juárez y Diana López por colaborar también en la recolección de muestras. Mil gracias.

Gracias a los pacientes que fueron parte de este proyecto y a los dueños comprometidos con la salud de sus mascotas.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ABSTRACT	viii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 ETIOLOGÍA.....	4
2.2 PROTEÍNAS DEL VIRUS.....	5
2.2.1 NS1	5
2.2.2 NS2	6
2.2.3 VP1	7
2.2.4 VP2	7
2.2.5 VP3	9
2.3 PATOGENIA	9
2.4 DIAGNÓSTICO	11
2.4.1 Métodos tradicionales.....	11
2.4.2 Métodos moleculares	13
2.5 CAMBIOS EN EL HEMOGRAMA DE PERROS CON PARVOVIROSIS CANINA	14
2.6 DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE DEL PERRO	16
2.6.1 Desarrollo <i>in utero</i>	16
2.6.2 Inmunidad materna	17
2.6.3 Maduración neonatal	19

2.6.4 Aspectos genéticos de la competencia inmune.....	20
2.6.5 Vacunación durante el período de maduración inmune	21
2.7 TRATAMIENTO	22
2.7.1 Otros tratamientos.....	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. JUSTIFICACIÓN	27
5. HIPÓTESIS	28
6. OBJETIVOS	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS	30
7.1 Criterios de inclusión y exclusión.....	30
7.2 Tipo de estudio y animales	30
7.3 Puntaje de la severidad de la enfermedad.....	31
7.4 Diagnóstico de laboratorio.....	32
7.4.1 PCR anidado (nPCR).....	33
7.5 Titulación de anticuerpos.....	33
7.6 Tratamiento médico	34
7.7 Procedimiento de muestreo y recolección de datos.....	35
7.8 Análisis estadístico	35
8. RESULTADOS	36
8.1 Resultados adicionales.....	42
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIONES	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. ANEXOS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Parvovirus canino, microfotografía electrónica.	4
Figura 2	Esquema del ADN genómico del Parvovirus canino.	5
Figura 3	Curva de supervivencia para pacientes tratados, positivos a Parvovirus canino	39
Figura 4	Días de hospitalización analizados con la prueba de t de Student.	40

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Sistema de puntaje para signos clínicos en infección por PVC.	31
Tabla 2	Registro de casos, raza, sexo, edad, días enfermos antes de llegar a consulta, número de vacunas y desenlace de la enfermedad.	37
Tabla 3	Índice de severidad por grupo a lo largo del periodo de observación.	39
Tabla 4	Conteo leucocitario por grupo a lo largo del periodo de observación.	40
Tabla 5	Titulación de IgG contra parvovirus canino, por grupo a largo del periodo de observación.	40

ABSTRACT

Canine Parvovirus type 2, with its variants 2a, 2b and more recently 2c, is one of the most important viruses in puppies, although it can affect dogs of any age. The clinical symptoms vary from moderate to severe and it is observed anorexia, vomiting, mucoid to bloody diarrhea and haematological alterations such as leukopenia. Several studies report that leukopenia is a good prognostic marker, however, few studies perform leukocyte count kinetics. Regarding the antibody titre against canine parvovirus (CPV), different authors report the importance of antibody titers considered protective, before contact with the virus, to prevent the development of the disease or prevents it from becoming serious and life threatening, however, the kinetics of IgG antibodies against CPV has not been studied once the infection has been established.

Today in Mexico, there are no studies evaluating the kinetics of leukocyte counts, IgG titers against canine parvovirus and the severity scores of the disease in groups of vaccinated and unvaccinated dogs, therefore in this study, these variables were evaluated in 56 dogs that fulfilled the inclusion criteria, of which 24 were vaccinated. To obtain the severity score, the modified table of Nakamura *et al.*, in 2001 was used. No statistical differences were observed for any variable between the two groups. However, when we analyzed the severity scores of the total population it was observed that the disease has a moderate severity score, since 71% of the dogs presented scores between 6 to 10 points. Likewise dogs with a high severity score (11-15 points), are more likely to die from the disease ($p < 0.01$). As for the leukocyte count, it was observed that 27 of the 56 dogs presented leukopenia at the time of entry, they were more likely to die than dogs with leukocyte counts within the normal range ($p < 0.01$). In regard to the antibody titles (IgG) against PVC, it was observed that dogs with antibody titles equal to or greater than 1: 512 are more likely to present a high severity score for the disease ($p < 0.05$) and a higher probability of dying ($p < 0.01$).

RESUMEN

El Parvovirus canino tipo 2, con sus variantes 2a, 2b y más recientemente 2c, es uno de los virus más importantes en perros cachorros, aunque puede afectar a perros de cualquier edad. Los cuadros clínicos característicos son de moderados a severos y se observa anorexia, vómito, diarrea de mucoide a sanguinolenta y alteraciones hematológicas como leucopenia. Diversos estudios reportan que la leucopenia es un buen marcador pronóstico, sin embargo, pocos estudios realizan cinéticas del conteo leucocitario. En cuanto al título de anticuerpos contra Parvovirus canino (PVC), diferentes autores reportan la importancia de títulos de anticuerpos considerados protectores, antes del contacto con el virus, para evitar que se desarrolle la enfermedad o que ésta sea grave y ponga en peligro la vida del perro, sin embargo, no se ha establecido la cinética de anticuerpos IgG contra PCV una vez establecida la infección.

Actualmente, en México, no se han realizado estudios que evalúen las cinéticas de conteos leucocitarios, títulos de IgG contra parvovirus canino y los puntajes de la severidad de la enfermedad, en grupos de perros vacunados y no vacunados, por lo tanto en este estudio, se evaluaron estas variables en 56 perros que cumplieron con los criterios de inclusión, de los cuales 24 fueron vacunados y 32 no vacunados. Para obtener el puntaje de severidad, se utilizó la tabla modificada de Nakamura *et al.*, en 2001. No se observaron diferencias estadísticas para ninguna variable entre los dos grupos. Sin embargo, al analizar los puntajes de severidad de la población total se observó que la enfermedad tiene un puntaje de severidad media, ya que 71% de los perros presentaron puntajes entre 6 a 10 puntos. Así mismo, perros que ingresen con un puntaje de severidad alto (11-15 puntos), tienen más probabilidades de morir ($p < 0.01$). En cuanto al conteo de leucocitos, se observó que 27 de los 56 perros presentaron leucopenia al momento de ingresar a consulta y tuvieron más posibilidades de morir que perros con conteos leucocitarios dentro del intervalo normal ($p < 0.01$). Para los títulos de IgG contra PVC, se determinó que los perros que ingresen con títulos iguales o mayores a 1:512 tienen mayor probabilidad de presentar un puntaje de severidad alto ($p < 0.05$) y más probabilidades de morir ($p < 0.01$).

1. INTRODUCCIÓN

El Parvovirus Canino (PVC) emergió como una enfermedad viral sumamente contagiosa reconocida por primera vez en 1977. Desde entonces, se ha establecido como un patógeno entérico para los perros alrededor del mundo (Appel *et al.*, 1978). En las poblaciones caninas más susceptibles, la infección por parvovirus a menudo se presenta como una enfermedad sistémica severa que incluso atenta contra la vida (Smith-Carr *et al.*, 1997) con una morbilidad del 100% y una mortalidad del 1 al 10% en adultos y del 70 hasta el 91% en cachorros (Green *et al.*, 2012; Nandi *et al.*, 2010) con una tasa de supervivencia de alrededor de 64% con tratamiento de soporte oportuno (Otto *et al.*, 1997).

Se transmite por contacto directo (perro a perro) e indirecto (fomites). Al ser un virus desnudo, es muy resistente al medio ambiente y a la mayoría de los desinfectantes, aunque una excepción notable es el hipoclorito de sodio (Greene *et al.*, 2012).

Debido a que la replicación viral tiene lugar principalmente en tejidos con una elevada tasa de actividad mitótica, esta enfermedad se caracteriza por dos principales formas clínicas: 1) enteritis con vómito y diarrea y 2) miocarditis con subsiguiente falla cardíaca en cachorros menores de 3 meses de edad (Appel *et al.*, 1987), la primera forma clínica es la presentación más común y potencialmente fatal que puede afectar a perros de cualquier edad (Nandi *et al.*, 2013).

Otro tejido con alta actividad mitótica es la médula ósea. El conteo total de leucocitos (CTL) en un perro con parvovirosis canina varía de bajo a severamente bajo. Este hallazgo clínico es ampliamente atribuible a la destrucción de las células precursoras hematopoyéticas de los diversos tipos de leucocitos, principalmente en la médula ósea, aunque también en otros órganos linfoproliferativos tales como el timo, nódulos linfáticos y bazo, lo que resulta en una inadecuada compensación a la demanda masiva de leucocitos (especialmente neutrófilos) en el tracto gastrointestinal inflamado (Goddard *et al.*, 2008).

Estos cambios clínicos en el conteo total de leucocitos, así como de las subpoblaciones de células blancas, han sido usado por los médicos como un dato de gran valía para establecer posibles diagnósticos diferenciales, ya que aunque los parámetros hematológicos por sí solos no son lo suficientemente específicos para emitir un diagnóstico definitivo permiten obtener información para evaluar la respuesta al tratamiento y sugerir un pronóstico (Castro *et al.*, 2013). Anteriormente Woods *et al.*, en 1980; Potgieter *et al.*, en 1981 y O'Sullivan *et al.*, en 1984 establecieron que la leucopenia estaba asociada con un peor pronóstico y con la necesidad de un tratamiento más agresivo, recientemente Goddard *et al.*, en el 2008 y Castro *et al.*, en 2013 establecen que perros que ingresan a consulta con leucopenia y no son capaces de elevar sus conteos totales de leucocitos dentro de las primeras 72 horas de hospitalización tienen un peor pronóstico de recuperación, mientras que otros estudios como el de Mason *et al.*, en 1987, informaron que la leucopenia no debe utilizarse como el único criterio de pronóstico, así mismo McCaw *et al.*, en 1996, encontraron que la neutropenia (incluso cuando era muy grave) no era un indicador pronóstico significativo. Solo algunos estudios incluyeron conteos leucocitarios seriados (Goddard *et al.*, 2008; Kalli *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013) y reportaron una asociación directa entre la leucopenia y la mortalidad.

Otro aspecto importante relacionado con la severidad de la parvovirus canina, es el título de anticuerpos. Se ha demostrado que éste se relaciona con la carga de excreción viral en heces, el tiempo de excreción postinfección así como a la protección a la infección de campo (Decaro *et al.*, 2005a), por lo que un perro que tenga anticuerpos considerados protectores (Prittie, 2004; Elia *et al.*, 2005; Decaro *et al.*, 2012; Taguchi *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2014) debería tener una ventaja frente aquellos que no han sido vacunados. Si bien, las vacunas actuales no pueden evitar la infección, han ayudado a controlar la propagación de la enfermedad, sin embargo, algunos perros aún contraen la enfermedad y pueden morir a causa de ella, a pesar de haber sido vacunados (Nandi *et al.*, 2013).

En México no se han reportado estudios clínicos, que evalúen la severidad de la enfermedad, conteo leucocitario, títulos de anticuerpos y su relación con el tiempo de

hospitalización y tasa de mortalidad, en perros positivos a PVC que cursen con la enfermedad o las diferencias entre perros vacunados y no vacunados, así como la relación de los títulos de IgG con la severidad de la enfermedad y la tasa de mortalidad, por lo que este estudio determinó la correlación de esas variables en perros infectados naturalmente.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGÍA

"Parvo" significa pequeño (latín), este virus es miembro de la familia *Parvoviridae*, género *Protoparvovirus* y especie *Protoparvovirus de los carnívoros 1* ("Taxonomy", 2017) (Figura 1).

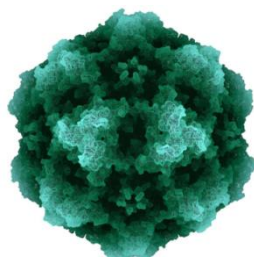


Figura 1. Parvovirus canino, microfotografía electrónica (Virology, 2017)

Fue reconocido por primera vez en 1977, se le llamó PVC-2 para distinguirlo de un virus de caninos estrechamente relacionado, conocido como PVC-1 o Virus diminuto de los caninos (MVC por sus siglas en inglés). Tiene simetría icosaédrica, mide 25 nm de diámetro, es un virus desnudo con un genoma de ADN de cadena sencilla y de sentido negativo de 5.2 Kb (Murphy *et al.*, 1999) (Figura 2), muy resistente a las condiciones ambientales extremas como son: el calor, frío, humedad, sequedad e incluso a la mayoría de los desinfectantes comunes, aunque una excepción notable es el hipoclorito de sodio (Greene *et al.*, 2012), presentando actividad antiviral contra $\geq 99.99\%$ de este virus a 100 partes por millón (ppm) durante 120 segundos (Sanekata *et al.*, 2009).

El genoma está contenido en dos marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés), el primero codifica para las proteínas no estructurales (NS) NS1 y NS2 y el segundo codifica proteínas virales (VP) VP1 y VP2, las cuales ensamblan la cápside viral formada por 60 copias tanto de VP1 (10%) y VP2 (90%) (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002) y son los antígenos principales de inducir anticuerpos protectores (Pérez *et al.*, 2014). VP1 contiene los 584 residuos de VP2 y 143 residuos amino-terminal únicos (Parrish, 1991; Rhode, 1985).

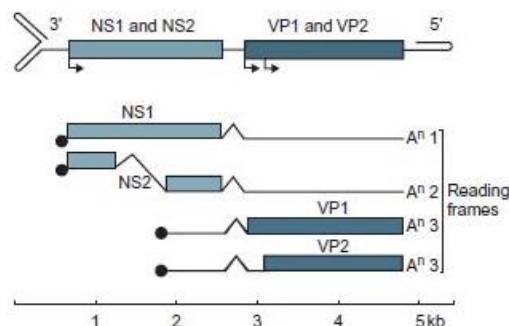


Figura 2. Esquema del ADN genómico del Parvovirus canino. Modificado de Barthold *et al.*, 2011.

La replicación viral ocurre en el núcleo de las células infectadas y esto provoca una gran cantidad de cuerpos de inclusión. La partícula viral tiene un peso molecular de 5.5 a 6.2 x 10⁶ Da. Aproximadamente 50% de la masa es proteica y el restante es ADN. Debido a la alta proporción ADN:proteína la densidad de flotación del virión intacto en cloruro de cesio (CsCl) es 1.39–1.42 g/cm³. Finalmente, el coeficiente de sedimentación del virión en el gradiente neutral de sucrosa es 110-122 S (Murphy *et al.*, 1999; Parrish *et al.*, 1998).

2.2 PROTEÍNAS DEL VIRUS

2.2.1 NS1

Es una fosfoproteína nuclear multifuncional de 76.7 kDa esencial para la replicación del PVC (Wang *et al.*, 1998). Esta proteína inicia la replicación genómica uniéndose específicamente al origen viral de mano derecha, junto con proteínas endógenas del grupo de alta movilidad y al origen de mano izquierda (Cotmore *et al.*, 1998) junto con proteínas de enlace de elementos moduladores de glucocorticoides (Christensen *et al.*, 1997a). El reconocimiento de ambos orígenes, lleva al corte específico de hebra y sitio del ADN viral. Este proceso requiere ATP para una unión fuerte y el subsiguiente corte (Christensen *et al.*, 1997b). NS1 permanece unida covalentemente al extremo 5' del ADN mellado y el grupo hidroxilo 3' restante puede ser usado para la síntesis de la cadena naciente. La replicación del virus está muy probablemente mediada por la polimerasa δ , en un proceso que depende de la ciclina (o antígeno nuclear de proliferación celular) (Nüesch *et al.*, 1995). La

transcripción desde un promotor de cápside viral, P38, es también incrementada por NS1. A su vez, esta proteína es responsable por el efecto citopático de los parvovirus, mediante la inducción de la apoptosis dependiente de caspasa-3 e independiente de p53 (Saxena *et al.*, 2013) además de tener interacción tardía con la Caseinkinasa II, lo que interfiere con la señalización intracelular, produce cambios morfológicos celulares a nivel de citoesqueleto y facilita la eficiente liberación de los nuevos virus y su propagación (Nüesch *et al.*, 2006). Se piensa que también asiste en el empaquetamiento del ADN viral dentro de las cápsides recién formadas (Blecker *et al.*, 2006).

2.2.2 NS2

Esta proteína es producida en el marco abierto de lectura izquierdo del genoma viral, tiene 87 aminoácidos amino-terminal en común con NS1 junto a 78 aminoácidos de un marco abierto de lectura alternativo. Las funciones de NS2 en la replicación de los parvovirus autónomos aún son pobremente entendidas. La mayoría de los estudios han sido hechos en el Virus Diminuto de los Caninos y parvovirus H1, donde las mutaciones en NS2 tienen como resultado replications pobres en sus células hospederas normales, aunque replican con una mayor pero variable eficiencia en células de otros hospederos (Brownstein *et al.*, 1992; Cater *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1991; Naeger *et al.*, 1990). Esta proteína es requerida para una eficiente producción del Virus Diminuto del Ratón (MVM por sus siglas en inglés) en células de ratón como resultado de un efecto en el ensamblaje de la cápside (Cotmore *et al.*, 1997), sin embargo Wang *et al.*, en 1998, muestra que mutaciones en NS2 del PVC no afectan en gran medida la replicación viral, la traducción de proteínas o el ensamblaje de la cápside, lo que indica que en el PVC, NS2 tiene diferentes propiedades que en los virus de roedores y que sus funciones para la replicación viral deben ser relativamente sutiles.

2.2.3 VP1

VP1 contiene la secuencia completa de VP2 así como una secuencia única N-terminal de 143 residuos. La región N-terminal de VP1 es necesaria para la infectividad de la cápside pero no para el ensamblaje de ésta. Esta proteína cambia su localización de interna a externa cuando es expuesta a condiciones físicas o químicas extremas tales como calor o bajo pH. Esta externalización juega un rol considerable en la infección viral (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2006). La Señal de Localización Nuclear (SLN) es una señal que asiste en la navegación de virus al núcleo, lo que conlleva a una posterior translocación nuclear. Un estudio previo identificó una SLN en los residuos N-terminal 4-13 de VP1 en el PVC y demostró que la translocación nuclear es un proceso ATP-dependiente (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997).

En la mayoría de Parvovirus, incluido el PVC, la región N-terminal de VP1 contiene un dominio de homología secretora de fosfolipasa A2 (PLA₂) que es una enzima lipolítica que destruye la membrana y permite la salida del virus del lisosoma (Ros *et al.*, 2006)

2.2.4 VP2

A pesar de ser un virus de ADN, el PVC posee una alta tasa de sustitución genética, similar a la reportada para virus de ARN (con valores de aproximadamente 10⁴ sustituciones por sitio por año) la cual es responsable de la continua evolución antigénica y el rápido desplazamiento de las antiguas cepas por nuevas variantes (Shackelton *et al.*, 2005). Este grado de variación genética y determinante del tropismo celular así como del rango de hospederos está determinado por la proteína VP2 (Strassheim *et al.*, 1994).

La infección viral, comienza con la adhesión del virus a un receptor de superficie celular. En los virus existe un ligando que en el caso de los parvovirus se encuentra en VP2, este se une al receptor celular y comienza la internalización. En el eje de simetría triple de VP2 en el PVC, hay un "pico" distintivo, basados en observaciones de la estructura en 3D. En la superficie de la cápside de VP2, hay una región considerada de unión al receptor, localizada

en la depresión con forma de cañón. Además una de las regiones de unión se localiza entre los dos ejes icosaédricos de simetría triple y otra está en el eje de simetría quántuple. Estas regiones se unen a los receptores celulares de transferrina (Tsao *et al.*, 1991).

El PVC está estrechamente relacionado con el virus de la Panleucopenia Felina (VPF) con el que comparte más del 98 por ciento de homología en secuencia de nucleótidos y tan pocas diferencias como 6 secuencias en nucleótidos codificantes para el gen VP2 en las posiciones 3025, 3065, 3094, 3753, 4477 y 4498 (Truyen *et al.*, 1995). Dos diferencias en el residuo 93 de VP2 de Lys a Asn y 323 de Asp a Asn entre el VPF y el PVC pudieron permitir la replicación en hospedero canino y que perdiera la habilidad para replicar en el hospedero felino (Chang *et al.*, 1992, Truyen *et al.*, 1992). La habilidad para replicar en el gato fue determinada al menos en parte por los residuos 80, 564 y 568 de VP2 que están en proximidad con la estructura de la cápside (Truyen *et al.*, 1996). En el año 1980 el PVC-2 fue reemplazado por la nueva variante PCV-2a que contenía sustituciones en los residuos 87 (de Met a Leu), 300 (de Ala a Gly) y 305 (de Asp a Tyr) estos aislados eran antigénicamente diferentes del PVC-2 y podían causar enfermedad en gatos (Parrish *et al.*, 1991; Truyen *et al.*, 1996). Una variante antigénica del PVC-2a reconocida en 1984 como PVC-2b, tenía sustituciones en VP2 en los residuos 426 (de Asn a Asp) y 555 (de Ile a Val), estas dos variantes reemplazaron mundialmente al virus original (Parrish *et al.*, 1985; Parrish *et al.*, 1991; Truyen *et al.*, 1996). En el año 2001 se reportó por primera vez la variante más reciente PCV-2c en Italia que presentó un cambio en el residuo 426 (de Asp a Glu) (Buonavoglia *et al.*, 2001) y es ahora la que cuenta con distribución mundial (Martella *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2004; Decaro *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2007; Hong *et al.*, 2007; Calderon *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2016; Pedroza *et al.*, 2015).

Se ha reportado que estas nuevas variantes tienen una mayor virulencia y una mayor excreción viral además de requerirse una dosis más baja de virus para una infección eficiente (Decaro *et al.*, 2011).

En cápsides completas, una proporción variable de VP2 es escindida después del residuo 19 por las proteasas del hospedero, para formar VP3 (Strassheim *et al.*, 1994; Weichert *et al.*, 1998) aunque no todos los parvovirus la poseen (Tu *et al.*, 2015).

2.2.5 VP3

La proteína VP3 es el componente minoritario de la cápside y resulta de una escisión proteolítica post-traducciona de 15 a 20 aminoácidos del extremo N-terminal de VP2, expuesto hacia el exterior de la cápside. Dicha escisión se realiza posteriormente al ensamblaje de las partículas virales que contienen el genoma viral (partículas completas). En las partículas virales carentes de genoma no se ha constatado la presencia de la proteína VP3 (Tsao *et al.*, 1991).

2.3 PATOGENIA

El PVC reconoce como tejidos diana para replicarse, las criptas intestinales y los órganos del tejido linfoide, pero puede diseminarse a todos los tejidos (Pollock, 1982) incluyendo el cerebro (Elia *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2009). Después de la penetración a través de la ruta oronasal, el virus replica en el tejido linfoide cercano (Stann *et al.*, 1984) y es diseminado por los linfocitos infectados al epitelio germinal de las criptas del intestino delgado.

Después de un par de días post infección, cantidades significativas de virus son liberados hacia la circulación sanguínea. Los siguientes 3-4 días los virus llegan a nuevos órganos con células en rápida división como la médula ósea y las criptas intestinales y forman grandes cuerpos de inclusión eosinofílicos intranucleares. La infección de leucocitos, mayormente circulantes y aquellos linfocitos asociados a tejido, induce linfopenia aguda (generalmente asociada a neutropenia) (Pollock, 1982).

En cachorros de 2-3 semanas, el PVC también replica en células cardíacas provocando una miocarditis fatal. Sin embargo, esta forma no es comúnmente observada actualmente ya que casi todos los cachorros son protegidos por anticuerpos derivados maternos (ADM) (Greene *et al.*, 2012).

La forma más característica de la parvovirus canina está representada por una enteritis hemorrágica, cuya gravedad es a menudo dependiente del título de ADM que tenga el cachorro al momento de la infección, así como de los títulos de anticuerpos post vacunales que tengan los perros adultos (Decaro *et al.*, 2005a; Taguchi *et al.*, 2011).

Los signos clínicos se observan después de un periodo de incubación de 3-7 días y son: anorexia, depresión, vómito y diarrea mucoide o sanguinolenta, con la frecuente deshidratación y fiebre. Dentro de la médula ósea, el virus es responsable por la destrucción de los precursores de las células mieloides del sistema inmune y por consecuencia, incapacita en grado variable el sistema de defensa del organismo. La leucopenia es un hallazgo común aunque el conteo total de células blancas puede estar dentro de intervalos normales debido a la neutrofilia debido a infecciones por bacterias oportunistas (Greene *et al.*, 2012). Infecciones pulmonares concurrentes (neumonía) pueden llevar a la aparición de distrés respiratorio. Infecciones subclínicas e inaparentes son frecuentes en cachorros con títulos de intermedios a altos de ADM (de 1:180 y 1:320 respectivamente) y en perros adultos (Decaro *et al.*, 2005a). La tasa de mortalidad puede ser variable, del 70 al 91% en cachorros y de 1 a 10% adultos (Greene *et al.*, 2012; Nandi *et al.*, 2010).

El intestino normal posee protrusiones parecidas a dedos llamadas "vellosidades" que a su vez poseen microvellosidades cuyo objetivo es incrementar la superficie de contacto para la absorción de fluidos y nutrientes. Las células de las vellosidades tienen una vida media relativamente corta (alrededor de 72 horas) y son rápidamente reemplazadas por células nuevas. Las fuentes de estas nuevas células son las áreas que se encuentran en rápida división llamadas *criptas de Lieberkühn* o criptas intestinales (Murphy *et al.*, 1999) y son el lugar en el que el PCV se replica, acabando con los enterocitos inmaduros. Sin nuevas células que reemplacen las células que se pierden, las vellosidades se acortan y son incapaces de realizar su función de absorción, lo que provoca diarrea. La barrera intestinal que separa las bacterias digestivas del torrente sanguíneo se rompe, la diarrea se vuelve

sanguinolenta y las bacterias pueden atravesar la barrera rota, llegar a la circulación sanguínea y causar septicemia. El virus puede ocasionar la muerte de dos maneras, el vómito y diarrea lleva a una pérdida extrema de fluidos y electrolitos (deshidratación) que resulta en un choque hipovolémico y muerte y por otro lado, la pérdida de la barrera intestinal permite la invasión bacteriana y su potencial diseminación al cuerpo entero (Greene *et al.*, 2012).

Las principales lesiones macroscópicas son enteritis catarral a hemorrágica y linfadenomegalia de mesentéricos y placas de Peyer son observadas en perros que mueren a causa de una infección por PVC. Histopatológicamente, el intestino es afectado por necrosis multifocal de criptas intestinales con cuerpos de inclusión intranuclear, mientras que en las placas de Peyer, nódulos linfáticos, bazo y timo, se observa una depleción extensa de linfocitos (Greene *et al.*, 2012).

2.4 DIAGNÓSTICO

2.4.1 Métodos tradicionales

Un diagnóstico rápido de PVC es especialmente importante en refugios y criaderos para aislar a los perros infectados y prevenir infecciones a otros animales susceptibles. El diagnóstico clínico es dudoso ya que muchos otros patógenos pueden causar diarrea en los perros, como coronavirus, adenovirus, morbilivirus, rotavirus, reovirus, norovirus; así como infecciones bacterianas (*Salmonella* spp, *E. coli*) o parasitarias (*Giardia* spp, *Ancylostoma* spp, *Toxocara* spp, *Isoospora* spp) (Green *et al.*, 2012). Por ello, un diagnóstico diferencial debe ser confirmado por pruebas de laboratorio. Existen varios métodos para el diagnóstico por laboratorio del PVC, el cual usualmente es llevado a cabo a partir de las heces (o contenido intestinal si el animal está muerto) de los perros afectados. Decaro *et al.*, en 2005a menciona que en las etapas tardías de la infección, la sangre con EDTA ha probado ser más útil para el diagnóstico, ya que la viremia del PVC es excepcionalmente larga, aunque ese tiempo puede variar dependiendo del título de anticuerpos que tenga el perro en el momento de la infección.

Los métodos tradicionales de diagnóstico que detectan antígeno viral por medio de métodos basados en anticuerpos, son usados en la práctica diaria pero se ha determinado que su sensibilidad, como la de otros métodos tradicionales, es inferior a la de los métodos moleculares. Un test de inmunocromatografía (IC) fue comparado con técnicas moleculares, demostrando que aunque su especificidad es del 100%, su sensibilidad no excede el 50% con respecto a las técnicas basadas en ácidos nucleicos. Esta baja sensibilidad ha sido asociada a la baja cantidad de virus excretada durante las etapas iniciales o tardías de la infección y/o en la presencia de altos títulos de anticuerpos anti PVC en el lumen intestinal que pueden secuestrar las partículas virales (Desario *et al.*, 2005). Hace tiempo existía la preocupación de que estos test rápidos no pudieran identificar la nueva variante PCV-2c y que eso contribuyera a su rápida diseminación (Kapil *et al.*, 2007), sin embargo usando kits de IC para identificar especímenes de las variantes de PVC, incluyendo 100 muestras de la recientemente identificada PVC-2c, se demostró que la tasa de detección de esta variante fue similar a las de PVC-2a y PVC-2b disipando así los temores teorizados pero no comprobados de la baja eficiencia de los kits rápidos para identificar la nueva variante (Decaro *et al.*, 2010). Técnicas alternativas como la hemaglutinación (HA) y el aislamiento viral (VI), pueden ser llevadas a cabo sólo en laboratorios especializados. Se requieren eritrocitos frescos, lo que causa problemas relacionados con el manejo y alojamiento de cerdos donadores. Eritrocitos de otras especies (gatos o macacos Rhesus) son difíciles de obtener en las cantidades requeridas o resultan muy costosos. No obstante, para una lectura clara de la prueba de HA, se requieren eritrocitos de buena calidad ya que la prueba es afectada por un coeficiente de sedimentación eritrocitario alterado, lo que puede ocurrir en caso de estrés o enfermedad del cerdo donador (Desario *et al.*, 2005). Además, se han reportado cepas de PVC-2 que no presentan actividad HA (Cavalli *et al.*, 2001). Sin embargo es una técnica que al realizarse en una placa con 96 pocillos, permite el procesamiento de muchas muestras y los resultados se leen en pocas horas. El VI requiere la disponibilidad de cultivos celulares que pueden ser usados sólo en laboratorios con personal especializado, además de ser tardado (5-10 días) y de pruebas adicionales como inmunofluorescencia o HA para detectar antígenos virales. La

gran desventaja de la HA y el VI es la baja sensibilidad, muy probablemente debido a anticuerpos en el lumen intestinal de los perros infectados, que se unen a los viriones y evitan la HA y la unión a los receptores celulares (Desario *et al.*, 2005). Ha sido demostrado en infecciones naturales (Decaro *et al.*, 2005b) y experimentales (Decaro *et al.*, 2005a) que el PVC es detectable por HA y/o VI sólo por pocos días post infección, por lo que estas técnicas pueden dar falsos negativos comparados con las grandes cantidades de ADN detectadas por un análisis por PCR de tiempo real.

La identificación por medio de microscopía electrónica de la morfología del PVC es muy poco sensible, aunque es posible concentrar partículas virales por medio de anticuerpos específicos en la técnica de microscopía inmunoelectrónica. Los antígenos virales también pueden ser detectados por medio de la inmunohistoquímica de secciones de tejido intestinal, cerebro o lengua (Greene *et al.*, 2012).

2.4.2 Métodos moleculares

Los métodos moleculares generalmente no son afectados por la respuesta inmune del paciente, pero son tardados, laboriosos y necesitan especialistas expertos. Un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos estuvo disponible desde los 90's (Remond *et al.*, 1992), después varios métodos fueron desarrollados que incrementaron la sensibilidad y especificidad en comparación con los métodos tradicionales (Desario *et al.*, 2005). Sin embargo, ninguno había sido diseñado para ser cuantitativo, hasta que se desarrolló un PCR de tiempo real basado en la tecnología TaqMan, este método tiene varias ventajas sobre el PCR convencional, permitiendo un gran aumento en el rendimiento y el procesamiento simultaneo de varias muestras. El PCR de tiempo real se realiza en un formato de 96 pocillos y muchos de los pasos son automatizados (Decaro, 2005d). La alta sensibilidad y reproductibilidad de este método permite la identificación de perros excretando PVC en heces aún en bajas cantidades, ayudando a establecer medidas preventivas en refugios y criaderos. Un PCR de tiempo real basado en SYBR Green fue propuesto como alternativa a la tecnología TaqMan con el mismo límite de detección (10 copias de ADN viral) (Kumar

et al., 2010). Estos métodos moleculares permiten la posterior clonación, secuenciación y alineamiento de la muestra para conocer la genovariante que se tiene por región.

2.5 CAMBIOS EN EL HEMOGRAMA DE PERROS CON PARVOVIROSIS CANINA

La leucopenia por neutropenia y/o linfopenia es el cambio hematológico más prominente en la enteritis por PVC debido a la destrucción de los precursores celulares de estas células, en médula ósea, la depleción de tejidos linfoides y al incremento en la demanda en un tracto intestinal intensamente inflamado. Algunas veces, también puede observarse anemia, trombocitopenia o trombocitosis, pancitopenia, leucocitosis neutrofílica y monocitosis (Boosinger *et al.*, 1982; Kali *et al.*, 2010; Goddard *et al.*, 2008; Sykes, 2014).

Los neutrófilos son el tipo de leucocitos más numerosos en la sangre ($3.0 - 11.5 \times 10^9/L$) y la primera línea de defensa una vez que la inmunidad innata ha sido superada. Son responsables de la destrucción de bacterias, hongos, levaduras, parásitos y virus, así como la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Un cambio en el recuento de neutrófilos generalmente dará como resultado un cambio en el recuento de leucocitos (Otto *et al.*, 1997). En la enteritis por PVC, la neutropenia grave no sólo puede atribuirse a la destrucción de mieloblastos mitóticamente activos en la médula ósea como un efecto directo de la virus, sino también puede estar relacionada con la endotoxemia y la posible sepsis que conduce a la marginación de los neutrófilos, así como a una pérdida masiva de neutrófilos a través de la pared intestinal y al no haber suficientes células precursoras, ya que son destruidas por el virus, no hay liberación de células en banda a la sangre y el conteo de neutrófilos disminuye considerablemente. (Woods *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 2001).

Los linfocitos son el segundo leucocito más común en sangre ($1.0 - 4.8 \times 10^9/L$) y son componentes esenciales de la respuesta inmune humoral y celular (Latimer *et al.*, 1989). Los mecanismos que pueden causar linfopenia grave en la enteritis por PVC incluyen los

siguientes: 1) linfopenia por infección aguda que puede ser el resultado de liberación endógena de altas concentraciones de cortisol (Schultze, 2000) que conduce a la redistribución de linfocitos y la captura de linfocitos en los ganglios linfáticos para promover el contacto con el antígeno; 2) efecto directo del virus que conduce a la atrofia o destrucción del tejido linfoide y 3) pérdida, secuestro u obstrucción del flujo de linfa rica en linfocitos como se ve en la enteropatía perdedora de proteínas (Woods *et al.*, 1980; Decaro *et al.*, 2002).

Los monocitos ($0.15-1.35 \times 10^9/L$) pueden ser monitoreados para prever una recuperación en el número de neutrófilos, ya que aunque los monocitos y los neutrófilos comparten una célula progenitora común, el tiempo necesario para producir un monocito en la médula ósea (3 días) es mucho más corto que el tiempo necesario para producir un neutrófilo (6 días) (Bienzle, 2000). Por lo tanto, la recuperación de los números de monocitos precederá a la de los neutrófilos en la sangre (Goddard *et al.*, 2008).

La producción de eosinófilos en la médula ósea es controlada por los linfocitos T, la eosinopenia es generalmente vista en la infección aguda. Aunque nunca se ha verificado, este hallazgo ha sido atribuido a la liberación endógena de cortisol. Una marcada eosinopenia vista en la infección por PVC puede ser causada por una combinación de mielosupresión, falta de linfocitos T para estimular la producción de eosinófilos en médula ósea y a la liberación endógena de grandes cantidades de cortisol (Goddard *et al.*, 2008).

Una vez superada la infección, se puede presentar una leucocitosis debido a que la señalización por citocinas existente, estimula a la médula a liberar hacia la sangre, altas cantidades de células o incluso por una infección bacteriana o endotoxemia que cause una alta demanda de neutrófilos (Greene, 2006; Nandi, 2013).

En muchos casos se observa anemia (conteo de eritrocitos $< 5.5 \times 10^{12}/L$) que es causada por pérdidas a través del intestino (diarreas hemorrágicas) debido a la pérdida de continuidad del epitelio intestinal y a la necrosis de las criptas intestinales aunque este

hallazgo puede estar camuflado por la hemoconcentración resultante de la deshidratación (Castro *et al.*, 2013). También es común encontrar hipoproteinemia (<60g/L) debido a la falta de aporte (por la disminución de apetito del perro) y a la pérdida por diarrea y hemorragias gastrointestinales (Greene, 2006; Castro *et al.*, 2013).

El conteo plaquetario también suele verse disminuido aunque en pocos casos, (<200 x10⁹/L), debido a que las plaquetas son usadas en las lesiones a nivel de criptas intestinales. Sus precursores en médula ósea no son afectados en la medida de otras líneas celulares por lo que sus conteos no se ven gravemente afectados y su recuperación es más rápida (Greene, 2006; Nandi, 2013; Sykes, 2014).

2.6 DESARROLLO DEL SISTEMA INMUNE DEL PERRO

2.6.1 Desarrollo *in utero*

Como para otras especies de animales domésticos, existe la suposición de que el cachorro recién nacido tiene los componentes constitutivos de un sistema inmune funcional, pero virgen o no improntado (no expuesto con anterioridad), que hasta la fecha ha estado bajo la influencia reguladora del entorno inmunitario materno (Felsburg, 2002). En el perro, el desarrollo del timo comienza el día 27 de gestación y se completa el día 45 (Kelly, 1963). Los linfocitos aparecen en el timo el día 35, en los ganglios linfáticos en el día 46 (Bryant *et al.*, 1972) y en el bazo alrededor del día 50-55. Los linfocitos esplénicos y tímicos fetales caninos pueden ser estimulados por mitógenos (factores que actúan en el ciclo celular estimulando la división celular) a partir del día 45 y 50 respectivamente (Bryant *et al.*, 1973). Pocos estudios han investigado si el desafío antigénico al feto canino o felino en desarrollo induce una respuesta inmune prematura en el útero, pero en el perro tales respuestas a una amplia gama de antígenos son posibles en el último trimestre de gestación (Krakowka, 1998).

2.6.2 Inmunidad materna

El aspecto mejor documentado del desarrollo del sistema inmune en el perro se relaciona con el requisito esencial de la transferencia pasiva de inmunidad a través de la ingestión de inmunoglobulinas (Ig) del calostro, ya que al tener una placentación endoteliocorial (que comprende el endotelio materno y el epitelio coriónico), existe una barrera relativamente impenetrable a la transferencia intrauterina de inmunoglobulina materna. En general, se acepta que pequeñas cantidades de IgG pueden atravesar esta barrera, de modo que el cachorro recién nacido tiene una concentración sérica de IgG que se aproxima al 5% del nivel adulto. En las primeras 24 horas después del nacimiento, el cachorro debe ingerir calostro rico en inmunoglobulina que proporciona protección inmunitaria adquirida pasivamente a través del período neonatal. Esta transferencia se permite a través de mecanismos tales como la baja concentración de enzimas proteolíticas intestinales y la expresión transitoria del receptor de inmunoglobulina $Fc\gamma R_n$ intestinal que permite la absorción de IgG en las circulaciones linfáticas y vasculares neonatales. IgM e IgA también se absorben, pero no se sabe específicamente si la IgA calostrual se absorbe significativamente y se vuelve a secretar, o permanece en gran parte dentro de la luz intestinal. De forma similar, hay poca información publicada sobre si podría haber absorción de otras proteínas (por ejemplo, citocinas) o leucocitos maternos del calostro. Puede haber una variación considerable entre los compañeros de camada en la eficacia de la captación de inmunoglobulina calostrual; relacionado con aspectos individuales (tamaño y fuerza) del recién nacido y las habilidades maternas de la perra. También puede haber variación en la concentración de anticuerpos específicos dentro del calostro (Day, 2007).

El calostro canino es rico tanto en IgG como en IgA y ambas inmunoglobulinas están presentes en concentraciones más altas que en el suero de la perra. Por el contrario, la leche contiene significativamente más IgA que IgG y esta IgA también está presente en una mayor concentración que en el suero canino (Hedde, *et al.*, 1975). Los cachorros recién nacidos tienen una concentración sérica de IgG de 1,2 mg/ml que aumenta a 23 mg/ml 12 horas después de la ingestión de calostro. La concentración de IgA en suero es de 0,45 mg/ml y de IgM 0,2 mg/ml (Kolb, 2003).

La absorción de anticuerpos derivados maternos (ADM) es una espada de doble filo para el perro. Por un lado, este es un proceso esencial, cuya falla rápidamente conduce a infección neonatal y muerte, pero por el otro, la presencia de altas concentraciones de inmunoglobulina materna inhibe el desarrollo de la respuesta inmune neonatal endógena hasta el momento en que suficiente de esta proteína materna se ha degradado para permitir una respuesta endógena. La vida media reportada para la IgG materna es de aproximadamente 8 días en cachorros (Casal *et al.*, 1996). Además, se ha sugerido que la tasa de crecimiento del recién nacido contribuye a la velocidad de degradación de las proteínas de inmunidad materna, lo que implica que las razas de rápido crecimiento eliminarán más rápido estas inmunoglobulinas (Chappuis, 1998). Se sabe que en ausencia de transferencia pasiva de inmunidad, los cachorros recién nacidos pueden responder a antígenos (por ejemplo, una vacuna de parvovirus) tan pronto como a las 2 semanas de edad (Toman *et al.*, 2002). Cachorros de un día que carecen de ADM, que se vacunaron contra parvovirus con vacunas activas modificadas tuvieron una respuesta serológica (similar en magnitud a la de los cachorros mayores), de 21 a 91 días después de la vacunación (Chappuis, 1998).

Por lo tanto, el punto en el que un cachorro recién nacido se vuelve inmunocompetente (considerado generalmente entre las 6 y 12 semanas de edad) es determinado por la concentración de inmunoglobulina calostrada ingerida. Esto significa que no es posible predecir con precisión el inicio de la inmunocompetencia para cualquier animal recién nacido. Ahí radica la base que ha sustentado la vacunación neonatal de cachorros durante las últimas cuatro décadas: el requisito (usando vacunas convencionales) de administrar al menos dos dosis de vacuna para garantizar que al menos una se administra durante el período de inmunocompetencia. Está claro que una de las ventajas de la nueva tecnología vacunal (por ejemplo, vacunas moleculares o vectorizadas) es la capacidad de tales productos para estimular inmunidad endógena aún frente a ADM (Day, 2007).

2.6.3 Maduración neonatal

Se han realizado pocos estudios del desarrollo del sistema inmune dentro de los primeros 6 meses de la vida del cachorro. La mayoría de los estudios de inmunidad se realizan en animales de más de 12 meses de edad, que es cuando se consideran completamente inmunocompetentes. Los cambios sustanciales dentro del sistema inmune desde el nacimiento hasta 1 año, están poco documentados (Day, 2007).

Se acepta que la concentración de inmunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA) no alcanzan los niveles completos de adultos hasta los 12 meses de edad. Un estudio informa concentraciones séricas de IgG, IgM e IgA en Beagles de 10 meses de edad; que son menores que las de los perros más viejos (Schreiber *et al.*, 1992). La concentración de otras proteínas séricas también aumenta con la edad de 6 semanas a la edad adulta en el perro, aunque la de las globulinas alfa-1 muestra la tendencia inversa (Kraft *et al.*, 2004).

Poco se sabe sobre la maduración de las poblaciones linfoides en el cachorro en desarrollo. El recuento de linfocitos en la sangre de los perros aumenta durante la primera semana de vida, mientras que el número de neutrófilos disminuye. Durante los primeros tres meses de vida, los cachorros tienen recuentos de linfocitos en sangre más altos que los perros adultos, pero proporcionalmente más de estas células son células B CD21⁺. Estas células B disminuyen en número hacia las 16 semanas de edad. Aunque el porcentaje de células CD4⁺ en sangre permanece relativamente estable desde el nacimiento hasta la edad adulta en perros, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ es bajo al nacer (causando una alta proporción de CD4⁺:CD8⁺) y aumenta con la edad (Faldyna *et al.*, 2001). Estos linfocitos en sangre son capaces de responder a la estimulación con mitógenos (por ejemplo, Concanavalina A), pero más débilmente que las células de perros adultos (Toman *et al.*, 2002). Los linfocitos T caninos en sangre pueden expresar moléculas MHC de clase II y esta expresión se desarrolla durante los primeros meses de vida (Holmes *et al.*, 1994).

El timo de los perros recién nacidos comprende aproximadamente el 12% de células CD4⁺ y el 3% de células CD8⁺, con el 69% de células doble positivas y el 13% de células doble negativas (Somberg *et al.*, 1994).

En el perro hay una disminución progresiva del timo e involuciona entre los 6 y los 23 meses de edad (Ploeman *et al.*, 2003).

La maduración temprana de las vías del complemento y la función de las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) o las células presentadoras de antígenos (células dendríticas) u otros aspectos de la inmunidad innata no se han investigado en ningún grado en el perro. Algunos estudios han investigado aspectos del desarrollo de la inmunidad de la mucosa en el perro. Los cambios fisiológicos e inmunológicos ocurren dentro del tracto gastrointestinal durante la maduración. Durante la ingestión de calostro, las vellosidades del intestino delgado canino aumentan de tamaño debido a la hipertrofia de los enterocitos con vacuolización citoplásmica y dilatación de los capilares linfáticos (Paulsen *et al.*, 2003).

2.6.4 Aspectos genéticos de la competencia inmune

En perros existe una extraordinaria heterogeneidad en el fenotipo a través del establecimiento de razas puras; un cambio que ha ocurrido en gran medida en los últimos 200 años. Con esta endogamia selectiva, es probable que exista una gran diversidad en el funcionamiento del sistema inmunitario canino. Esto ha sido claro durante muchos años, en base a la susceptibilidad única de razas de perros particulares a enfermedades tanto infecciosas como neoplásicas, mediadas inmunológicamente. Los elementos genéticos clave de la respuesta inmune se encuentran dentro de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC); presente como el antígeno leucocitario del perro (DLA). Estudios recientes de haplotipos de DLA y mapeo de genoma en el perro han mostrado una variación entre razas pero heterogeneidad intragrupal limitada en el fondo genético (Kennedy *et al.*, 2002). Esto sugeriría que las razas de perros específicas tienen una función inmune determinada genéticamente y los estudios recientes concuerdan con los patrones de

respuesta serológica específicos de la vacunación (Kennedy *et al.*, 2005). Además, existe una variación de raza en las proporciones de subconjuntos de linfocitos sanguíneos (Faldyna *et al.*, 2001). Es probable que tal fondo genético también afecte a la maduración y respuesta del sistema inmune en estas especies (Day, 2007).

2.6.5 Vacunación durante el período de maduración inmune

Está claro que el sistema inmune de los perros y gatos recién nacidos, si bien es totalmente capaz de responder al desafío antigénico, no responderá de la misma manera que la de un perro o gato adulto. Aunque han sido pobremente definidos, los eventos de maduración tienen lugar durante el primer año de vida en estas especies. El desafío inmunológico les damos a los recién nacidos de estas especies a través de la vacunación debe tener un impacto claro en esta respuesta inmune en desarrollo. Nuestra expectativa es que esto será de una manera positiva; generando inmunidad protectora sólida y células de memoria específicas de antígeno (Day, 2007).

Sin embargo, no debemos perder de vista el hecho de que, al mismo tiempo, estamos desafiando un sistema inmune virgen y en evolución, por lo que es posible que no se aprecie el impacto total de ese desafío. La vacunación de animales adultos conduce a alteraciones en los parámetros inmunes en el periodo post-vacunal (Strasser *et al.*, 2003) y, al menos en una pequeña proporción de animales neonatos, la vacunación puede conducir potencialmente a una amplia gama de posibles consecuencias adversas. Algunos estudios han investigado los efectos de la vacunación en el sistema inmune de los cachorros y han demostrado alteraciones inmunológicas. Por ejemplo, un grupo informó linfopenia y una respuesta aumentada de los linfocitos sanguíneos a los mitógenos 7 días después de la vacunación, si esta respuesta es exagerada, puede inhibir la proliferación linfocitaria vía Chk2 (Miyamoto *et al.*, 1992; Nikitin *et al.*, 2014) pero este hallazgo no se replicó en otro estudio de vacunación de cachorros galgos en el que tampoco hubo efecto sobre las proporciones circulantes de linfocitos CD4+ e IgG (McMillen *et al.*, 1995). A pesar de estas observaciones, no hay duda de que, en términos de riesgo-beneficio, la vacunación

neonatal es crucial para la protección del individuo y la población en general de las enfermedades infecciosas que amenazan la vida.

2.7 TRATAMIENTO

La restauración del balance de fluidos y electrolitos es la meta más importante de la terapia (Woods *et al.*, 1980). El paciente deberá tener manejo antibiótico de amplio espectro, micronutrición enteral y en caso necesario, soporte coloidal, suplementación de potasio (evita debilidad, íleo paralítico y compromiso cardiaco), también se debe monitorear la glucemia y suplementar las deficiencias (Rudloff *et al.*, 2014). Para el control del vómito, se usan antagonistas del receptor de serotonina (ondansetrón o dolansetrón) que han demostrado mayor eficacia que los antagonistas dopaminérgicos como la metoclopramida, (Prittie, 2004). El reciente uso del maropitant, un antagonista de los receptores de neurokinina-1 ha mejorado substancialmente la eficacia de los tratamientos antieméticos en los perros (De la Puente *et al.*, 2007; Ramsey *et al.*, 2008).

La estrategia "nada por boca" ha sido reevaluada en épocas recientes. La nutrición enteral se asocia a una mejora en la integridad de la mucosa intestinal, a una reparación más rápida y como resultado, pocas probabilidades de translocación bacteriana (Prittie, 2004). La nutrición parenteral rara vez se necesita ya que la enfermedad generalmente presenta un curso agudo (Mohr *et al.*, 2003). También se han reportado buenos resultados con el uso de glutamina (Souba *et al.*, 1988; Rhode *et al.*, 1996; Wilmore, 1997; Ardawi, 1998; Miller, 1999). En cuanto al manejo del dolor, algo frecuente en la parvovirus canina como resultado de la severa enteritis (y menos comúnmente a una intususcepción) y que puede afectar en demasía el apetito (Kalli *et al.*, 2010), se debe asegurar un analgésico dentro de la terapia de base. Butorfanol, buprenorfina o tramadol pueden ser útiles. Interesantemente el maropitant es un bloqueador de la sustancia P, que es un mediador del dolor visceral, por lo que proporciona cierta acción analgésica (Boscan *et al.*, 2012).

2.7.1 Otros tratamientos

Se ha informado el uso de suero de perros convalecientes que se han recuperado de la infección por PVC, como medio de proporcionar inmunización pasiva. En un estudio reciente Prittie, en 2004 probó la administración de una sola dosis de 12 ml de plasma inmune como tratamiento adyuvante para la infección con PVC después de la aparición de signos clínicos. Este estudio se basó en las recomendaciones para la administración de plasma en otras enfermedades infecciosas (Greene, 2006) y el plasma inmune utilizado en los perros tratados tuvo una titulación promedio de anticuerpos IgG de 1:7000 lo cual es considerado un título alto, aunque de cualquier manera, concluyeron que no se mejoró ningún parámetro, incluidos el tiempo de recuperación de leucocitos, carga viral, severidad de los hallazgos clínicos y duración de la hospitalización, a menos que se proporcione un volumen mayor de plasma antes de la presentación de los signos clínicos, ya que en este estudio, se administró el plasma poco después de que los perros llegaran a consulta, por lo que pudieron estar en una etapa muy avanzada de enfermedad para que el plasma cambiara el curso de la enfermedad (Bragg *et al.*, 2012).

El interferón- ω felino recombinante (rFeIFN- ω) ha sido prometedor en estudios previos. En dos estudios en perros con parvovirus natural, la gravedad de los signos clínicos y la mortalidad se redujo significativamente en aquellos tratados con rFeIFN- ω (2,5 mU/kg, por vía intravenosa, diariamente durante 3 días) Sin embargo, la poca disponibilidad y el costo particularmente alto impiden que rFeIFN- ω sea incluido regularmente en el entorno clínico (De Mari *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2002).

El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), una citocina que estimula potentemente la producción de neutrófilos y su liberación de la médula ósea, esta citocina ha sido recomendada para el tratamiento de la neutropenia inducida por PVC (Kraft *et al.*, 1995). Sin embargo, en dos estudios posteriores se concluyó que la administración de G-CSF recombinante humano (rhG-CSF) a perros con enteritis parvoviral, no fue efectiva para estimular la recuperación de neutrófilos (Rewerts *et al.*, 1998; Mischke *et al.*, 2001).

Una de las principales desventajas del rhG-CSF es la rápida inducción de anticuerpos neutralizantes que no sólo neutralizan la citocina de origen humano, sino que pueden neutralizar también la G-CSF canina endógena (Reagan *et al.*, 1995). El G-CSF recombinante canino (rcG-CSF) fue probado en perros en varios estudios, incluyendo perros sanos (Obradovich *et al.*, 1991), perros con hematopoyesis cíclica (Mishu *et al.*, 1992) y perros con inmunosupresión por mitoxatrina (Ogilvie *et al.*, 1992) observándose buenos resultados. En 2010, Duffy *et al.*, observaron una mejoría hematológica en los días 4 y 5 en los perros tratados con rcG-CSF, en comparación con el grupo control, las cinéticas de conteos de neutrófilos y leucocitos totales de los perros tratados, fueron consistentes con las reportadas anteriormente por Ogilvie *et al.*, e inclusive, observaron una reducción significativa en el tiempo de hospitalización de los perros tratados, sin embargo a pesar de los efectos hematológicos positivos mostrados, también observaron que la supervivencia del grupo tratado fue estadísticamente reducida, comparada con el grupo control, ésta fue atribuida a un posible efecto adverso de la administración de crG-CSF, debido a que en humanos, la administración de rhG-CSF ha sido asociada con efectos raros pero graves, incluida la inducción de lesión pulmonar aguda y trastornos cardiovasculares (Tigue *et al.*, 2007; Anderlini *et al.*, 2008) así como anormalidades plaquetarias y de coagulación (Anderlini *et al.*, 2008).

Otros estimulantes de inmunidad como el Zylexis no han demostrado efecto en el tiempo de recuperación o en la mortalidad, ni en cambios significativos de todos los parámetros hematológicos (Proksch *et al.*, 2014). Esta falla en este tipo de estimulantes de inmunidad en la parvovirus canina es atribuible a la pobre o nula respuesta de la médula ósea infectada por el virus, debido a la destrucción de células precursoras de leucocitos. Los efectos observados en este tipo de estimulantes han sido un incremento en el conteo de linfocitos (que pudo haber sido causado por una estimulación del sistema inmune no específico) y en el título de anticuerpos, 7 días y de 7 a 14 días respectivamente, después de iniciado el tratamiento, por lo que es muy posible que el efecto benéfico potencial de estos

“Correlación de la cinética de severidad de la enfermedad, conteo total de leucocitos y títulos de IgG contra Parvovirus canino, en perros naturalmente infectados (vacunados y no vacunados).”

inductores de inmunidad inespecífica ocurra muy tarde como para ser de ayuda en una enfermedad de curso agudo como la causada por el PVC (Proksch *et al.*, 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La parvovirus canina fue reconocida en los años 70's como una de las enfermedades entéricas más importantes que pueden afectar a perros de cualquier edad, raza y sexo y que se encuentra distribuida mundialmente.

La médula ósea, al ser mitóticamente activa, también se ve afectada en grado variable por la infección viral, dando como resultado leucopenias que van de leves a severas. Este cambio en el conteo total de leucocitos ha sido usado como método para evaluar la respuesta al tratamiento y dar un pronóstico al paciente (Goddard *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2013), sin embargo existe otros factores a tomar en cuenta como lo son el estatus de vacunación y el título de anticuerpos.

El control de la enfermedad ha sido realizado a través de la vacunación, donde se ha demostrado que un título de anticuerpos considerado protector está relacionado con la carga de excreción viral en heces, el tiempo de excreción postinfección así como a la protección a la infección de campo, sin embargo, se han reportado perros con altos títulos de anticuerpos que se infectan de forma natural (Decaro *et al.*, 2005a).

Actualmente no hay reportes que indiquen la correlación de estas variables en México evaluando perros infectados naturalmente, hospitalizados en condiciones de clínica. Los estudios en otros países han sido enfocados a evaluar conteo y diferencial leucocitario al momento del ingreso o dentro de los tres primeros días de hospitalización, hay pocos estudios con cinéticas durante todo el tiempo que se encuentran hospitalizados los pacientes. Se tienen así mismo, existen estudios enfocados a los títulos de anticuerpos previos a la infección sin evaluar su comportamiento durante el tiempo de hospitalización y su relación con las otras variables.

4. JUSTIFICACIÓN

La gastroenteritis por *Parvovirus canino* es una de las enfermedades virales gastroentéricas más comunes en cachorros generalmente menores de 6 meses, que, sin embargo, puede afectar a perros susceptibles de cualquier edad (Appel *et al.*, 1978).

Se ha demostrado que un título alto de anticuerpos no evita en todos los casos el desarrollo de la enfermedad ni la presentación de signos clínicos y aunque la vacunación se reporte como una ventaja ante la enfermedad (Nandi *et al.*, 2013), una vez establecida la infección es necesario dar seguimiento a la respuesta inmune para establecer el pronóstico del paciente (Goddard *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2013).

Actualmente, no existe un estudio de cinéticas del conteo leucocitario y los títulos de anticuerpos en infecciones de campo con *Parvovirus canino* y su impacto en la mortalidad y tiempo de recuperación clínica del paciente vacunado y del no vacunado.

5. HIPÓTESIS

En perros con Parvovirus Canina, que previamente fueron vacunados, el puntaje de la severidad de la enfermedad, el tiempo de hospitalización y la frecuencia de leucopenia son menores mientras que, los títulos de IgG sérica contra PVC son mayores.

6. OBJETIVOS

General

- Evaluar la correlación entre hallazgos clínicos, hematológicos, títulos de IgG sérica contra PVC y la evolución de la enfermedad, en perros con parvovirus canina infectados naturalmente y que contaban con distintos estatus vacunales.

Específicos

- Determinar el puntaje de severidad de la enfermedad a través de herramientas clínicas y de laboratorio (tabla de puntaje de enfermedad, modificada de Nakamura *et al.*, 2001 y hemograma), así como el tiempo de recuperación entre grupos, llevando la misma terapia de soporte.
- Determinar la cinética de los cambios hematológicos en los perros a lo largo del periodo de hospitalización.
- Determinar la cinética de la respuesta inmunológica serológica (IgG) de los pacientes infectados con PVC a lo largo del periodo de hospitalización.
- Analizar y comparar estadísticamente los resultados entre perros vacunados y no vacunados.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Criterios de inclusión y exclusión

Inclusión:

- Perros de cualquier raza
- Género indistinto
- Perros con signos gastroentéricos que fueron positivos a PVC por PCR de punto final.
- Consentimiento por escrito firmado por el propietario.

Exclusión:

- Pacientes negativos por PCR a la enfermedad
- Perros que recibieron alguna vacuna en un periodo menor a 15 días previos al momento de la consulta
- Pacientes no dejados en hospitalización o que se hospitalizaron y posteriormente, el propietario solicitó alta voluntaria.

7.2 Tipo de estudio y animales

Se realizó un estudio prospectivo observacional, a población abierta, transversal; en el periodo comprendido de Enero de 2016 a Diciembre de 2016. El estudio se realizó cumpliendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana de Investigación Animal Experimental NOM-062-ZOO-1999. La aprobación de un comité de ética no es necesaria para estudios de casos clínicos debido a que el muestreo y recolección de muestras son realizados para procedimientos estándares (Sundaran *et al.*, 2015).

Los perros fueron asignados a dos grupos de acuerdo a su estado inmune, vacunados y no vacunados, según lo reportado por sus propietarios. Los pacientes fueron atendidos en el

Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Universidad Autónoma del Estado de México, así como de clínicas privadas cercanas.

7.3 Puntaje de la severidad de la enfermedad

En el momento de la consulta, se realizó examen físico general en todos los perros con signos gastroentéricos, también se tomaron datos de la historia clínica. Los parámetros en los que se hizo énfasis y se registraron fueron los encontrados en la tabla de severidad usada para este estudio, que fue modificada de Nakamura *et al.*, en 2001. (Tabla 1).

Tabla 1. Sistema de puntaje para signos clínicos en infección por PVC.

SIGNOS CLÍNICOS		CALIFICACIÓN
Temperatura rectal °C		
<36		3
37 - 36.1		2
37.1 – 37.9		1
38 – 38.9		0
39 – 39.9		1
40 – 40.4		2
> 40.5		3
Conteo leucocitario x 10 ⁹ /L		
<3 meses	>3 meses	
8.5 - 16	4.2 – 19.9	1
4 - 8.5	2 – 4.1	2
0 - 4	0 - 2	3
Diarrea		
Mucoide		1
Acuosa		2
Sanguinolenta		3
Anorexia		1
Vómito		1
Depresión		1
Deshidratación		
Leve		1
Moderada		2
Severa		3

Calificación global: _____

Escala de puntuación	Puntos
Severidad Baja:	1 a 5
Severidad Media:	6 a 10
Severidad Alta:	11 a 15

7.4 Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico de PVC fue realizado a través de PCR de punto final. Una muestra fecal de cada paciente fue tomada por hisopado rectal. Esta muestra fue suspendida en 500 µl de agua libre de nucleasas. Posteriormente, 200 µl del homogeneizado, fueron usados para la extracción de ADN, utilizando el kit de extracción Qamp® DNA Stool (QIAGEN, Mainz, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las extracciones de ADN fueron cuantificadas con el espectrofotómetro Q5000 Quawell (Quawell Technology, Inc. San José, CA, U.S.A). 100 ng de ADN de cada muestra fueron usados para las reacciones de PCR de un volumen final de 50 µl. Se utilizó un par de iniciadores previamente diseñados en nuestro laboratorio para amplificar un fragmento de 275 pb. ParvoInt2FB (5'-TCAAGCAGATGGTGATCCAAG-3') y ParvoInt2CR (5'-GGTACATTATTTAATGCAGTTA-3') localizados en los nucleótidos 1,107-1,130 y 1,360-1,382 respectivamente, del gen VP2 (número de acceso del GenBank: FJ0051962c). Las reacciones de PCR fueron realizadas usando 2 µl de cada iniciador (200 nM), 12.5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, U.S.A) conteniendo polimerasa ADN, Buffer de reacción (pH 8.5) y 400 µM de cada nucleótido (dATP, dGTP, dCTP and dTTP); 3 mM de MgCl₂ y 28.5 µl de agua libre de nucleasas. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final a 72°C por 5 minutos.

7.4.1 PCR anidado (nPCR)

Las muestras negativas se comprobaron mediante nPCR. Este procedimiento fue realizado inicialmente amplificando un fragmento de 1,740 pb usando los iniciadores ParvoExt1f (5'-ATGAGTGATGGAGCAGTTCA-3') y ParvoExt3R (5'-AGGTGCTAGTTGAGATTTTTCATATAC-3'), diseñados usando las secuencias de nucleótidos 1–20 y 1,712–1,740 del gen VP2 del Parvovirus Canino (Número de acceso GenBank FJ0051962c). La reacción fue estandarizada a un volumen final de 50 µl conteniendo 1 µl de Polimerasa ADN GoTaq® Flexi 5 U/µl (Promega), 5 µl de GoTaq® Flexi buffer 5X Green, 3 µl de MgCl₂ 25mM, 4 µl dNTP's 200 µM, 2 µl de iniciadores, 10 µl de ADN con una concentración final de 100ng y 23 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 94°C por 5 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto y 1 ciclo a 72°C por 5 minutos. Posteriormente, 1 µl del producto de esta reacción fue usado como ADN templado para el segundo PCR (procedimiento anidado), los iniciadores y las condiciones de la segunda amplificación fueron las mismas que para el fragmento de 275 pb. Las muestras que resultaron positivas con este procedimiento se anexaron al estudio.

En todos los diagnósticos, se utilizó un control positivo con virus vacunal (Puppy DP, MSD Salud Animal, USA) y un control negativo. Los productos finales de la amplificación fueron identificados mediante electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% teñido con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y visualizado con un transluminador UV.

7.5 Titulación de anticuerpos

Las soluciones usadas se muestran en los anexos.

La sangre de cerdo obtenida, se deja en solución Alsever en proporción 1:1 al menos 24 horas.

1. *Lavado de los eritrocitos de cerdo:* Se centrifuga la sangre de cerdo con Alsever a 2500 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante y se adiciona solución de

fosfatos buferada a pH 7 (PBS) 1:1. Centrifugar 10 minutos a 2500 rpm y repetir. Eliminar todo el sobrenadante para dejar sólo los eritrocitos.

2. *Inactivación del suero*: preparar una dilución 1:10, con 100 µl del suero problema y 900 µl de PBS. Esta solución se colocará en baño seco a 56°C por 30 minutos.

3. *Adsorción*: se colocan 100 µl de suero inactivado y 100 µl de eritrocitos puros de cerdo. Dejar reposar 2 horas a temperatura ambiente.

4. *Centrifugar*: a 1500 rpm por 5 minutos.

5. Preparar el antígeno (ya titulado por HA) con PBS, dependiendo del número de muestras a realizar.

6. Colocar 25 µl del antígeno en todos los pocillos de las muestras y en el control positivo.

7. Recuperar 25 µl del suero adsorbido ya centrifugado y colocarlo en el primer pocillo de la placa, mezclar 10 veces, pasar al siguiente pocillo y mezclar por 6 veces, repetir hasta terminar hilera y desechar los 25 µl sobrantes, dejar reposar por una hora a temperatura ambiente.

8. Agregar 50 µl de eritrocitos de cerdo al 1% (en una solución de PBS más albúmina sérica bovina) en todos los pocillos.

9. Refrigerar a 4°C, leer placa cuando el control eritrocitos este marcado (2 horas aproximadamente) (Carmichael *et. al.*, 1979).

El título de HI fue indicado como la mayor dilución del suero que inhibe la hemoaglutinación completamente. Esta prueba fue realizada en microplacas de 96 pocillos con fondo en v.

7.6 Tratamiento médico

Los pacientes fueron tratados bajo un protocolo estándar de terapia endovenosa, cristaloides, antibioterapia de amplio espectro así como infusiones de dextrosa y medicación antiemética y analgésica que fueron administrados cuando estuvo indicado. También se manejó nutrición enteral.

7.7 Procedimiento de muestreo y recolección de datos

En total se evaluaron 56 perros positivos a PVC que exhibían uno o más de los signos clínicos clásicos de la infección por PVC (depresión, anorexia, diarrea ya sea mucoide, acuosa o hemorrágica, vómito y deshidratación).

A los 56 perros se les tomaron muestras para hemograma y se realizó examen físico general al momento de la admisión (día 0). Se realizó un muestreo cada 48 horas hasta el momento de alta o defunción. Cada uno de estos 56 perros se sometió a un examen físico completo y a un conteo total de leucocitos con diferencial. Las muestras para hemograma tomadas el día de la admisión fueron realizadas en un contador automático IDEXX VetAutoread™ del IDEXX VetLab® Station, y posteriormente se realizaban conteos manuales a doble ciego. Todos los diferenciales celulares fueron realizados manualmente contando de 25 a 100 células dependiendo de la severidad de la leucopenia. Hematológicamente se dividió a los perros en edades de 3 meses o más y menores de 3 meses. La leucopenia en este estudio se definió como un total de leucocitos $<6.0 \times 10^9/L$ para perros con tres meses de edad o más y $<8.5 \times 10^9/L$ para perros menores de 3 meses; neutropenia $<3.0 \times 10^9/L$ para perros mayores de 3 meses y $<3.7 \times 10^9/L$ para perros menores. Los siguientes valores fueron igual para ambos grupos de perros: conteo de neutrófilos banda de 0 a $0.3 \times 10^9/L$ y linfopenia $< 1.0 \times 10^9/L$. Los valores de referencia usados para el valor de corte fueron tomados del Laboratorio Clínico del HVPE de la UAEM.

7.8 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando test exacto de Fisher, t de Student y correlación de Spearman. Las diferencias fueron consideradas con un mínimo de 0.05 de nivel de significancia (p). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa GraphPadPrism® versión 7.

8. RESULTADOS

De los 56 perros admitidos al estudio 32 fueron machos y 24 hembras, todos enteros. 43 perros fueron de raza y 13 mestizos, todos los perros fueron cachorros cuya edad se encontró entre 2 y 10 meses. 24 perros contaron con historia de vacunación (Tabla 2). Del total de perros en el estudio, 46 sobrevivieron (82%), de los cuales 21 fueron vacunados; 10 (18%) murieron, 7 de ellos no vacunados. 3 perros fueron eutanasiados debido al mal pronóstico, de éstos 1 estaba vacunado.

“Correlación de la cinética de severidad de la enfermedad, conteo total de leucocitos y títulos de IgG contra Parvovirus canino, en perros naturalmente infectados (vacunados y no vacunados).”

Tabla 2. Registro de casos, raza, sexo, edad, días enfermos antes de llegar a consulta, número de vacunas y desenlace de la enfermedad.

Perros vacunados							Perros no vacunados					
Caso	Raza	Sexo	Edad (meses)	Días enfermo	No. de vacunas	Vive	Caso	Raza	Sexo	Edad (meses)	Días enfermo	Vive
1	Chihuahueño	H	5	3	3	+	2	Chow-Chow	M	3	2	+
3	Husky	M	2	3	1	+	5	Schnauzer	H	2	1	+
4	Cocker	M	4	2	1	+	8	Mestizo	M	3.5	1	+
6	Pastor Belga	H	5	1	4	+	9	Fila Brasileiro	M	3	2	+
7	Poodle	H	9	5	2	+	10	Poodle	M	7	3	+
14	Akita	H	4	1	1	+	11	Poodle	H	7	3	+
15	Golden Retriever	M	5	3	1	+	12	Poodle	M	7	3	+
18	Chihuahueño	M	8	3	1	+	13	Pitbull	M	5	4	+
19	Poodle	H	3	2	1	+	16	Dachshund	H	10	2	+
20	Pastor Alemán	M	3	2	3	-	17	Mestizo	H	8	3	+
23	Pitbull	M	5	1	2	+	21	Basset Hound	H	2	1	-
24	Chihuahueño	M	4	2	1	+	22	Mestizo	M	6	2	+
25	Chihuahueño	H	4	2	1	+	26	Bóxer	H	8	4	+
30	Pitbull	M	4	3	1	+	27	Bóxer	M	7	4	+
37	Pastor Alemán	M	3.5	1	2	+	28	Mestizo	H	4	3	+
39	Chihuahueño	H	4	3	1	+	29	Pitbull ^a	H	3	3	-
42	Beagle	M	8	1	4	+	31	Akita	M	2.5	4	-
43	Antiguo Pastor I	H	6	2	2	+	32	Akita	H	2.5	4	+
44	Pitbull	M	4	1	1	+	33	Mestizo	M	3	1	-
45	Labrador	M	6	5	2	+	34	Mestizo	M	3	1	-
47	Pitbull	M	4	1	1	-	35	Mestizo	H	3	1	-
48	Chihuahueño	H	8	2	1	+	36	Mestizo	H	3	1	+
55	Xoloitzcuintle	M	2	7	1	+	38	Poodle	M	6	1	+
56	Mestizo ^a	M	6	8	3	-	40	Mestizo	M	4	1	+
							41	Mestizo	M	5	2	+
							46	Mestizo	M	4	2	+
							49	Labrador	H	8	2	+
							50	Poodle	M	6	2	+
							51	Cocker ^a	H	4	4	-
							52	Chihuahueño	M	4	4	+
							53	Mestizo	H	6	3	+
							54	Akita	H	2	1	+

^a Eutanasia

La mortalidad no mostró diferencias significativas cuando se relacionó con las variables sexo, raza, edad y días enfermos antes de llegar a consulta ($p>0.05$).

Respecto al cuadro de vacunación, de los 24 perros vacunados, 8% presentaron severidad baja, 75% severidad media (murió 1) y 17% severidad alta (murieron 2). Su calendario de vacunación iba desde 1 a 4 vacunas, sin embargo no hubo diferencias significativas entre el número de vacunas y la severidad de la enfermedad ($p>0.05$). En cuanto al conteo total de leucocitos, 11 perros de este grupo presentaron leucopenia al momento de ingreso (46%), 2 de ellos alcanzaron conteos dentro del intervalo normal al día 2; 4 perros al día 4 y 2 perros al día 6. De los perros leucopénicos al día de ingreso, dos murieron al día 2 y uno al día 4, ninguno de ellos alcanzó conteos normales. Para los títulos de anticuerpos, se observó que 7 perros tuvieron títulos iguales o mayores a 1:512 (murió 1, título de 1:2048) y 17 perros tuvieron títulos menores a 1:512 de los cuales murieron dos, ambos al día 2 de hospitalización, uno con un título de 1:128 y otro con 1:1024.

En el grupo no vacunado, se observó que de los 32 perros, 6% presentaron severidad baja, 69% severidad media (murieron 3) y 25% severidad alta (murieron 4). De acuerdo al conteo total de leucocitos, 16 perros presentaron leucopenia al día de ingreso (2 murieron el mismo día de ingreso, 3 al día 2 y 1 al día 4, sin que ninguno alcanzara valores normales). De los perros que no presentaron leucopenia al día 0, sólo murió uno (perro número 31). En cuanto al título de anticuerpos se observó que 10 perros ingresaron con títulos iguales o mayores de 1:512 (murieron 5) y 22 con títulos menores a 1:512 (murieron 2).

De los 27 perros con leucopenia al día de ingreso, en tres casos fue por neutropenia, en 5 por linfopenia, en 16 por neutropenia y linfopenia y sólo 3 perros los conteos de neutrófilos se mantuvieron cercanos al valor bajo sin estar disminuidos, en estos casos la leucopenia fue con conteos totales de 5.9, 5.6 y 5.1 $\times 10^9/L$. Neutropenias severas se observaron en ambos grupos (anexo 2), pero no hubo diferencias estadísticas entre ellos ($p>0.05$).

Tampoco las hubo en relación al conteo de linfocitos entre ambos grupos. No existieron diferencias significativas en cuanto a la mortalidad, severidad o tiempo de hospitalización con relación a los valores por debajo del límite inferior para neutrófilos ni para linfocitos ($p>0.05$) tanto para los perros vacunados como para los no vacunados.

En cuanto a la supervivencia de ambos grupos, tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) (Figura 3).

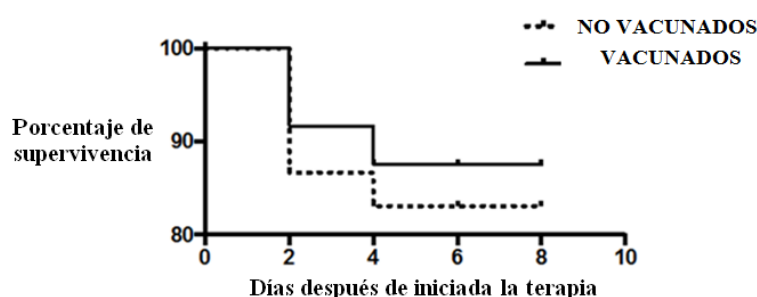


Figura 3. Curva de supervivencia para pacientes tratados, positivos a Parvovirus canino.

Al evaluar la evolución del cuadro clínico no se observaron diferencias estadísticas con respecto a la severidad por día (Tabla 3) ($p>0.05$) en ninguno de los grupos.

Tabla 3. Índice de severidad por grupo a lo largo del periodo de observación.

GRUPO	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
Vacunados	8 (5-13) n= 24 †= 0	5 (1-12) n= 24 †= 2	2 (1-12) n= 22 †=1	1 (1-5) n= 7 †=0	1 (1-1) n= 2 †=0
No Vacunados	9 (3-13) n= 32 †= 2	8 (1-13) n= 30 †= 4	2 (1-10) n= 24 †= 1	1 (1-5) n= 11 †= 0	1(1-3) n= 5 †= 0

Se muestra la mediana del índice de severidad para cada grupo y los valores máximos y mínimos entre paréntesis.
n = número de perros
†= perros que murieron

No fueron observadas diferencias estadísticas entre la severidad, conteo leucocitario (Tabla 4) y títulos de anticuerpos (Tabla 5) entre el grupo vacunado y el no vacunado al momento de ingreso ($p>0.05$).

Tabla 4. Conteo leucocitario por grupo a lo largo del periodo de observación.

GRUPO	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
Vacunados	9.4 (± 6.81) n= 24 †= 0	6.8 (± 5.74) n= 24 †= 2	12.8 (± 9.85) n= 22 †=1	15.1(± 12.7) n= 7 †= 0	22.2 (± 9.19) n= 2 †=0
No Vacunados	8.9 (± 8.22) n= 32 †= 2	8.2 (± 9.96) n= 30 †= 4	14.1 (± 8.79) n= 24 †= 1	20.3 (± 15.6) n= 11 †= 0	31.4 (± 20.51) n= 5 †= 0

Valores de leucocitos totales expresados en $\times 10^9/L$. Se muestra el promedio de los conteos leucocitarios por día. Entre paréntesis se muestra la desviación estándar.

Tabla 5. Titulación de IgG contra parvovirus canino, por grupo a lo largo del periodo de observación.

GRUPO	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
Vacunados	192 (64-2048) n= 24 †= 0	256 (128-2048) n= 24 †= 2	384 (128-2048) n= 22 †=1	512 (128-1024) n= 7 †= 0	384 (256-512) n= 2 †=0
No Vacunados	128 (16-1024) n= 32 †= 2	256 (16-4096) n= 30 †= 4	384 (32-2048) n= 24 †= 1	512 (128-4096) n= 11 †= 0	512 (256-2048) n= 5 †= 0

Se muestra las medianas de las titulaciones por día. Entre paréntesis se muestran los títulos mínimos y máximos.

Tampoco se observaron diferencias significativas en los días de hospitalización entre pacientes vacunados y no vacunados ($p>0.05$) (Figura 4).

Duración de hospitalización en perros con Parvovirus

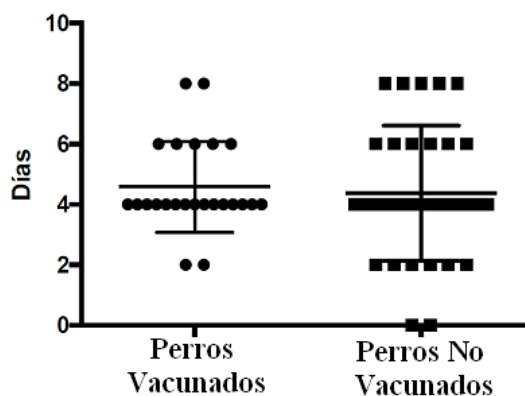


Figura 4. Días de hospitalización analizados con la prueba de t de Student, no muestran diferencias significativas entre grupos. Cada punto indica una observación

Al no obtener diferencias estadísticas entre grupos, se procedió a evaluar las variables severidad de la enfermedad, conteo total de leucocitos y títulos de anticuerpos IgG contra PVC de los 56 perros.

No se determinó relación significativa entre las variables severidad de la enfermedad, la leucopenia y los títulos de anticuerpos con el número de días hospitalizados, ni entre la leucopenia con el título de anticuerpos ($p>0.05$). De acuerdo a la severidad de la enfermedad se observó que los perros que ingresen con severidad alta, tienen 10 veces más probabilidades de morir que los que ingresen con severidad menor ($p<0.01$). En cuanto a la relación de la leucopenia con la severidad de la enfermedad se observó que pacientes que presenten leucopenia al ingreso, tienen más probabilidades de presentar enfermedad severa, con un valor de Fisher de <0.001 . La relación entre leucopenia y mortalidad fue más evidente, 27 de los 56 perros, presentaron leucopenia al momento de ingresar a consulta (48%), de los cuales murieron nueve; de los perros que no presentaron leucopenia al ingreso, sólo murió 1, por lo que el riesgo de muerte para los perros con leucopenia al día 0 es 14 veces más alto que los que presentan un conteo leucocitario dentro del intervalo de referencia ($p<0.01$).

En cuanto al título de anticuerpos contra Parvovirus canino, se obtuvo que 17 perros ingresaron con títulos de anticuerpos iguales o mayores a 1:512 y de éstos, siete presentaron enfermedad severa, de los cuales murieron 5; 39 perros ingresaron con títulos menores a 1:512, cinco de ellos presentaron enfermedad severa, de los cuales murió sólo uno, por lo tanto, se observó que los perros con títulos altos de anticuerpos ($\geq 1:512$) tienen 4.7 veces más probabilidades de presentar enfermedad severa ($p<0.05$). Así mismo, se observó que los perros que ingresan con un título de 1:512 o superior, tienen 10 veces más probabilidades de morir que los que presentan 1:256 o menores ($p<0.01$).

8.1 Resultados adicionales

Artículo enviado

New | Delete | Archive | Junk | Sweep | Move to | Categories | ...

↑ ↓ × ↶ Undo

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: Confirmación de envío

SM Simon Martinez
Thu 6/7, 4:10 PM

...

E EIMC <eeserver@eesmail.elsevier.com>
Wed 6/6, 3:48 PM
You: josimonmc@gmail.com

Inbox

You forwarded this message on 6/7/2018 4:10 PM

Estimado/a Dr. Martinez Castañeda

Le confirmamos que su artículo titulado: "GRADOS DE SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ENTERITIS PARVOVIRAL EN PERROS VACUNADOS Y NO VACUNADOS CONTRA PARVOVIRUS CANINO CLINICAL SEVERITY SCORE OF PARVOVIRAL ENTERITIS IN VACCINATED AND UNVACCINATED DOGS AGAINST CANINE PARVOVIRUS" ha llegado a la secretaría de **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**.

En breve recibirá un mensaje con el número de referencia asignado y que le confirmará que el artículo ha iniciado el proceso de revisión. En caso de que sea necesario que haga algún cambio previo, también se le notificará por correo electrónico.

Tal y como especifican en las normas de publicación de la revista, le recordamos que su manuscrito no puede ser publicado en ninguna otra revista mientras dure el proceso de revisión.

No dude en contactar con la redacción para cualquier información adicional.

Reciba un cordial saludo,

Secretaría Editorial
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

1 **GRADOS DE SEVERIDAD CLÍNICA DE LA ENTERITIS PARVOVIRAL EN**
2 **PERROS VACUNADOS Y NO VACUNADOS CONTRA PARVOVIRUS CANINO**
3
4 **CLINICAL SEVERITY SCORE OF PARVOVIRAL ENTERITIS IN VACCINATED**
5 **AND UNVACCINATED DOGS AGAINST CANINE PARVOVIRUS**

6
7 Gabriela Marrón^a, José Simón Martínez^a *, Israel Quijano-Hernández^b y Raúl Fajardo^b

8
9 ^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina

10 Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera de Cuota Toluca-
11 Atlacomulco kilómetro 15.5, C.P. 50200, Toluca, Estado de México.

12 ^b Hospital Veterinario de Pequeñas Especies, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,

13 Universidad Autónoma del Estado de México. Jesús Carranza N° 203, Col Universidad, Toluca Estado de
14 México.

15 *Corresponding Author: jsmartinezc@uaemex.mx

16 Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
17 Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera de Cuota Toluca-Atlacomulco kilómetro 15.5, C.P. 50200,
18 Toluca, Estado de México.

19
20 **Abstract**

21 *Introduction:* The aim of this study was to evaluate the vaccination status and its
22 relationship with the severity and mortality of canine parvoviral enteritis.

23 *Methods:* 124 dogs were analyzed, organized into two groups according to their clinical
24 history, one group contain dogs with previous vaccination history and the other dogs

25 without report of vaccination, the differences between the disease severity score, the total
26 leukocyte count and the mortality between both groups were determined.

27 *Results:* : No statistical differences were observed for any variable analyzed between both
28 groups, according to the data obtained, it is suggested that the vaccination in analyzed dogs
29 was performed with a bad procedure, therefore this group of dogs behaved like the group of
30 dog’s unvaccinated presenting infection by field virus and in some cases developing severe
31 disease.

32 *Conclusions:* Currently, the reports of vaccine failure against canine parvovirus show
33 contradictions, in this work we show a possible vaccine failure that is not due to the type of
34 biological used, on the contrary, it is more likely that it is due to a bad procedure of
35 application of the vaccines. This produces a lack of protection against infection in the
36 population of dogs that are considered vaccinated.

37 **Key words:** Canine parvovirus, clinical severity, vaccination status.

38

39 **Introducción**

40 La enteritis hemorrágica severa por *Parvovirus Canino* tipo 2 (PVC-2) es una de las
41 principales enfermedades que afectan a los perros en México. Actualmente, existen tres
42 variantes genéticas del PVC-2, denominadas a, b, y c. Aunque la enfermedad fue reportada
43 por Apple a principio de 1970¹ describiendo signos clínicos de la enfermedad específicos
44 como diarrea hemorrágica, vómito y leucopenia, con el paso del tiempo, se ha reportado
45 variabilidad en los signos clínicos de la enfermedad, sin que a la fecha se haya establecido
46 una causa específica de esto²; por lo tanto, en la actualidad estos signos clínicos específicos
47 de la enfermedad pueden o no estar presentes; debido a esta variación en los cuadros
48 clínicos de la infección, los médicos veterinarios tienen menor certeza al emitir un
49 diagnóstico clínico, por lo que necesitan recurrir a pruebas de laboratorio, sensibles y
50 específicas que les permita confirmar el diagnóstico³.

51 Por otro lado, la vacunación ha sido el método más rentable y eficiente para controlar las
52 infecciones por PVC-2 en perros⁴, sin embargo, en la actualidad, se han reportado diversos
53 casos de perros vacunados que no pudieron protegerse contra la infección por virus de
54 campo⁵, incluso, algunos estudios aportan datos de perros, que presentando títulos de
55 anticuerpos protectores, no pudieron evitar la infección contra PVC-2^{5,6}.

56 En este estudio, presentamos un grupo de perros que a pesar de estar vacunados
57 desarrollaron la infección contra PVC-2 y presentan cuadros clínicos severos.

58 **Material y métodos**

59 Se realizó un estudio observacional, a población abierta, transversal; en periodo
60 comprendido de Enero de 2016 a Diciembre de 2016. Los perros incluidos en este estudio
61 presentaron signos gastroentéricos y fueron positivos a PVC-2 mediante pruebas de PCR
62 según protocolo publicado por ., en el 2017³. Para evitar falsos positivos al diagnóstico por
63 PCR, se excluyeron los perros que recibieron alguna vacuna en un periodo menor a 15 días
64 previos al momento del análisis. 124 perros fueron analizados, organizados en dos grupos,
65 uno con antecedentes de vacunación y el otro sin antecedentes de vacunación, según su
66 historia clínica. Todos los perros fueron valorados en el hospital de referencia de la ciudad
67 de Toluca, Estado de México, (Hospital Veterinario para Pequeñas Especies de la
68 Universidad Autónoma del Estado de México). La severidad clínica de la enfermedad fue
69 determinada utilizando la tabla de puntaje de severidad reportada por Nakamura *et al.*, en el
70 2001⁷, a la cual se le realizaron ligeras modificaciones (Tabla 1). Brevemente, de 1 a 5
71 puntos es enfermedad leve, de 6 a 10 puntos moderada y de 11 a 15 puntos severa.

72 **Tratamiento médico**

73 Los pacientes fueron tratados usando un protocolo estándar de terapia endovenosa:
74 cristaloides, antibioterapia de amplio espectro así como bolos de dextrosa y medicación
75 antiemética y analgésica que fueron administrados cuando fue indicado. También se
76 manejó nutrición enteral.

77 **Análisis estadístico**

78 Para determinar el comportamiento de la enfermedad se utilizó como referencia el puntaje
79 de severidad obtenido con la Tabla 1. La correlación entre el conteo total de leucocitos,
80 estado de vacunación, sexo y edad, con la severidad de la enfermedad fue analizada
81 mediante test exacto de Fisher. Para cada comparación, las diferencias fueron consideradas
82 con un mínimo de 0.05 de nivel de significancia. Todos los análisis estadísticos fueron
83 realizados utilizando el programa Graphpadprism® versión 7.

84 **Resultados**

85 De los 124 perros, el 58% fueron machos, el 83% pertenecieron a una raza específica, el
86 95% fueron cachorros y el 58% habían sido vacunados (La información de los registros de
87 estos perros indica que el 73.6% únicamente recibieron una dosis de vacunación) el resto de
88 los perros recibió entre 2 y 4 dosis.

89 Con relación a la severidad de la enfermedad y la tasa de mortalidad, de los 72 perros
90 infectados pero que previamente habían sido vacunados, el 71% de estos presentó
91 enfermedad moderada (el 10% de este grupo murieron); el 24% presentaron enfermedad
92 severa (de estos 35% murieron); mientras que solo el 5% presentó enfermedad leve (todos
93 sobrevivieron). En el grupo de los 52 perros no vacunados, 71% presentaron enfermedad
94 moderada (murieron el 16%), 25% presentó enfermedad severa (murió el 46%) y sólo el
95 4% presentó enfermedad leve, sobreviviendo todos. No se encontraron diferencias
96 estadísticas entre la severidad de la enfermedad y la mortalidad entre el grupo vacunado y
97 el no vacunado ($p>0.05$) (Fig. 1); sin embargo, se pudo establecer que el factor importante
98 en relación a la mortalidad es el grado de severidad con el cual ingresan los perros a su
99 primera consulta después del inicio de la infección, ya que nuestro análisis estadístico,
100 demostró que en ambos grupos de perros, cuando ingresan con un puntaje de enfermedad
101 severo, tienen 10 veces más probabilidad de morir ($p<0.01$).

102 La relación de la presencia de leucopenia y el número de vacunas administradas fue la
103 siguiente, solo el (49 %) de los perros presentaron leucopenia el día de admisión, de estos,

104 sólo 37 perros habían sido vacunados de los cuales murieron 8; 24 perros no habían sido
105 vacunados, murieron 4. No se observó diferencia estadística entre perros vacunados y no
106 vacunados ($p>0.05$). Del 51% de los perros que no presentaron leucopenia, 35 habían sido
107 vacunados y 28 no, de cada grupo murieron 3 perros; tampoco se observaron diferencias
108 estadísticas significativas ($p>0.05$).

109 **Discusión**

110 En este trabajo, observamos que el 58% de los perros hospitalizados por infección con PVC
111 -2, habían sido previamente vacunados, en la mayoría de estos perros se realizó la
112 genotipificación de PVC-2 y los resultados indicaron que todos habían sido infectados por
113 PVC-2c. Aunque se ha reportado que probablemente las nuevas variantes de PVC-2
114 podrían evadir la respuesta inmune a la vacunación⁸, en otros estudios se ha publicado que
115 las vacunas utilizadas comercialmente protegen apropiadamente contra las diferentes
116 variantes de PVC-2, incluyendo el genotipo 2c^{9,10}. Recientemente, se ha establecido que en
117 México, solamente circula la variante de PVC-2c¹¹, sin embargo aún no existe una vacuna
118 comercial que tenga como antígeno PVC-2c, por lo tanto se utilizan vacunas en base a
119 antígenos de PVC-2b, no obstante a esto, no podríamos establecer que esta sea la causa por
120 la cual la mayoría de los perros vacunados no hayan desarrollado una respuesta inmune
121 protectora contra la infección.

122 En relación a la severidad y mortalidad, no se observó significancia estadística entre los
123 perros vacunados y no vacunados, sin embargo de acuerdo a los datos obtenidos en los
124 registros de los perros vacunados, en la mayoría de estos, solo se les había administrado
125 una dosis de vacuna contra PVC-2 y el procedimiento de vacunación se realizó sin previa
126 titulación de anticuerpos derivados maternos, por lo tanto, es posible que la falla vacunal se
127 deba a un mal procedimiento de vacunación, esta situación nos permite realizar la hipótesis
128 que ambos grupos se estarían comportando como perros no vacunados, por eso el
129 comportamiento de los cuadros clínicos producto de la infección fue similar.

130 El estado de vacunación tampoco se vio reflejado en la presencia de leucopenia en los
131 perros, sin embargo, se observó que perros que presentan leucopenia tienen más
132 probabilidades de morir que perros con un hemograma normal. En estudios previos, uno de
133 los biomarcadores más utilizados, probablemente por su facilidad y buen nivel pronóstico,
134 es la leucopenia. Estudios anteriores^{12,13} coincidieron que la leucopenia se asoció con un
135 mal pronóstico o con la necesidad de un tratamiento agresivo. Se describió que la
136 leucopenia se debía principalmente a neutropenia grave, concluyendo que los neutrófilos
137 eran las células más importantes para monitorear¹². Solo algunos de estos estudios
138 incluyeron conteos leucocitarios seriados^{14,15} reportando una asociación directa entre la
139 leucopenia y la mortalidad como fue observado en este estudio.

140 En conclusión, nosotros identificamos que el mal procedimiento de vacunación en perros
141 podría ser la causa que los predispone a contagiarse de PVC-2c, teniendo la posibilidad de
142 desarrollar signos clínicos y por lo tanto la variación antigénica del virus no estaría
143 asociada a la falla vacunal; debido a esta situación, en este estudio, no se pudo establecer si
144 la vacunación confiere ventaja en aquellos perros que desarrollan infección por PVC-2c,
145 porque simplemente el modelo de vacunación realizado por los veterinarios no es apropiado
146 para conferir inmunidad protectora a los perros.

147 **Conflicto de intereses**

148 Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

149 **Financiación**

150 La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del
151 sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

152 **LITERATURA CITADA**

153 1. Appel MJ, Cooper BJ, Charmichael LE. Canine viral enteritis. I. Status report on corona-
154 and parvo-like viral enteritides. J Am Vet Med Assoc. 1978;173:1516-18.

- 155 2. Nandi S, Kumar M. Canine Parvovirus: Current Perspective. In J Virol. 2010;21(1):31-
156 44.
- 157 3. Flores A, Martínez-Castañeda JS, Bautista-Gomez L, Fajardo R, Quijano-Hernández I.
158 Identification of co-infection by rotavirus and parvovirus in dogs with gastroenteritis in
159 México. 2017; 48: 769-773.
- 160 4. Nandi S, Kumar M, Mohapatra TK., Ravishankar C. Emergence of Canine Parvovirus-2
161 variants and its impact on vaccination. World App Sci J. 2013;23(10):1366–76.
- 162 5. Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C.
163 Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus
164 type 2c. New Microbiol. 2008;31:125–30
- 165 6. Decaro N, Cirone F, Desario C, Elia G, Lorusso E, Colaianni ML, Martella V,
166 Buonavoglia C. Severe parvovirus in a 12-yearold dog that had been repeatedly vaccinated.
167 Vet Rec. 2009;164:593–95.
- 168 7. Nakamura K, Sakamoto M, Ikeda Y, Sato E, Kuwakami K, Miyazawa T, et al.
169 Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. Clin Diagn Lab
170 Immunol. 2001;8:663-68
- 171 8. Mittal M, Chakravarti S, Mohapatra JK, Chug PK, Dubey R, Narwal PS, Kumar A,
172 Churamani CP, Kanwar NS. Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from
173 2008–2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination
174 failure. Infect Genet Evol. 2014;23:1–6.
- 175 9. Siedek EM, Schmidt H, Sture GH, Raue R. Vaccination with canine parvovirus type 2
176 (CPV-2) protects against challenge with virulent CPV-2b and CPV-2c. Berl Munch
177 Tierarztl Wochenschr. 2011;124:58–64.

- 178 10. Wilson S, Illambas J, Siedek E. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b
179 (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine*.
180 2014;32(42):5420–24
- 181 11. Pedroza C, Paez V, Charles C, Elizondo D, Cervantes R, López M. Genotyping of
182 canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagn Invest*. 2015;27:107-11.
- 183 12. Potgieter LN, Jones JB, Patton CS, Webb-Martin TA. Experimental parvovirus
184 infection in dogs. *Can J Comp Med*. 1981;45(3):212–16.
- 185 13. O'Sullivan G, Durham PJK, Smith JR, Campbell RSF. Experimentally induced severe
186 canine parvoviral enteritis. *Austral Vet J*. 1984;61(1):1-4.
- 187 14. Goddard A, Leisewitz A, Christopher M, Duncan N, Becker P. Prognostic Usefulness
188 of Blood Leukocyte Changes in Canine Parvoviral Enteritis. *J Vet Int Med*.
189 2008;22(2):309-16.
- 190 15. Kalli I, Leontides LS, Mylonakis ME, Adamama-Moraitou K, Rallis T, Koutinas AF.
191 Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine
192 parvovirus infection. *Res Vet Sci*. 2010;89(2):174–78.

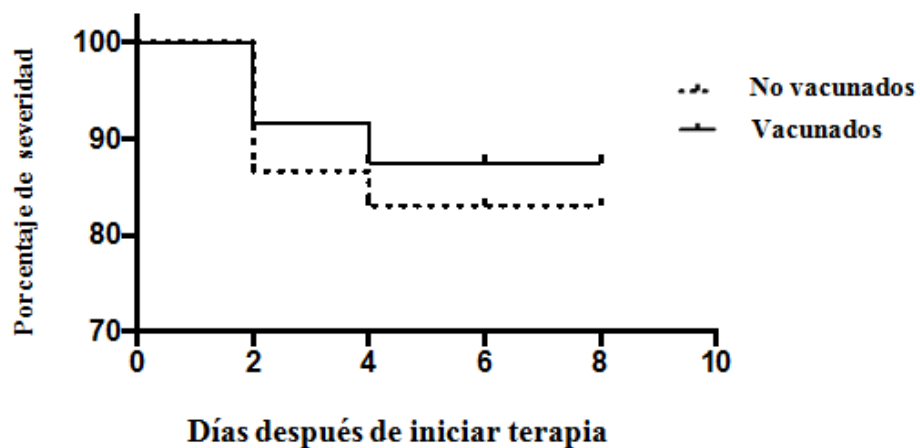


Figura 1. Curva de supervivencia de perros vacunados y no vacunados

Tabla 1 Sistema de calificación para signos clínicos en infección por PVC

Signos clínicos	Calificación	
Temperatura rectal (°C)		
<36	3	
37 - 36.1	2	
37.1 – 37.9	1	
38 – 38.9	0	
39 – 39.9	1	
40 – 40.4	2	
> 40.5	3	
Conteo leucocitario x 10⁹/L		
<3 meses	>3 meses	
8.5 - 16	4.2 – 19.9	1
4 - 8.5	2 – 4.1	2
0 - 4	0 - 2	3
Diarrea		
Mucoide	1	
Acuosa	2	
Sanguinolenta	3	
Anorexia	1	
Vómito	1	
Depresión	1	
Deshidratación		
Leve	1	
Moderada	2	
Severa	3	
Enfermedad Leve: 1 a 5 puntos		
Enfermedad Moderada: 6 a 10 puntos		
Enfermedad severa: 11 a 15 puntos		

9. DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta la relación de severidad, conteo leucocitario y títulos de anticuerpos en perros con parvovirus canino naturalmente adquirido. La confiabilidad de los resultados se maximizó al incluir sólo aquellos casos diagnosticados por PCR debido a que esta técnica ofrece una mejor sensibilidad comparada con la inmunocromatografía (kits rápidos) usada en la práctica clínica diaria, (66.6% de los kits contra 80% del PCR de punto final, ambos comparados contra nPCR) (Faz *et al.*, 2017), además de excluir pacientes con historia reciente de vacunación, evitando con esto falsos positivos, debido a que perros recientemente vacunados podrían estar excretando antígeno vacunal en las heces como consecuencia de la replicación del virus atenuado de la vacuna en el tejido linfóide o las células epiteliales del tracto gastrointestinal y el desprendimiento posterior de antígenos fecales (Lamm *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2007; Pollock *et al.*, 1993).

Con relación a la variable sexo, ésta no ha sido asociada a riesgo de morbilidad o mortalidad para el PVC. Tampoco encontramos correlación entre el grado de severidad de la enfermedad y la variable raza; sin embargo, ésta se ha reportado como un factor de riesgo para la susceptibilidad a PVC; perros de ciertas razas, están en un riesgo mayor de desarrollar enteritis por Parvovirus canino en comparación con perros mestizos, siendo los Rottweiler, Doberman Pinscher, Pastor Alemán, Pitbull, Labrador, Springer Spaniel y Yorkshire Terrier las razas con mayor predisposición a la enfermedad (Day, 1999; Glickman *et al.*, 1985; Goddard *et al.*, 2010; Godsall *et al.*, 2010; Smith-Carr *et al.*, 1997), no obstante en nuestro estudio no se observaron diferencias significativas entre perros de raza y mestizos, posiblemente debido al número de perros de esas razas susceptibles que se tuvieron, (2 Pastor Alemán, 6 Pitbull), las razas más frecuentes incluidas en este trabajo fueron Chihuahueño (7 perros), Poodle (7), Akita (4) y mestizos (13). Otros autores también han reportado índices de supervivencia sin diferencias estadísticas entre perros de raza y mestizos positivos a PVC (Kalli *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2012).

Varias investigaciones utilizando biomarcadores en la enteritis parvoviral canina, han sido realizados en diversas partes del mundo (Goddard *et al.*, 2008; Schoeman *et al.*, 2007, 2008, 2013; Kalli *et al.*, 2010; Ling *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2013). Un *biomarcador* se puede definir como un indicador de un estado biológico que se mide objetivamente y se evalúa como un marcador de procesos fisiológicos o patológicos. En el contexto de la infección por PVC, estos biomarcadores podrían ayudar a aumentar el índice de sospecha de la enfermedad, o determinar la duración de la hospitalización, la gravedad de la enfermedad y el pronóstico final de los pacientes. Los biomarcadores también pueden ayudar en la toma de decisiones cuando se discuten las opciones de tratamiento o la eutanasia con los clientes. Sin embargo sólo unos cuantos estudios usan un método para dar puntaje a signos clínicos del paciente (Nakamura *et al.*, 2001; Decaro *et al.*, 2005a), con esta suma de puntajes, se puede calificar con más objetividad el progreso de la enfermedad en el paciente. En este trabajo encontramos que la severidad de la enfermedad al ingreso hospitalario es un factor altamente predictivo del curso de la infección, al elevarse hasta 10 veces las probabilidades de morir si se presenta una enfermedad severa. Hay varios factores que influyen en la presentación de la enfermedad, podría teorizarse que la ingestión de un mayor número de partículas virales, aumenta la gravedad de la enfermedad, resultando en una mayor severidad, sin embargo, esto es difícil de probar en un estudio de campo, debido a la dificultad de medir el tamaño del inóculo viral ingerido (Ling *et al.*, 2012). Otro factor importante es la variante viral, sin embargo, en México recientemente se ha reportado únicamente la presencia de PVC-2c (Pedroza *et al.*, 2015, Faz *et al.*, 2017) por lo que no tenemos la sospecha de la influencia de otras variantes del virus sobre la presentación clínica de la enfermedad. No obstante, una investigación publicada en Japón por Mochizuki *et al.*, en 2008, demostró la aparición de mutaciones y recombinación de cepas vacunales y de campo de PVC, por desplazamiento antigénico. Es plausible que esto también pueda estar ocurriendo en México, dando como resultado diferencias en patogenicidad entre la misma variante del virus.

Uno de los biomarcadores más utilizados, posiblemente por su facilidad y buen nivel pronóstico, es el conteo total de leucocitos y su diferencial. En estudios previos, Woods *et al.*, en 1980; Potgieter *et al.*, en 1981 y O'Sullivan *et al.*, en 1984, coincidieron en que la leucopenia se asoció con un mal pronóstico o con la necesidad de un tratamiento agresivo. Potgieter descubrió que la leucopenia se debía principalmente a una neutropenia grave y que los recuentos de linfocitos disminuían a solo el 50% de los valores normales; él concluyó que los neutrófilos eran las células más importantes para monitorear. Sin embargo Mason *et al.*, en 1987, informaron que la leucopenia no debe utilizarse como el único criterio de pronóstico, así mismo McCaw *et al.*, en 1996, encontraron que la neutropenia (incluso cuando era muy grave) no era un indicador pronóstico significativo. Solo algunos trabajos incluyeron conteos leucocitarios seriados (Goddard *et al.*, 2008; Kalli *et al.*, 2010; Castro *et al.*, 2013) y reportaron una asociación directa entre la leucopenia y la mortalidad. En nuestro estudio concordamos que la leucopenia es un buen biomarcador pronóstico ya que perros que ingresen a consulta (día 0) con conteos leucocitarios por debajo del intervalo normal, tienen un riesgo 14 veces mayor de morir que los que ingresen con conteos leucocitarios dentro del intervalo normal, a pesar del recibir el mismo tratamiento.

Los neutrófilos son el tipo de leucocitos más numerosos en la sangre y generalmente un cambio en el recuento de neutrófilos dará como resultado un cambio en el recuento de leucocitos (Otto *et al.*, 1997). En la enteritis por PVC, la neutropenia grave se da por: 1) destrucción de mieloblastos mitóticamente activos en la médula ósea como un efecto directo de la virus, 2) por la endotoxemia y la posible sepsis que conduce a la marginación de los neutrófilos y 3) una pérdida masiva de neutrófilos a través de la pared intestinal (Woods *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 2001). Aunque en nuestro estudio la neutropenia en ambos grupos fue grave, no hubo una diferencia en neutrófilos segmentados y bandas entre los cachorros vacunados y los no vacunados.

Los linfocitos son el segundo leucocito más común en sangre (Latimer *et al.*, 1989). En este estudio, la linfopenia en los cachorros probablemente fue atribuible a un efecto directo del

virus que conduce a la atrofia o destrucción del tejido linfoide y a la liberación endógena de altas concentraciones de cortisol (Schultze, 2000). Al igual que en el caso de los neutrófilos, no se observaron diferencias entre los conteos de linfocitos del grupo vacunado y del no vacunado.

Los monocitos no fueron considerados como biomarcadores ya que se prestó mayor atención al conteo total de leucocitos, debido a que la neutropenia y linfopenia no aportaron cambios significativos en la mortalidad o severidad de la enfermedad, sin embargo, su recuperación, prevé la de los neutrófilos en la sangre (Bienzle, 2000).

En cuanto a los eosinófilos, Goddard *et al.*, 2008 reporta que éstos disminuyen en la infección aguda por PVC sin embargo, en los intervalos usados en el HVPE de la UAEM, un conteo de 0 para los eosinófilos es considerado normal, así que no se tomó en cuenta la eosinopenia como un hallazgo importante.

En cuanto al título de anticuerpos contra PVC, diversas investigaciones señalan que un título protector, evita la presentación de cuadros clínicos graves e incluso pueden ayudar a que la enfermedad curse de manera asintomática y los títulos bajos se relacionan con una enfermedad de moderada a severa (Decaro *et al.*, 2005a) sin embargo, en un estudio de campo no se tiene acceso a los títulos de anticuerpos de los pacientes, previos a la infección, sólo se puede medir la respuesta humoral después de ella. Un trabajo de investigación realizado en 1985 por Meunier *et al.*, indica que los perros inoculados con PVC mostraron títulos de anticuerpos cuatro días después de la inyección intravenosa y seis días después de la inoculación oral. Según este autor, los perros con signos clínicos tenían un título bajo de anticuerpos (1:20). Los títulos de los perros asintomáticos fueron de 1:40 o más, y no se aisló virus de sus sueros. Los perros sintomáticos tenían un título de anticuerpos medio significativamente menor que los perros asintomáticos tres y cuatro días después de la inyección intravenosa y cinco y seis días después de la inoculación oral. A partir de entonces, los títulos de anticuerpos aumentaron rápidamente en todos los perros y

fueron 1:10240 de siete a diez días después de la inoculación de parvovirus canino (Meunier *et al.*, 1985). En el presente estudio, la media de días que los perros pasaron enfermos antes de llegar a consulta fue de dos días (intervalo de 1 a 8) y de acuerdo con la patogenia del virus, la infección ocurrió de 4 a 7 días antes de presentar signos clínicos y pese a ello, sus títulos de anticuerpos no llegaron a más de 1:4096 ni siquiera en los animales que llegaron al día 8 de hospitalización. Otro aspecto contrastante es que el autor reporta que perros con el mayor título de anticuerpos no presentan signos de enfermedad, mientras que nosotros observamos que una mayor titulación de anticuerpos estaba relacionada a una mayor severidad de la enfermedad y a una mayor mortalidad. Estas diferencias en la presentación clínica se pueden deber a factores como la variante del virus implicada entre estudios y el tipo de respuesta montada. Trabajos de investigación anteriores reportan el incremento en patogenicidad de las nuevas variantes (Decaro *et al.*, 2005a; Decaro *et al.*, 2005c, Elia *et al.*, 2005; Taguchi *et al.*, 2011) y la capacidad para producir infecciones eficientes con una menor cantidad de virus (Decaro, *et al.*, 2012) la mayoría de estos estudios usan variantes antiguas del virus y esto produce cambios en el cuadro clínico, en la respuesta al tratamiento y muy posiblemente en la respuesta inmune montada. La inmunidad humoral es importante en el momento previo a la infección, ya que los anticuerpos neutralizan el virus antes de que este llegue a sus células blanco, evitando así una infección eficiente, sin embargo, si la inmunidad humoral no fue adecuada y se establece la infección, es necesaria una respuesta inmune celular, ya que esta respuesta juega un papel crítico controlando la infección aguda de PVC, por lo que el aumento en la inmunidad humoral puede no superar los defectos en la inmunidad celular creados durante las fases tempranas de la enfermedad (Bragg *et al.*, 2012). Sin embargo, la capacidad adecuada de la inmunidad humoral se alcanza hasta el año de edad en los perros, en el caso de los niveles séricos de adultos para la IgM se alcanzan a los dos o tres meses de edad, para la IgG sérica, los niveles adultos no se alcanzan sino hasta los seis o nueve meses de edad y los niveles adultos de IgA sérica a menudo no están presentes sino hasta el año de edad (Felsburg, 2002). La inmunidad mediada por células también se ve comprometida en animales más jóvenes, ya que los números de adultos y las proporciones de linfocitos T y B

se alcanzan hasta los 12 meses de edad (Day, 2007). Se cree que esta inmadurez de la inmunidad humoral y de la inmunidad mediada por células compromete la capacidad de los animales más jóvenes para responder al desafío inmunogénico, lo que resulta en una mayor gravedad de la infección y una mayor tasa de letalidad por enfermedades infecciosas en animales menores de 12 meses (Felsburg, 2002; Day, 2007). Todos los perros en nuestro trabajo de investigación que contaban con un historial de vacunación, tenían menos de 12 meses de edad. Este hallazgo apunta en gran parte hacia el fracaso del ciclo de vacunación primario de los cachorros para proporcionar inmunidad protectora. Day *et al.*, en 2010, recomienda finalizar el calendario de vacunación después de los 4 meses de edad, evitándose así el fenómeno de interferencia con la vacunación ya que a esta edad los ADM disminuyeron a un nivel que permita una inmunización más efectiva para el desarrollo de la inmunidad adquirida y por lo tanto la protección contra la infección de campo. Sin embargo, es plausible que un pequeño porcentaje de cachorros a esta edad todavía tenga anticuerpos derivados de la madre capaces de inactivar el antígeno de la vacuna. Esto significa que existe una gran oportunidad para la infección en estos perros en particular, ya que los anticuerpos maternos continúan disminuyendo por debajo de los niveles de protección y su próxima vacunación es hasta dentro de 12 meses. En nuestro estudio el 43% de los pacientes analizados presentaron historia de previa vacunación contra PVC, sin embargo la mayoría de ellos solo presentaron una dosis de vacunación, por lo que nosotros consideramos que en ellos se pudo haber generado interferencia de la vacuna. Los títulos de anticuerpos identificados en los perros en el día cero del experimento indican que el 70% de ellos tenía anticuerpos $< 1:512$ (anticuerpos no protectores contra la enfermedad).

Aunado a esto, un cambio no adecuado de isotipo de IgG después de la infección puede contribuir al aumento de mortalidad. Los isotipos de IgG han sido ampliamente estudiados en humanos durante una década (Davies *et al.*, 1983; Jefferis *et al.*, 1995; Kenneth Murphy *et al.*, 2008), sin embargo, en perros no se ha profundizado en la información disponible (Bergeron *et al.*, 2014). Hace más de 10 años se describió la identificación de ADN complementario (cDNA) codificado para cuatro subclases de IgG canina identificada de

bazo o linfomas, sin embargo, poco se sabe de la función de estas IgG's (Tang *et al.*, 2001). La expresión de las subclases de IgG está influenciada por múltiples factores, incluido el entorno de citocina predominante (Finkelman *et al.*, 1990). Se sabe que interferón- γ , como una citocina Th1 (inmunidad celular) e IL-4, como una citocina Th2 (inmunidad humoral) inducen un isotipo que cambia a IgG2a e IgG1, respectivamente (Rostamian *et al.*, 2017). Las citocinas Th1 regulan negativamente las Th2 y viceversa, es por ello que una vez establecida la infección, si el organismo monta una respuesta Th2 (producción de anticuerpos), la respuesta celular estaría disminuida, por lo que se al no haber una adecuada eliminación de las células infectadas donde se está replicando el virus, se puede presentar una enfermedad más severa, esto explicaría la tendencia hacia una mayor probabilidad de mortalidad de los perros que tuvieron un título más alto de anticuerpos, durante la hospitalización.

La reacción inmunitaria humoral es la principal protección contra las bacterias extracelulares (Kindt *et al.*, 2007) más no para bacterias intracelulares (como *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli enteroinvasiva*), por lo que la presencia de co-infecciones en los casos de PVC también se debe considerar como una influencia en el resultado del caso, independientemente del estado de vacunación. Se informa que el desarrollo de una infección bacteriana secundaria aumenta la tasa de letalidad de la enfermedad relacionada con el PVC, a menudo relacionada con el crecimiento excesivo de bacterias comensales en el tracto gastrointestinal y la invasión de *Salmonella* presente en el 0.9% de los casos de perros diarreicos, *Escherichia coli* β -hemolítica (7.4% de los casos), *Campylobacter* (41.1%) y *Clostridium difficile* (15.4%) que producen septicemia o endotoxemia (Lamm *et al.*, 2008; Prittie, 2004; Duijvestijn *et al.*, 2016). En tal caso, la endotoxemia participa en la presentación de choque bacterémico. El perro responde al choque séptico con grados variables de hipotensión y cambios coagulativos como coagulación intravascular diseminada (CID). Se considera que la endotoxemia es uno de los factores que predisponen a una enfermedad severa después de la infección por PVC (Isogai *et al.*, 1989), se han encontrado altos niveles de endotoxinas en la sangre de perros infectados tanto natural

como experimentalmente. Los perros con choque endotoxémico por *E. coli* exhiben una enteritis necrotizante hemorrágica en gran escala, las velocidades intestinales se acortan notablemente en respuesta a la endotoxina. También se ha reportado la recuperación de *Escherichia coli* de los pulmones o el hígado del 90% de los perros que murieron a causa del parvovirus. Esto implica que el daño viral en el intestino aumenta el riesgo de translocación bacteriana, septicemia coliforme e infección tisular local, así como una respuesta inflamatoria sistémica y la muerte (Otto *et al.*, 1997). En este estudio no se realizaron cultivos de heces, pero debido a lo explicado anteriormente, es recomendable realizarlos en la práctica clínica para ofrecer un tratamiento antibacteriano adecuado.

En cuanto al estatus de vacunación, se ha demostrado que existen fallas en la inmunización, las cuales incluyen: vacunas de baja calidad o almacenamiento inadecuado previo a la vacunación (falla en la cadena fría) (Decaro *et al.*, 2008), interferencia con anticuerpos maternos (causa más común) (Decaro *et al.*, 2004, 2005a; Elia *et al.*, 2005) ya que la presencia de altas concentraciones de inmunoglobulina materna inhibe el desarrollo de la respuesta inmune neonatal endógena (Casal *et al.*, 1996); e incluso interferencia con anticuerpos vacunales (Riedl *et al.*, 2015). Se creía que la cepa vacunal (PVC-2) no brindaba protección contra las nuevas variantes pero se demostró lo contrario, ya que se ha reportado que las vacunas con el tipo 2, protegen contra el desafío incluso con la variante 2c (Spibey *et al.*, 2008).

En nuestro estudio todos los cachorros del grupo vacunado tenían inconcluso su calendario de vacunación, la mayoría de los perros (n=14) había recibido sólo una dosis de vacuna, en el caso de los que recibieron 2 dosis (n=5), si suficientes ADM están presentes al momento de la primera dosis, la segunda dosis no inmunizará (Welbon *et al.*, 2011). Esto pudiera ser aplicado a los perros que recibieron 3 dosis (n=3) y 4 dosis (n=2) ya que pudieron haberse encontrado en un estado inmunocomprometido debido a los ADM, en el que el organismo no puede montar una respuesta inmune adecuada y dosis posteriores no pueden superar este estado, lo que provoca que contrario a lo esperado, los títulos bajen aún más, esta baja

inmunidad puede aumentar la susceptibilidad a la infección y reducir la capacidad de un perro para desarrollar una respuesta inmune efectiva contra el virus. Consecuentemente, habría una mayor gravedad de la infección y mayores tasas de mortalidad (Lamm *et al.*, 2008). Este problema es más relevante para los cachorros que reciben su ciclo primario de vacunación, ya que generalmente la vacunación y la susceptibilidad a la infección por PVC ocurren al mismo tiempo (Ling *et al.*, 2012), por lo que existe una brecha inmune amplia, con protección reducida de los anticuerpos derivados de la madre y una efectividad reducida de la vacunación. Una vacuna es más exitosa cuando los títulos de anticuerpos se han reducido a menos de 1:10 (Nandi *et al.*, 2013), por lo que ese sería el momento adecuado para vacunar.

Otro punto a considerar es que los animales neonatos tienen un sistema inmune que responde preferentemente con Th2 no importando el agente patógeno. Este sesgo contra las citocinas polarizadoras de células Th1 deja al recién nacido susceptible a la infección microbiana y contribuye a la alteración de las respuestas inmunitarias neonatales a la mayoría de las vacunas (Siegrist, 2000).

Aparte de lo ya explicado, hay que considerar factores propios del individuo, aproximadamente 1 de cada 1000 perros en general, son no-responsivos a vacunas contra PVC-2 y aunque esta falta de respuesta está controlada genéticamente, se observa en todas las razas (Welbon *et al.*, 2011). Esto puede explicar algunas de las muertes informadas en perros vacunados en este estudio.

Por último, las diferencias en la inmunidad de manada también podrían considerarse un factor importante que contribuye a la mayor tasa de letalidad por enfermedades relacionadas con el PVC. Los perros que viven en regiones geográficas con baja inmunidad de grupo experimentan una mayor incidencia de infección, muy probablemente debido a mayores oportunidades de transmisión secundaria a un mayor volumen de viriones de parvovirus circulantes dentro de su población determinada, en combinación con la

presencia de un número adecuado de hospedadores susceptibles (Ling *et al.*, 2012) Para el PVC, la presencia de huéspedes susceptibles depende en gran medida de la proporción de animales que están adecuadamente vacunados, ya que la vacunación ha demostrado eficacia en la protección de perros contra la infección con cepas de campo (Truyen, 2006). Podría teorizarse que las regiones geográficas con baja inmunidad de grupo experimentan una mayor gravedad de la enfermedad y tasas más altas de letalidad, sin embargo, esto no ha sido documentado a profundidad (Woolhouse *et al.*, 1997).

10. CONCLUSIONES

- La enfermedad tiene una presentación de severidad mayoritariamente media (de 6 a 10 puntos), con 75% de los perros vacunados y 69% de los no vacunados que presentaron este grado de severidad. A mayor grado de severidad, mayores probabilidades tuvieron de morir, sin importar su estatus de vacunación.
- La leucopenia es un buen marcador pronóstico. 48% de los perros tuvo conteos totales de leucocitos por debajo de los valores normales, de éstos murió el 33%.
- Los perros con un mayor título de IgG contra PVC después de la infección tienen más probabilidades de obtener mayores puntajes de severidad y de morir, independientemente de su estatus vacunal.
- No hubo diferencias para ninguna variable (puntaje de severidad, conteo leucocitario y títulos de IgG para Parvovirus canino) entre el grupo vacunado y el no vacunado.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anderlini, P., Champlin, R.E. 2008. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood*. 111, 1767-72.
- Appel, M., Cooper, B., Greisen, H., Carmichael L. 1978. Status report: canine viral enteritis. *J Am Vet Med Assoc*. 173, 1516-18.
- Appel, M., Parrish C. 1987. Canine parvovirus type 2, In: *Virus infections of carnivores*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. pp. 69-92
- Ardawi, M.S. 1998. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. *Metabolism*. 37, 99-103.
- Barthold, S.W., Bowen, R.A., Hedrick, R.P., Knowles, P., Lairmore, M.D., Parrish, C.R., Saif, L.J., Swayne, D.E. 2011. Parvoviridae. In: *Fenner's Veterinary Virology*. (4ta Ed). Elsevier Inc. Londres. p. 227.
- Bergeron, L., McCandless, E., Dunham, S., Dunkle, B., Zhu, Y., Shelly, J., Lightle, S., Gonzales, A., Bainbridge, G. 2014. Comparative functional characterization of canine IgG subclasses. *Vet Immunol Immunopathol*. 157(1-2), 31-41.
- Bienzle, D. 2000. Monocytes and macrophages. In: *Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., (Eds). Schalm's Veterinary Hematology*. (5ta ed.). Philadelphia, PA. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 318-25.
- Boosinger, T.R., Rebar, A.H., DeNicola, D.B., Boon, G.D. 1982. Bone marrow alterations associated with canine parvoviral enteritis. *Vet Pathol*. 19(5), 558-61.

- Boscan, P., Monnet, E., Mama, K., Twedt, D.C., Congdon, J., Steffey, E.P. 2011. Effect of maropitant, a neurokinin 1 receptor antagonist, on anesthetic requirements during noxious visceral stimulation of the ovary in dogs. *Am J Vet Res.* 72(12), 1576-79.
- Bragg, R.F., Duffy, A.L., DeCecco, F.A. 2012. Clinical evaluation of a single dose of immune plasma for treatment of canine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc.* 240(6), 700-04.
- Brown, M.R., Rogers, K.S. 2001. Neutropenia in dogs and cats: A retrospective study of 261 cases. *J Am Anim Hosp Assoc.* 37, 131-39.
- Brownstein, D.G., Smith, A.L., Johnson, E.A., Pintel, D.J., Naeger, L.K., Tattersall, P. 1992. The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol.* 66, 3118-24.
- Calderon, M.G., Mattino, N., Bucafusco, D., Fogel, F., Rumorini, P., La Torre, J. 2009. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: detection of the pathogenic variant CPV-2c in vaccinated dogs. *J Virol Met.* 159, 141-45.
- Casal, M. L., Jezyk, P. F., Giger, U. 1996. Transfer of Colostral antibodies from queens to their kittens. *Am J Vet Res.* 57, 1653-58.
- Castro, T.X., Cubel-Garcia, R.C., Gonçalves, L.P., Costa, E.M., Marcello, G.C., Labarthe, N.V., Mendes-de-Almeida, F. 2013. Clinical, hematological, and biochemical findings in puppies with coronavirus and parvovirus enteritis. *Can Vet J.* 54, 885-88.

- Cater, J.E., Pintel, D.J. 1992. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol.* 73, 1839-43.
- Cavalli, A., Bozzo, G., Decaro, N., Tinelli, A., Aliberti, A., Buonavoglia, D., 2001. Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *New Microbiol.* 24, 239-42.
- Chappuis, G. 1998. Neonatal immunity and immunization in early age: lessons from veterinary medicine. *Vaccine*, 16, 1468-72.
- Chiang, S., Wu, H., Chiou, M., Chang, M., Lin, C. 2016. Identification of a novel Canine Parvovirus type 2c in Taiwan. *Virol J.* 13(1), 160
- Christensen, J., Cotmore, S., Tattersall, P. 1997a. A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J Virol.* 71, 1405-16.
- Christensen, J., Cotmore, S., Tattersall, P. 1997b. Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J Virol.* 71, 5733-41.
- Cotmore, S.F., D'Abramo, A.M., Carbonell, L.F., Bratton, J., Tattersall, P. 1997. The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology.* 231, 267-80.
- Cotmore, S.F., Tattersall, P. 1998. High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J Virol.* 72, 8477-84.

- Davies, D.R., Metzger, H., 1983. Structural basis of antibody function. *Annu Rev Immunol.* 1, 87-117.
- Davis, H., Jensen, T., Johnson, A., et al. 2013 AAHA/AAFP fluid therapy guidelines for dogs and cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 49(3), 149-59.
- Day, M. J. 2007. Immune system development in the dog and cat. *J Comp Pathol.* 137 (Suppl 1), S10-S15.
- De La Puente, V.A., Siedek, E.M., Benchaoui, H.A., Tilt, N., Rowan, T.G., Clemence, R.G. 2007. The anti-emetic efficacy of maropitant (Cerenia™) in the treatment of ongoing emesis caused by a wide range of underlying clinical aetiologies in canine patients in Europe. *J Small Anim Pract.* 48(2), 93-98.
- De Mari, K., Maynard, L., Eun, H.M., Lebreux, B. 2003. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec.* 152(4), 105-108.
- Decaro, N., Altamura, M., Pratelli, A. 2002. Evaluation of the innate immune response in pups during canine parvovirus type 1 infection. *New Microbiol.* 25, 291-98.
- Decaro, N., Desario C., Campolo, M., Cavalli, A., Martella, V., Ricci, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C. 2004. Evaluation of the lactogenic immunity to canine parvovirus in pups. *New Microbiol.* 27, 375-79.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Buonavoglia, C. 2005a. Maternally-derived antibodies in pups and protection from Canine Parvovirus infection. *Biol J Int Assoc Biol Stand.* 33, 261-67.

- Decaro, N., Desario, C., Campolo, M., Elia, G., Martella, V., Ricci, D., Lorusso, E., Buonavoglia, C., 2005b. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest.* 17, 133-38.
- Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., Desario, C., Lucente, M.S., Bellacicco, A.L., Buonavoglia, C., 2005c. New approaches for the molecular characterization of canine parvovirus type 2 strains. *J Vet Med B: Infect Dis Vet Public Health.* 52, 316-19.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Desario, C., Campolo, M., Di Trani, L., Tarsitano, E., Tempesta, M., Buonavoglia, C., 2005d. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol.* 105, 19-28.
- Decaro, N., Elia, G., Martella, V., Campolo, M., Desario, C., Camero, M. 2006. First detection of Canine Parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain. *J Vet Med.* 53: 468-72.
- Decaro, N., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Mari, V., Lavazza, A., Nardi, M., Buonavoglia, C. 2008. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiol.* 31, 125-30.
- Decaro, N., Cirone, F., Desario, C., Elia, G., Lorusso, E., Colaianni, M.L., Martella, V., Buonavoglia, C., 2009. Severe parvovirus in a 12-year old dog that had been repeatedly vaccinated. *Vet Rec.* 164, 593-95.
- Decaro, N., Desario, C., Beall, M.J., Cavalli, A., Campolo, M., Dimarco, A.A., Amorisco, F., Colaianni, M.L., Buonavoglia, C., 2010. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. *Vet J.* 184, 373-75.

- Decaro, N., Buonavoglia, C. 2012. Canine Parvovirus. A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Vet Microbiol.* 155, 1-12.
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, C., 2005. Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods.* 121, 179-85.
- Duffy, A., Dow, S., Ogilvie, G., Rao, S., Hackett, T. 2010. Hematologic improvement in dogs with parvovirus infection treated with recombinant canine granulocyte-colony stimulating factor. *J Vet Pharmacol Ther.* 33, 352-56.
- Duijvestijn, M., Mughini-Gras, L., Schuurman, N., Schijf, W., Wagenaar, J., Egberink, H. 2016. Enteropathogen infections in canine puppies: (Co-)occurrence, clinical relevance and risk factors. *Vet Microbiol.* 195, 115-22.
- Elia, G., Cavalli, A., Cirone, F., Lorusso, E., Camero, M., Buonavoglia, D., Tempesta, M. 2005. Antibody levels and protection to canine parvovirus type 2. *J Vet Med B Infect Dis Vet Publ Health.* 52, 320-22.
- Elia, G., Cavalli, A., Desario, C., Lorusso, E., Lucente, M.S., Decaro, N., Martella, V., Buonavoglia, C., 2007. Detection of infectious canine parvovirus type 2 by mRNA real-time RT-PCR. *J Virol Methods.* 146, 202–08.
- Faldyna, M., Leva, L., Knotigova, P., Toman, M. 2001. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs. A flow cytometric study. *Vet Immunol Immunopathol.* 82, 2-37.
- Felsburg, P. J. 2002. Overview of immune system development in the dog: comparison with humans. *Hum Exp Toxicol.* 21, 487-92.

- Finkelman, F.D., Holmes, J., Katona, I.M., Urban Jr, J.F., Beckmann, M.P., Park, L.S. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.* 8, 303-33.
- Greene, C.E. 2006. Canine herpesvirus infection. In: Greene, C.E. (Ed.). *Infectious diseases of the dog and cat.* St Louis: Saunders. pp. 52-53
- Greene, C., Decaro, N. 2012. Canine viral enteritis. In: Greene, C.E., (Ed.). *Infectious Diseases of the Dogs and Cats.* (4ta ed.). Saunders, Elsevier; St. Louis, Missouri, U.S.A. pp. 67-75.
- Goddard, A., Leisewitz, A., Christopher, M., Duncan, N., Becker, P. 2008. Prognostic Usefulness of Blood Leukocyte Changes in Canine Parvoviral Enteritis. *J Vet Int Med.* 22(2), 309-16.
- Heddle, R.J., Rowley, D. 1975. Dog immunoglobulins. I. Immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrum, milk and small bowel fluid. *Immunology.* 29, 185-95.
- Holmes, M.A., Lunn, D.P. 1994. Variation of MHC II expression on canine lymphocytes with age. *Tissue Antigens.* 43, 179-83.
- Hong, C., Decaro, N., Desario, C., Tanner, P., Pardo, M.C., Sanchez, S., Buonavoglia, C., Saliki, J.T. 2007. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *J Vet Diag Invest.* 19, 535-39.
- Jefferis, R., Lund, J., Goodall, M. 1995. Recognition sites on human IgG for Fc gamma receptors: the role of glycosylation. *Immunol Lett.* 44 (2-3), 111-117.

- Kalli, I., Leontides, L.S., Mylonakis, M.E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T., Koutinas, A.F. 2010. Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci.* 89(2), 174-78.
- Kapil, S., Cooper, E., Lamm, C., Murray, B., Rezabek, G., Johnston 3rd, L., Campbell, G., Johnson, B., 2007. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *J Clin Microbiol.* 45, 4044-47.
- Kelly, W. D. 1963. The thymus and lymphoid morphogenesis in the dog. *Fed Prod.* 20, 600.
- Kennedy, L.J., Barnes, A., Happ, G.M., Quinnell, R.J., Bennett, D., Angles, J.M., Day, M.J., Carmichael, N., Innes, J.F., Isherwood, D., Carter, S.D., Thomson, W., Ollier, W. E.R. 2002. Extensive interbreed, but minimal intrabreed, variation of DLA class II alleles and haplotypes in dogs. *Tissue Antigens*, 59, 194-204.
- Kenneth Murphy, P.T., Walport, M. 2008. *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis Group, LLC/Garland Science, New York, NY/Abingdon, UK.
- Kindt, T., Goldsby, R., Osborne, B. 2007. *Kuby immunology*. (6th ed). New York. W.H. Freeman and Company. p.455.
- Kolb, E. 2003. The significance and composition of the colostrums and milk of the bitch: a review. *Tierarztl Umsch.* 58(3), 125-33.
- Kraft, W., Kuffer, M. 1995. Treatment of severe neutropenias in dogs and cats with filgrastim. *Tierarztl Prax.* 23, 609-13.

- Krakowka, S. 1988. Immunology of the dog ontogeny of the immune system. In: Pastoret, P.P., et al. (Eds). Handbook of Vertebrate Immunology. Academic Press. San Diego, CA. p. 271.
- Lamm, C.G., Rezabek, G.B. 2008. Parvovirus infection in domestic companion animals. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 38, 837-50.
- Latimer, K.S., Rakich, P.M. 1989. Clinical interpretation of leukocyte responses. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 19, 637-68.
- Li, X., Rhode, S. L. III 1991. Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro. Virol. 184, 117-30.
- Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J., Kempf, C., Ros, C. 2006. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. J Virol. 80(2), 1015-24.
- Martella, V., Cavalli, A., Pratelli, A., Bozzo, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Narcisi, D., Tempesta, M., Buonavoglia, C. 2004. A canine parvovirus mutant is spreading in Italy. J Clin Microbiol. 42, 1333-36.
- Martin, V., Najbar, W., Gueguen, S., et al. 2002. Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. Vet Microbiol. 89(2-3), 115-27.

- Mason, M.J., Gillett, N.A., Muggenburg, B.A. 1987. Clinical, pathological and epidemiological aspects of canine parvoviral enteritis in an unvaccinated closed beagle colony: 1978-1985. *J Am Anim Hosp Assoc.* 23, 183-92.
- McCaw, D.L., Harrington, D.P., Jones, B.D. 1996. A retrospective study of canine parvovirus gastroenteritis: 89 cases. *J Vet Int Med.* 10, 157 (Resumen).
- McMillen, G.L., Briggs, D.J., McVey, D.S., Phillips, R.M., Jordan, F.R. 1995. Vaccination of racing greyhounds: effects on humoral and cellular immunity. *Vet Immunol Immunopathol.* 49, 101-13.
- Meunier, P., Cooper, B., Appel, M., Slauson, D. 1985. Pathogenesis of Canine Parvovirus Enteritis: The Importance of Viremia. *Vet Pathol.* 22(1), 60-71.
- Miller, A.L. 1999. Therapeutic considerations of L-glutamine: a review of the literature. *Altern Med Rev.* 4, 239-48
- Mischke, R., Barth, T., Wohlsein, P., Rohn, K., Nolte, I. 2001. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) on leukocyte count and survival rate of dogs with parvoviral enteritis. *Res Vet Sci.* 70, 221-25.
- Mishu, L., Callahan, G., Allebban, Z., Maddux, J.M., Boone, T.C., Souza, L.M., Lothrop, C.D., Jr 1992. Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 200, 957-64.
- Miyamoto, T., Taura, Y., Une, S., Yoshitake, M., Nakama, S., Watanabe, S. 1992. Changes in blastogenic responses of lymphocytes and delayed type hypersensitivity responses after vaccination in dogs. *J Vet Med Sci.* 54, 945-50.

- Mohr, A.J., Leisewitz, A.L., Jacobson, L.S., Steiner, J.M., Ruaux, C.G., Williams, D.A. 2003. Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med.* 17(6), 791-98.
- Murphy, F., Gibbs, E., Horzinek, M., Studdert, M. 1999. *Veterinary Virology.* (3ra. Ed). New York: Academic Press. pp. 169-70
- Naeger, L.K., Cater, J., Pintel, D.J. 1990. The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell type-specific manner. *J. Virol.* 64, 6166-75.
- Nakamura, K., Sakamoto, M., Ikeda, Y., Sato, E., Kuwakami, K., Miyazawa, T. 2001. Pathogenic potential of canine parvovirus types 2a and 2c in domestic cats. *Clin Diagn Lab Immunol.* 8, 663-68.
- Nakamura, M., Tohya, Y., Miyazawa, T., Mochizuki, M., Phung, H.T., Nguyen, N.H., Huynh, L.M., Nguyen, L.T., Nguyen, N.P., Akashi, H. 2004. A novel antigenic variant of Canine Parvovirus from a Vietnamese dog. *Arch Virol* 149, 2261-69.
- Nandi, S., Kumar, M. 2010. Canine Parvovirus: Current Perspective. In *J Virol.* 21(1), 31-44.
- Nandi, S., Kumar, M., Mohapatra, T.K., Ravishankar, C. 2013. Emergence of Canine Parvovirus-2 variants and its impact on vaccination. *World App Sci J.* 23 (10), 1366-76.

- Nikitin, P., Price, A., McFadden, K., Yan, C., Luftig, M. 2014. Mitogen-Induced B-Cell Proliferation Activates Chk2-Dependent G1/S Cell Cycle Arrest. *Plos ONE*, 9(1), e87299.
- Nüesch, J., Cotmore, S., Tattersall, P. 1995. Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology*, 209, 122-35.
- Nüesch, J., Rommelaere, J. 2006. NS1 Interaction with CKII: Novel Protein Complex Mediating Parvovirus-Induced Cytotoxicity. *J Virol*. 80(10), 4729-39.
- O’Sullivan, G., Durham, P.J.K., Smith, J.R., Campbell, R.S.F. 1984. Experimentally induced severe canine parvoviral enteritis. *Aust Vet J*. 61, 1-4.
- Obradovich, J.E., Ogilvie, G.K., Powers, B.E., Boone, T. 1991. Evaluation of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor as an inducer of granulopoiesis. A pilot study. *J Vet Int Med*. 5, 75-79.
- Ogilvie, G.K., Obradovich, J.E., Cooper, M.F., Walters, L.M., Salman, M.D., Boone, T.C. 1992. Use of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor to decrease myelosuppression associated with the administration of mitoxantrone in the dog. *J Vet Int Med*. 6, 44-47.
- Otto, C.M., Drobatz, K.J., Soter, C. 1997. Endotoxemia and tumor necrosis factor activity in dogs with naturally occurring parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*. 11, 65-70.
- Paulsen, D.B., Buddington, K.K., Buddington, R.K. 2003. Dimensions and histologic characteristics of the small intestine of dogs during postnatal development. *Am J Vet Res*. 64, 618-26.

- Pedroza, C., Paez, V., Charles, C., Elizondo, D., Cervantes, R., López, M. 2015. Genotyping of canine parvovirus in western Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 27, 107-11.
- Pérez, R., Francia, L., Romero, V., Maya, L., López, I., Hernández, M. 2007. First detection of Canine Parvovirus type 2c in South America. *Vet Microbiol.* 124, 147-52.
- Pérez, R., Calleros, L., Marandino, A., Sarute, N., Iraola, G., Grecco, S., Blanc, H., Vignuzzi, M., Isakov, O., Shomron, N. 2014. Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain. *PLoS ONE.*9, e111779.
- Pollock, R.V. 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *Cornell Vet.* 72, 103-119.
- Potgieter, L.N.D., Jones, J.B., Patton, C.S., Webb-Martin, T.A. 1981. Experimental parvovirus infection in dogs. *Can J Comp Med.* 45, 212-16.
- Prittie, J. 2004. Canine Parvoviral Enteritis: A Review of Diagnosis, Management, and Prevention. *J Vet Emerg Crit Care.* 14, 167-76.
- Proksch, A., Unterer, S., Truyen, U., Hartmann, K. 2014. Efficacy of the paramunity inducer PIND-ORF in the treatment of canine parvovirus infection. *Vet J.* 202(2), 340-47.
- Ramsey, D.S., Kincaid, K., Watkins, J.A. 2008. Safety and efficacy of injectable and oral maropitant, a selective neurokinin1 receptor antagonist, in a randomized clinical trial for treatment of vomiting in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 31(6), 538-43.

- Remond, M., Boireau, P., Lebreton, F., 1992. Partial DNA cloning and sequencing of a canine parvovirus vaccine strain: application of nucleic acid hybridization to the diagnosis of canine parvovirus disease. *Arch Virol* 127, 257-69.
- Rewerts, J.M., McCaw, D.L., Cohn, L.A., Wagner-Mann, C., Harrington, D. 1998 Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor for treatment of puppies with neutropenia secondary to canine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc.* 213, 991-92.
- Rhode, S.L. 1985. Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus. *J Virol.* 54, 630-33.
- Rohde, T., MacLean, D.A., Klarlund-Pedersen, B. 1996. Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol.* 44, 648-50.
- Ros, C., Gerber, M., Kempf, C. 2006. Conformational changes in the VP1-unique region of native Human Parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol.* 80(24), 12017-24.
- Rostamian, M., Sohrabi, S., Kavosifard, H., Niknam, H. 2017. Lower levels of IgG1 in comparison with IgG2a are associated with protective immunity against *Leishmania* tropical infection in BALB/c mice. *J Microbiol Immunol Infect.* 50(2), 160-66.
- Rudloff, E., Kirby, R. 2014. Colloid fluid therapy. In: Bonagura, J.D., Twedt, D.C., (Eds). *Kirk's Current Veterinary Therapy XV.* (15ta ed.). St Louis, MO: Elsevier. pp. 8-14.
- Sanekata, T.; Fukuda, T.; Miura, T.; Morino, H.; Lee, C.; Maeda, K.; Araki, K.; Otake, T.; Kawahata, T.; Shibata, T. 2010. Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus,

measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus. *Biocontrol Sci.* 15, 45-9.

Saxena, L., Kumar, G., Saxena, S., Chaturvedi, U., Sahoo, A., Singh, L. 2013. Apoptosis induced by NS1 gene of Canine Parvovirus-2 is caspase dependent and p53 independent. *Vir Res.* 173(2), 426-30.

Schultze, A.E. 2000. Interpretation of canine leukocyte responses. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology.* (5ta ed.). Philadelphia, PA. Lippincott Williams &Wilkins. pp. 366-81.

Shackelton, L., Parrish, C., Truyen, U., Holmes, E. 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci.* 102(2), 379-84.

Siegrist, C.A. 2000. Vaccination in the neonatal period and early infancy. *Int Rev Immunol.* 19, 195-219.

Smith-Carr, S., Macintire, D.K., Swango, L.J. 1997. Canine parvovirus. Part I. Pathogenesis and vaccination. *Comp Cont Educ Pract.* 19, 125-33.

Somberg, R.L., Robinson, J.P., Felsburg, P.J. 1994. Tlymphocyte development and function in dogs with X-linked severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 153, 4006-15.

Souba, W.W., Strebel, F., Bull, J., et al. 1988. Interorgan glutamine metabolism in the tumor-bearing rat. *J Surg Res.* 44, 720-26.

- Spibey, N., Greenwood, N., Sutton, D., Chalmers, W., Tarpey, I. 2008. Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*. 128(1-2), 48-55.
- Stann, S.E., DiGiacomo, R.F., Giddens, W.E., Evermann, J.F. 1984. Clinical and pathological features of parvoviral diarrhoea in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 185, 51-54.
- Strasser, A., May, B., Teltscher, A., Wistrela, E., Niedermuller, H. 2003. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet Immunol Immunopathol*. 94, 113-21.
- Strassheim, M.L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.Y., Parrish, C.R., 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. *Virology*. 198, 175-84.
- Sundaran, S., Ambily, R., Nair, S., Mini, M. 2015. Utility of a rapid immunochromatographic strip test in detecting canine parvovirus infection compared with polymerase chain reaction. *Vet World*. 8, 523-26
- Sykes, J.E. 2014. Canine parvovirus infections and other viral enteritides. In: Sykes, J.E., (Ed.). *Canine and Feline Infectious Diseases*. (1ra ed.). St Louis, MO. Elsevier. pp. 141-51.
- Taguchi, M., Namikawa, K., Maruo, T., Orito, K., Lynch, J., Sahara, H. 2011. Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. *Can Vet J*. 52(9), 983-86.

- Tang, L., Sampson, C., Dreitz, M.J., McCall, C. 2001. Cloning and characterization of cDNAs encoding four different canine immunoglobulin gamma chains. *Vet Immunol Immunopathol.* 80 (3–4), 259-270.
- Taxonomy. 2017. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Revisado 2 de octubre de 2017, de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- Tigue, C.C., McKoy, J.M., Evens, A.M., Trifilio, S.M., Tallman, M.S., Bennett, C.L. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor administration to healthy individuals and persons with chronic neutropenia or cancer: an overview of safety considerations from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Bone Marrow Transplant.* 40, 185-92.
- Toman, M., Faldyna, M., Knotigova, P., Pokorova, D., Sinkora, J. 2002. Postnatal development of leukocyte subset composition and activity in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 87, 321-6.
- Tsao, J., Chapman, M., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science.* 251(5000), 1456-64.
- Tu, M., Liu, F., Chen, S., Wang, M., Cheng, A. 2015. Role of capsid proteins in parvoviruses infection. *Virology.* 12(1), 114.
- Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., Vuento, M. 1997. Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem.* 250(2), 389-94.

Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W., Parrish, C. 2002. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol.* 76(4), 1884-91.

Virology, 2017, <http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/cpv-mesh-2x.jpg> 1 de octubre de 2017

Wang, D., Yuan, W., Davis, I., Parrish, C.R. 1998. Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virol.* 240, 273-81.

Weichert, W.S., Parker, J.S., Wahid, A.T. M., Chang, S.F., Meier, E., Parrish, C.R. 1998. Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology.* 250, 106-17.

Welbon, L.V., DeVries, J.G., Ford, R., Franklin, R.T., Hurley, K.F., McClure, K.D., Paul, M.A., Schultz, R.D. 2011. 2011 AAHA Canine vaccine guidelines. *Am Anim Hosp Assoc.* 47, 5.

Wilmore, D.W. 1997. Metabolic support of the gastrointestinal tract. Potential gut protection during intensive cytotoxic therapy. *Cancer.* 79, 1794-803.

Wilson, S., Illambas, J., Siedek, E., 2014. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine.* 32(42), 5420-24.

Woods, C.B., Pollock, R.V.H., Carmichael, L.E. 1980. Canine parvoviral enteritis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1980 16, 171-79.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Registro del puntaje de la severidad de la enfermedad tomado cada 48 horas.

Caso	Vacunas	Severidad Día 0	Severidad Día 2	Severidad Día 4	Severidad Día 6	Severidad Día 8
1	3	13+	10+	3		
2	0	8	8	2	3	
3	1	10+	8+	7	5	1
4	1	7	3	1		
5	0	3	7	9	4	3
6	4	6+	1	2		
7	2	8+	1	2		
8	0	6	10+	4	3	1
9	0	6	4	1		
10	0	6	5	1		
11	0	6	5	1		
12	0	9	5	1		
13	0	7+	1	1		
14	1	8	1	1		
15	1	9+	8+	6	1	
16	0	11+	7+	3	5	1
17	0	10+	10+	4	2	
18	1	7	1	1		
19	1	8+	2	1		
20	3	9+	11^a+			
21	0	10^a+				
22	0	11+	8+	1		
23	2	9	5	2	1	
24	1	8	2	1		
25	1	7	3	1		
26	0	10+	1			
27	0	10	8	2		
28	0	7	3	2	1	
29	0	13+	13^b+			
30	1	9	10+	7+	4	1
31	0	9+	10 ^a +			
32	0	6	1			
33	0	12+	11^a+			
34	0	11+	12^a+			
35	0	6	11+	10^a+		
36	0	9+	11+	5	1	
37	2	8	10+	8	3	
38	0	8	9+	3	1	
39	1	12+	11+	6+	1	
40	0	6	4	1		
41	0	5	8+	1		
42	4	6	3	1		
43	2	8+	5+	1		
44	1	5	3	1		
45	2	7	3	3		
46	0	9	3	1		
47	1	12+	12^a+			
48	1	5	7+	1		
49	0	13+	9+	6+	4	1
50	0	11+	9+	1		
51	0	11^a				

“Correlación de la cinética de severidad de la enfermedad, conteo total de leucocitos y títulos de IgG contra Parvovirus canino, en perros naturalmente infectados (vacunados y no vacunados).”

52	0	8+	10+	7	4	2
53	0	10+	9+	6+	1	
54	0	7	3	1		
55	1	8+	9+	5	1	
56	3	11	12+	12^{b+}		

Severidad Baja: 1-5; Severidad Media: 6-10; Severidad Alta: 11-15

^a murió, ^b eutanasia; + diarrea sanguinolenta

Los números en negrita denotan hemogramas con leucopenia.

ANEXO 2. Cinética de conteo leucocitario en perros con parvovirus canina, vacunados y no vacunados (valores expresados x10⁹/L).

Perro	Perros vacunados					Perros No Vacunados					
	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8	Perro	Día 0	Día 2	Día 4	Día 6	Día 8
1	2.1	1.6	20.5			2	12	8	9.1	4	
3	5.9	4.7	33.1	41.9	28.7	5	21.3	14.4	6.9	11	7.5
4	2.9	3.1	11.6			8	7.1	3.2	9.3	12.8	17.8
6	14.8	8.6	9.2			9	7.7	6.5	8.6		
7	5.8	21.6	36.6			10	4.3	3.4	6.2		
14	4.4	9.15	14.6			11	16.7	7.8	7.6		
15	4.4	3.9	1.1	9.4		12	3.9	8.4	18.4		
18	11.9	10.3	8.1			13	7	12.5	8.9		
19	7.7	4	6.2			16	0.9	3.8	28.1	62.3	60.6
20	5.9	2.1^a				17	3.8	5.9	9.5	12.05	
23	21.9	3.6	5.3	7.3		21	0.2^a				
24	14.1	5.9	9.5			22	5.6	1.1	11.4		
25	17.1	7.3	20.7			26	4.6	7.6			
30	3.1	0.5	4.3	11.2	15.7	27	3.1	2.8	6.9		
37	11.8	2.3	3.3	3.2		28	24.7	7.8	12.8	13.7	
39	4.9	3.35	9.5	17.1		29	0.9	0.35^b			
42	6.8	13.9	16.4			31	25.7	44.6 ^a			
43	10.4	6.2	7.4			32	31.2	29.6			
44	11.3	10.9	11.9			33	2.9	1.2^a			
45	9	6.9	7.8			34	4.7	0.15^a			
47	3.5	0.7^a				35	5.1	0.35	0.4^a		
48	17.1	15.8	28.35			36	7.3	1	7.7	16.1	
55	28.6	17.8	16.2	15.8		38	11.2	4.4	23	24.8	
56	1.1	0.1	0.3^b			40	12.4	24.2	24.9		
						41	10.5	4.6	32.1		
						46	7.8	10.8	11.15		
						49	1.05	10.15	15.8	24.7	31.3
						50	0.8	1.7	22.5		
						51	2.1^a				
						52	20	0.6	5.8	14.6	40
						53	3.3	1.5	24.3	28.2	
						54	17.4	20.5	28.8		

^a murió, ^b eutanasia

Valores en negrita indican que presentaron leucopenia.

ANEXO 3. Títulos de anticuerpos al momento del ingreso y al momento de alta o muerte del paciente

VACUNADOS			NO VACUNADOS		
PERRO	INGRESO	ALTA/MUERTE	PERRO	INGRESO	ALTA/MUERTE
1	2048	2048	2	128	256
3	512	256	5	32	256*
4	512	512	8	128	1024*
6	128	128	9	512	256
7	128	128	10	16	128*
14	256	512	11	256	1024*
15	128	256	12	1024	512
18	256	512	13	16	32
19	128	256	16	256	512
20	128	128 ^a	17	128	256
23	128	128	21	64	64 ^a
24	128	128	22	64	256*
25	512	512	26	128	512*
30	128	512	27	512	512
37	128	1024*	28	64	128
39	256	512	29	512	512 ^b
42	64	512*	31	512	512 ^a
43	512	256	32	256	256
44	256	512	33	512	4096 ^{*a}
45	128	256	34	512	2048 ^{*a}
47	2048	2048 ^a	35	256	2048 ^{*a}
48	512	512	36	128	4096*
55	128	512	38	128	512*
56	256	1024 ^{*b}	40	16	1024*
			41	128	512*
			46	128	1024
			49	1024	2048
			50	64	512*
			51	512	512 ^a
			52	256	512
			53	128	128
			54	512	2048*

^a murió, ^b eutanasia

* Cambio significativo en comparación al título del día de ingreso (más de una Unidad de inhibición de hemaglutinación).

ANEXO 4. SOLUCIÓN ALSEVER

Se prepara en 100 ml de Agua Destilada, adicionando:

- Glucosa: 2.05 g
- Citrato trisódico anhidro: 0.8 g
- Cloruro de sodio: 0.42 g

Se homogeniza y se guarda en refrigeración a 4°C.

ANEXO 5. SOLUCIÓN DE FOSFATOS BUFERADA A PH 7 (PBS)

Preparación de soluciones:

- Fosfato dibásico anhidro: añadir 28.396 g a 100 ml de Agua Destilada
- Fosfato monobásico: añadir 27.602 g a 100 ml de Agua destilada
- Cloruro de sodio: añadir 8.768 g a 100 ml de Agua Destilada

Solución A:

- 10 ml de la solución de Cloruro de sodio
- 10 ml de la solución de fosfato dibásico
- 80 ml de Agua Destilada

Solución B:

- 10 ml de la solución de Cloruro de sodio
- 10 ml de la solución de fosfato monobásico
- 80 ml de Agua Destilada

Mezclar las soluciones y llevar al potenciómetro y buferar hasta alcanzar pH 7.0. Guardar a 4°C.

ANEXO 6. SOLUCIÓN DE ALBÚMINA

- 0.1 g de albúmina
- 100 ml de Agua Destilada

Homogenizar perfectamente y guardar en refrigeración a 4°C.