



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PARA LA DETECCIÓN DE PARVOVIRUS CANINO**

ARTURO EDUARDO CÁCERES RIQUELME

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: ALDO ANDRÉS GAGGERO BRILLOUET
Programa de Virología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**IMPLEMENTACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA
PARA LA DETECCIÓN DE PARVOVIRUS CANINO**

ARTURO EDUARDO CÁCERES RIQUELME

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

PROFESOR GUÍA : ALDO GAGGERO BRILLOUET

PROFESOR CORRECTOR : CARLOS NAVARRO VENEGAS

PROFESOR CORRECTOR : VÍCTOR NEIRA RAMIREZ

SANTIAGO, CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

Es momento de agradecer a todas aquellas personas que durante estos años me apoyaron y alentaron, en especial a mis padres Marta y Arturo, y a mis hermanos que sin ellos esto no sería posible y al resto de mi familia, que siempre estuvieron ahí. Agradecer también al Dr. Aldo Gaggero, que aceptó guiarme en este proceso y extender ese agradecimiento al Dr. Carlos Navarro, que desde los primeros años en la carrera pude contar con él y al Dr. Víctor Neira, cuyo aporte fue fundamental para realización de este trabajo. A mis amigos Cristian y Raúl, que también aportaron en la realización de esta memoria. Agradecer a la gente del Programa de Virología, Rosita, Manuel y Jorge que me ayudaron en todo momento mientras estuve en su laboratorio. Finalmente agradecer a todas las personas que han pasado por mi vida y que aportaron directa o indirectamente en la culminación de este proceso.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Taxonomía, estructura y replicación viral	2
2.2 Patogénesis.....	3
2.3 Signos Clínicos	4
2.4 Tratamiento y Prevención.....	4
2.5 Inmunización	4
2.6 Diagnóstico	5
3. OBJETIVOS.....	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 Controles	8
4.2 Muestras.....	8
4.3 Extracción de ADN.....	9
4.4 Partidores	9
4.5 Mezcla de reacción de PCR.....	9
4.6 Reacción de PCR	10
4.7 Visualización del producto amplificado	10
4.8 Determinación de la identidad del fragmento amplificado.....	10
4.9 Análisis de resultados	11
4.10 Técnica de Inmunocromatografía (IC)	11
4.11 Bioseguridad	11
5. RESULTADOS	12
6. DISCUSIÓN.....	15
7. CONCLUSIÓN	19
8. BIBLIOGRAFÍA.....	20
9. ANEXOS.....	23

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Muestras de heces recolectadas	8
Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR según indicaciones del fabricante.....	9
Tabla 3. Porcentaje de identidad nucleotídica respecto de las secuencias de las distintas variantes de CPV-2 descritas en el BLAST™.....	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gel agarosa 2% PCR CPV-2.....	12
Figura 2. Resultado de las pruebas de IC realizadas en el laboratorio de virus entéricos...	14
Figura 3. Comparación de la PCR con la IC.	15

RESUMEN

La infección por parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es una de las principales causas de enteritis hemorrágica en perros de todo el mundo y contar con una técnica de diagnóstico que sea altamente sensible es fundamental para Médicos Veterinarios, dueños y criadores de perros. En este trabajo se implementó un protocolo que utiliza la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para detectar un fragmento del ADN de CPV-2 a partir de heces de perros con signología clínica correspondiente a parvovirus canino. En total se recolectaron y analizaron 12 muestras de heces que resultaron positivas con la PCR convencional, lo que fue confirmado mediante la secuenciación de los fragmentos obtenidos y contrastados con las secuencias de las distintas variantes de CPV-2 descritas en la base de datos GenBank. Las mismas muestras fueron analizadas con una prueba rápida, que corresponde a una técnica de inmunocromatografía (IC) de uso rutinario en la consulta veterinaria. En este caso de las 12 muestras analizadas, sólo un 41,7% resultaron positivas, evidenciando una menor sensibilidad que la técnica molecular para el diagnóstico de parvovirus canino. Adicionalmente, se hizo un análisis de las secuencias nucleotídicas obtenidas arrojando una variabilidad promedio de 0,7%. Los resultados de este trabajo permiten establecer que la PCR convencional es una técnica de diagnóstico recomendable para la detección de parvovirus canino, no así las pruebas rápidas utilizadas en la consulta veterinaria que en este y otros estudios han mostrado constantemente su baja sensibilidad. Es importante destacar que el presente trabajo es la primera aproximación molecular al parvovirus canino tipo 2 en Chile.

Palabras clave: parvovirus canino, reacción en cadena de la polimerasa, inmunocromatografía.

ABSTRACT

Infection with canine parvovirus type 2 (CPV-2) is one of the main causes of hemorrhagic enteritis in dogs worldwide and having a diagnostic technique that is highly sensitive is essential for veterinarians, dog owners and breeders. In this work, a protocol was implemented that uses the conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) to detect a CPV-2 DNA fragment from feces of dogs with clinical signology corresponding to canine parvovirus. In total, 12 stool samples that were positive with conventional PCR were collected and analyzed, which was confirmed by sequencing the fragments obtained and contrasted with the sequences of the different variants of CPV-2 described in the GenBank database. The same samples were analyzed with a rapid test, which corresponds to a routine immunochromatography (IC) technique in the veterinary practice. In this case of the 12 samples analyzed, only 41.7% were positive, showing a lower sensitivity than the molecular technique for the diagnosis of canine parvovirus. Additionally, an analysis of the nucleotide sequences obtained was made, yielding an average variability of 0.7%. The results of this work allow to establish that conventional PCR is a recommended diagnostic technique for the detection of canine parvovirus, but not the rapid tests used in the veterinary practice that in this and other studies have consistently shown low sensitivity. It is important to note that the present work is the first molecular approach to canine parvovirus type 2 in Chile.

Keywords: canine parvovirus, polymerase chain reaction, immunochromatography.

1. INTRODUCCIÓN

La infección por parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es una de las principales causas de gastroenteritis severas en la especie canina alrededor del mundo. El virus que fue detectado a finales de la década de 1970 e identificado a principios de 1980, se ha transformado en una amenaza importante para la tenencia y crianza de perros, ya que la infección presenta una morbilidad que puede llegar hasta el 100% y una mortalidad que en cachorros puede ser del 90%. Los primeros casos de parvovirus canino en Chile fueron observados en el año 1980 y en 1981, el virus fue aislado por primera vez en el país (Berríos, 2001).

Actualmente existen tres variantes de CPV-2 que infectan a los perros en el mundo y que han reemplazado completamente al CPV-2 original. Estas variantes se denominan CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c y se diferencian entre ellas solo en algunos aminoácidos de las proteínas que forman su cápside. Estas diferencias no se traducen en grandes cambios en la forma de presentación de la enfermedad, en las propiedades antigénicas del virus o en la eficacia de las vacunas disponibles para la inmunización activa en caninos.

La importancia de la infección y sus implicancias para dueños de perros, criadores y médicos veterinarios, hace necesario contar con una herramienta de diagnóstico eficaz, tanto para instaurar un tratamiento adecuado en el paciente, como tomar las medidas de control que eviten la diseminación del virus.

Con estos antecedentes, en esta Memoria de Título se planteó la implementación de un protocolo de una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional, como método para la detección de parvovirus canino, en muestras de deposiciones de perros enfermos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 1967 se detectó el primer parvovirus que infecta caninos, denominado en un principio como parvovirus canino, y que hoy en día se conoce como Virus Diminuto Canino (Goodard y Leisewitz, 2010; Nandi y Kumar, 2010). El Parvovirus Canino tipo 2, fue detectado posteriormente en 1978, luego de emerger como una pandemia debido a la falta de inmunidad previa en los perros, lo que permitió la rápida diseminación del virus en todo el mundo (Sykes, 2013). CPV-2 es el virus que reviste importancia actualmente, pues desde su aparición, se transformó en una causa importante de morbilidad y mortalidad en perros de todo el mundo (Goodard y Leisewitz, 2010). El origen del virus no está claro, pero se postula que surgió como una variante del Virus de la Panleucopenia Felina (FPV). Entre otras hipótesis sobre el surgimiento de este virus, se postula que sería una mutación del FPV presente en la vacuna o una adaptación de los parvovirus que afectan a carnívoros silvestres como zorros y visones (Truyen, 2006). Si bien el virus CPV-2 fue detectado en 1978, estudios sugieren que éste habría emergido a inicios de la década de 1970 (Hoezler y Parrish, 2010). El CPV-2 detectado continuó evolucionando y en 1980 fue identificada su primera variante, denominada CPV-2a, variante que presentaba sustituciones en algunos aminoácidos de la secuencia que forma la proteína VP2 de la cápside viral. En 1984 una nueva variante fue detectada, esta vez a partir de CPV-2a y que fue denominada CPV-2b. Ambas se diseminaron rápidamente alrededor del mundo y en poco tiempo desplazaron completamente al virus original (CPV-2) (Nandi y Kumar, 2010). En 2000 fue descrita en Italia una nueva variante a partir del CPV-2b, que fue denominada CPV-2c, y que también rápidamente fue detectada en otras partes del mundo (Bounavoglia *et al.*, 2001; Nandi y Kumar, 2010).

2.1 Taxonomía, estructura y replicación viral

El CPV-2 se clasifica dentro de la familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae* (Decaro y Bounavoglia, 2012) y recientemente fue incluido en el género *Protoparvovirus*, como miembro de la especie *Protoparvovirus carnívoro 1* que además agrupa, entre otros, al FPV (ICTV, 2014; Tinky *et al.*, 2015).

Los parvovirus son virus pequeños, de 25 nm de diámetro aproximadamente, sin envoltura, con una cápside icosaédrica compuesta de tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3), y un genoma de ADN de hebra simple de 5.000 nucleótidos aproximadamente. Esta hebra

codifica dos proteínas estructurales (VP1 y VP2) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) (Decaro y Bounavoglia, 2012). La cápside viral está compuesta por 60 subunidades proteicas (capsómeros), que está constituida en un 90% por la proteína VP2 y aproximadamente un 10% por la proteína VP1. Adicionalmente, puede encontrarse una tercera proteína estructural, VP3, que no se detecta en todos los virus, y que se origina por la acción de una proteasa del hospedero sobre VP2 (Parrish, 2011). Esta proteína solo está presente en la cápside cuando ésta contiene el ADN viral (Nandi y Kumar 2010). Las proteínas NS1 y NS2 tienen roles durante la replicación viral. NS1 tiene funciones de helicasa y endonucleasa e interfiere con la replicación del ADN del hospedero, manteniendo a la célula en la fase S del ciclo celular y NS2 regula la expresión de los genes virales (Parrish, 2011).

Debido a que el genoma de los parvovirus es pequeño y solo codifica algunas proteínas, estos virus dependen fuertemente de la célula hospedera para su replicación. Las proteínas necesarias para la replicación viral se encuentran solo en la fase S del ciclo celular (Carter y Saunders, 2007), por lo que la replicación ocurre en el núcleo de células en constante división, como son las células fetales, de recién nacido o de tejido intestinal de animales jóvenes o adultos (Decaro y Bounavoglia, 2012). Por la acción de la ADN polimerasa, la hebra simple de ADN del virus es convertida en una hebra doble. Mediante la ARN polimerasa II celular se generan dos clases de ARN mensajero (ARNm), uno de mayor longitud que codifica las proteínas no estructurales y otro de menor longitud que codifica las proteínas de la cápside (Carter y Saunders, 2007).

2.2 Patogénesis

El CPV-2 ingresa al organismo por vía orofaríngea (Parrish, 2011), por el contacto con heces infectadas o de superficies contaminadas (Nandi y Kumar, 2010). El virus replica inicialmente en el tejido linfoide de la región (Humm y Hughes, 2009), en los linfonodos mesentéricos y en el timo, y luego se disemina a través de la sangre hasta el epitelio de las criptas en la mucosa del intestino delgado (Goddard y Leisewitz, 2010), luego de cuatro días desde la infección (Humm y Hughes, 2009). El CPV-2 afecta directamente las células de las criptas intestinales, llevando a la destrucción y acortamiento de las vellosidades intestinales, lo que impide la absorción de los nutrientes resultando en un cuadro de diarrea. El deterioro de la mucosa intestinal permite la salida de sangre hacia el lumen intestinal y el paso de

bacterias del intestino a la sangre (Nandi y Kumar, 2010). El tejido linfoide también se afecta y la destrucción de linfocitos producirá inmunosupresión, predisponiendo a infecciones secundarias (Li y Humm, 2015). Rara vez el virus afecta el miocardio y esto ocurre cuando la madre no posee anticuerpos (Humm y Hughes, 2009) y el cachorro adquiere la infección dentro de la primera semana de vida, cuando las células miocárdicas están en rápida división (Parrish, 2011).

2.3 Signos Clínicos

La infección entérica se presenta con anorexia, depresión, vómitos, dolor abdominal y eventualmente fiebre. La diarrea puede ser severa y hemorrágica especialmente en cachorros. Debido a la diarrea y al vómito, se produce rápidamente un cuadro de deshidratación. Los síntomas aparecen de tres a cinco días desde que el virus ingresa al organismo y la muerte del cachorro puede ocurrir a los tres días posterior a la aparición de los signos clínicos (Cohn y Langdon, 2008; Li y Humm, 2015; Nandi y Kumar 2010; Goodard y Leisewitz, 2010). Cuando CVP-2 infecta el miocardio, generalmente los signos clínicos son evidentes en toda la camada (Cohn y Langdon, 2008) y se produce la muerte por insuficiencia cardíaca congestiva. El 70% de los cachorros morirá dentro de las primeras ocho semanas y el 30% sufrirá cambios patológicos en el órgano, que producirán la muerte semanas o meses después. (Li y Humm, 2015).

2.4 Tratamiento y Prevención

El tratamiento de la infección por CPV es similar al administrado para otras gastroenteritis, principalmente de soporte y cuya intensidad dependerá de la severidad de los signos y síntomas. Se debe considerar en un comienzo la restricción alimentaria y la alimentación parenteral en casos de vómito persistente, el uso de antieméticos y antidiarreicos de ser necesarios y eventualmente la transfusión de sangre entera o plasma en caso de anemia severa (Sherding, 2006).

2.5 Inmunización

Los cachorros adquieren anticuerpos a través del calostro, lo que les otorga protección contra el virus en las primeras semanas de vida. Las mayores tasas de infección se observan en cachorros mayores a seis semanas de vida. Estos anticuerpos maternos interfieren con la

inmunización de los cachorros a través de la vacunación. Títulos de anticuerpos maternos iguales o superiores a 1:80, confieren inmunidad a los cachorros. Cuando el título es de 1:40 no confiere inmunidad, pero si es capaz de interferir con la inmunización activa de los cachorros (Pratelli *et al.*, 2000). La inmunización activa se realiza mediante la administración de vacunas y el 90% de los cachorros responde a ésta a las doce semanas de edad, cuando la inmunidad materna ha decaído. Generalmente se utilizan vacunas polivalentes que además de CPV, contienen entre otros antígenos, distemper canino y leptospira. Las vacunas comercializadas en Chile y registradas en el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) corresponden a vacunas a virus vivo modificado polivalentes (Nandi y Kumar 2010; SAG, 2015).

2.6 Diagnóstico

El diagnóstico a través de los signos clínicos solo es presuntivo y debe ser confirmado por una prueba diagnóstica. Entre las pruebas empleadas para la detección del virus o antígeno viral se incluyen la hemoaglutinación, que a pesar de ser rápida y simple para detectar parvovirus en las heces utilizando eritrocitos porcinos, felinos o de mono Rhesus (Nandi y Kumar, 2010), es menos sensible que otras pruebas como el aislamiento viral o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Desario *et al.*, 2005), además de que algunas variantes de CPV-2 carecerían de actividad hemoaglutinante (Cavalli *et al.*, 2001). Una variación de esta prueba es la inhibición de la hemoaglutinación, la cual sería más específica, pues se usan anticuerpos específicos contra el antígeno viral (Desario *et al.*, 2005). La prueba de ELISA es rápida y simple, pero se ha encontrado una gran variabilidad en su sensibilidad en diversos estudios, 81.8% (Markovich *et al.*, 2012), 56.2% (Desario *et al.*, 2005) y 18.4% (Schmitz *et al.*, 2009), aunque tiene la capacidad de detectar las tres variantes de CPV-2 circulantes (Dacaro *et al.*, 2010). También es posible realizar microscopía electrónica, aunque CPV-1 y CPV-2 son morfológicamente idénticos (Li y Humm, 2015), lo que no permite su identificación. La técnica de inmunocromatografía IC se utiliza rutinariamente en la práctica clínica, ya que entrega el resultado en poco tiempo, sin embargo, comparada con las pruebas moleculares, su sensibilidad no supera el 50% (Decaro y Bounavoglia, 2012). La PCR ha demostrado ser la prueba más sensible para la detección de parvovirus canino y en su forma convencional, ha alcanzado una sensibilidad de 93,15%, comparada con la técnica de PCR en tiempo real como prueba de referencia (Desario *et al.*, 2005). Esta prueba se ha transformado

en la técnica de elección frente a casos de perros con signos clínicos y que dan negativo a otras pruebas diagnósticas (Humm y Hughes, 2009).

En consecuencia, el propósito de esta Memoria de Título fue implementar una técnica de diagnóstico molecular de CPV-2, como es una técnica de PCR convencional, la cual amplifica un fragmento del gen que codifica las proteínas estructurales de la cápside viral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar una técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico molecular de parvovirus canino tipo 2.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar un ensayo de PCR convencional para el diagnóstico molecular de parvovirus canino tipo 2.
2. Evaluar la técnica de PCR en muestras de heces de perros con parvovirus confirmada por una técnica de inmunocromatografía.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente memoria de título se llevó a cabo en el laboratorio de virus entéricos, Programa de Virología, ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.1 Controles

Como control positivo para la reacción de PCR, se obtuvo ADN viral a partir de la vacuna comercial NOBIVAC PUPPY DP®. Esta vacuna contiene virus vivo modificado de parvovirus canino cepa 154 ($\geq 10^{7.0}$ TCDI₅₀) y virus distemper canino cepa Onderstepoort ($\geq 10^{5.0}$ TCDI₅₀). Como control negativo se utilizó ADN de virus disponible en el laboratorio (adenovirus y poliomavirus). Para el control de reactivos se utilizó agua libre de nucleasas.

4.2 Muestras

La técnica de PCR implementada se evaluó en doce muestras de heces de perros con signología compatible con parvovirus canino recolectadas en distintas clínicas veterinarias de Santiago cuyo diagnóstico fue confirmado previamente mediante una prueba de IC. Las muestras de heces fueron recolectadas y almacenadas a 4 °C hasta el momento de la extracción del ADN viral (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de heces recolectadas

Muestra	Sexo	Edad	Raza
1	S/I	3 A	Mestizo
2	M	4 m	Mestizo
3	H	1 m	Mestizo
4	M	3 m	Daschund
5	H	6 m	Pastor alemán
6	H	9 m	Mestizo
7	H	5 m	Pastor inglés
8	M	1 A	Mestizo
9	H	3 m	Mestizo
10	H	5 m	Labrador
11	M	1 A	S/I
12	H	2 m	S/I

A: Años; m: meses; M: macho; H: hembra; S/I: sin información.

4.3 Extracción de ADN

Se utilizaron columnas de extracción (*High Pure PCR Template Preparation Kit* de Roche®) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 200 µL de la muestra (vacuna reconstituida o las muestras de diarrea sanguinolenta) fueron incubados en una solución de 200 µL de *Binding buffer* más 40 µL de Proteínasa K durante 10 minutos a 72 °C. Posterior a la incubación, se agregaron 100 µL de *Binding buffer* y se trasladó a la columna donde se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Luego se agregó a la columna 500 µL de *Inhibitor Removal buffer* y se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm durante 1 minuto. Después se realizaron dos lavados con 450 µL de *Wash buffer*. Finalmente a la columna ya lavada se le agregaron 50 µL de *Elution buffer* para recuperar el ADN ya purificado.

4.4 Partidores

Los partidores utilizados fueron diseñados por Bounavoglia *et al.* (2001) y utilizados por Desario *et al.* (2005) y Tinky *et al.* (2015) en distintos estudios. Estos partidores amplifican un fragmento de ADN de aproximadamente 580 pares de bases, que codifica las proteínas de la cápside viral y abarca los aminoácidos que determinan las propiedades biológicas importantes del virus (Bounavoglia *et al.*, 2001): *555forw* 5' CAGGAAGATATCCAGAAG GA 3' y *555rev* 5' GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA 3'. Los partidores fueron sintetizados por la empresa IDT® (USA).

4.5 Mezcla de reacción de PCR

Para la mezcla de reacción de PCR se utilizó el kit comercial *GoTaq® G2 Flexi DNA polymerase* (Promega®), según las instrucciones del fabricante (Tabla 2).

Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR según indicaciones del fabricante.

Reactivo	Concentración	Volumen
5X <i>Green Flexi Buffer</i>	1x	10 µL
Solución MgCl ₂	2 mM	4 µL
dNTP Mix	0,2 mM (c/u)	1 µL
Partidor 555forw, Partidor 555rev	0,5 µM (c/u)	2,5 µL (c/u)
GoTaq® G2 <i>Flexi DNA Polymerase</i> (5u/µL)	1,25 u	0,25 µL
Muestra ADN	<0,5µg/50µL	5 µL
Agua libre de Nucleasas		24,75 µL
Total		50 µL

4.6 Reacción de PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador de 96 pocillos (Applied Biosystems 2720, USA) de 0,2 mL utilizando el siguiente protocolo: activación de la *Taq* ADN polimerasa a 94 °C durante 2 minutos. Posteriormente se realizaron 40 ciclos de denaturación a 94 °C por 30 segundos; alineamiento a 48 °C por 30 segundos y polimerización a 72 °C por 1 minuto y finalmente una etapa de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

4.7 Visualización del producto amplificado

Para visualizar el producto de la reacción de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en *buffer* TAE (Tris-acetato-EDTA). La electroforesis se realizó a 90 V durante 40 min, utilizando como marcador de peso molecular un estándar con fragmentos de entre 100 y 1000 pb (BioLabs®). Posteriormente el gel de agarosa se incubó en una solución de GelRed (GelRed™ *Nucleic Acid Gel Stain*, Biotium, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego el gel se observó en un transiluminador de luz ultravioleta (Transiluminador UVP®) y se fotografió para registrar los resultados.

4.8 Determinación de la identidad del fragmento amplificado

Para determinar la identidad del fragmento amplificado, posterior al registro de los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2%, se procedió a extraer el fragmento amplificado del gel utilizando el kit E.Z.N.A. *Gel Extraction Kit* (Omega Bio-tek®) según las instrucciones del fabricante. En resumen, el gel fue cortado del tamaño de la banda fluorescente que contiene el producto de PCR deseado. A este fragmento de gel se le agregó un volumen igual de *Binding buffer* y se incubó durante 7 minutos a 60 °C. Luego el contenido se transfirió a una columna de extracción donde se centrifugó a 10.000 rpm por 1 minuto. El filtrado se descartó y se agregaron 300 µL de *Binding buffer* centrifugando nuevamente. Posteriormente se realizó un lavado con 700 µL de *Washbuffer*. Finalmente se utilizaron 50 µL de *Elution buffer* para recolectar el fragmento deseado. Los extractos fueron guardados a -20 °C hasta que fueron secuenciados en la empresa Macrogen® (República de Corea). Para determinar el porcentaje de identidad nucleotídica, las secuencias obtenidas fueron ingresadas al programa en línea BLAST™ (*National Library of Medicine*, USA), donde éste realizó alineamientos con las secuencias que se encuentran en su base de datos entregando aquellas secuencias con las que se producen alineamientos significativos.

4.9 Análisis de resultados

Se consideraron positivas aquellas muestras que generaron un amplicón de 600 pb aproximadamente con un Porcentaje de Identidad Nucleotídica (PIN) mayor al 90%.

4.10 Técnica de Inmunocromatografía (IC)

Se utilizó una prueba de IC comercial para confirmar el diagnóstico de infección por CPV-2 en cada una de las muestras recolectadas (*SensPERT™ CPV AG TEST KIT*, VetAll Laboratories, República de Corea) y se usó según las instrucciones del fabricante. El procedimiento consiste en recolectar alrededor de 30 mg de heces con la tórula incluida en el kit y homogenizar en el *buffer* también incluido. Una vez decantadas las partículas fecales se utilizan unos 100 µL del sobrenadante que se depositan en el dispositivo de reacción, donde éste migra por capilaridad a través de una membrana de nitrocelulosa, y se conjuga con un primer anticuerpo contra el antígeno que se desea detectar y un reactivo de detección. Durante la migración, primero llega a una zona de captura que posee un segundo anticuerpo contra el antígeno buscado que retiene el conjugado antígeno anticuerpo produciendo el cambio de color de la banda de detección del dispositivo. Existe otra banda que posee un anticuerpo que reconoce al reactivo de detección y captura el conjugado que no quedo retenido en la zona de captura. Ésta línea es el control de la prueba y su coloración indica que la prueba fue bien realizada.

4.11 Bioseguridad

En el laboratorio existe acceso limitado a las instalaciones, uso de delantal limpio, utilización de material limpio y la adecuada eliminación de desechos. Respecto al procedimiento de PCR y posterior electroforesis, se utilizaron guantes de nitrilo, tanto para evitar contaminación de la muestra, como para manipular el gel. Al utilizar el transiluminador se debe contar con gafas con filtro UV y una placa de acrílico ubicada entre el equipo y la persona que visualiza el gel. Finalmente, el gel y los guantes utilizados fueron eliminados en forma adecuada.

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo específico 1

Implementar un ensayo de PCR convencional para el diagnóstico molecular de parvovirus canino tipo 2.

La observación del gel de agarosa al 2% en el transiluminador permitió la detección de bandas o amplificados cercanos a 600 pb, tanto en los controles positivos como en las doce muestras analizadas. En el control negativo y el control de reactivos, no se observó la presencia de bandas o amplicones (Figura 1).

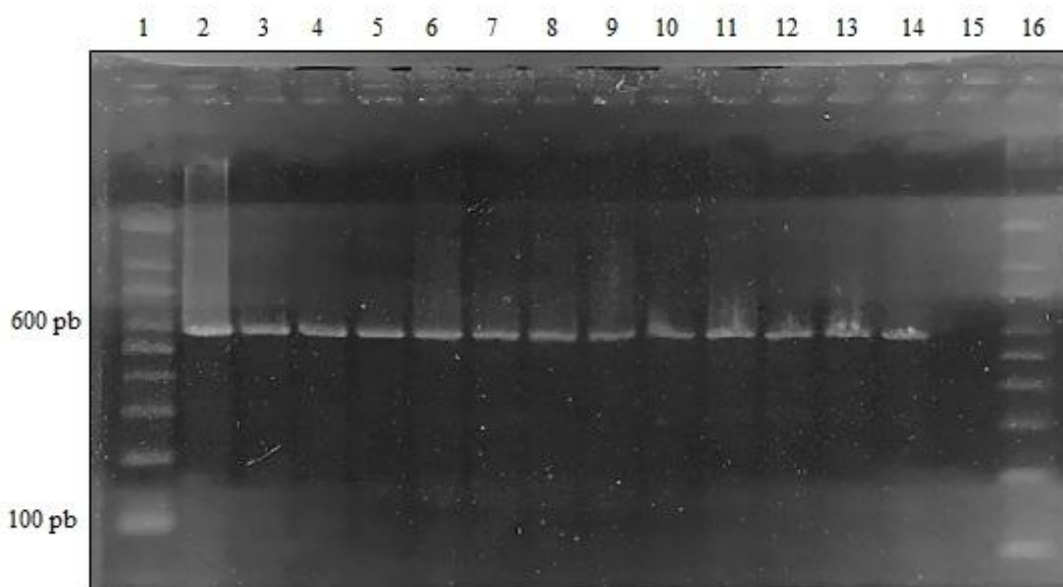


Figura 1. Gel agarosa 2% PCR CPV-2, carril 1: marcador de tamaño molecular (100 a 1000 pb); carril 2: Control Positivo (Vacuna Novivac Puppy DP®); carril 3: Muestra 1; carril 4: Muestra 2; carril 5: Muestra 3; carril 6: Muestra 4; carril 7: Muestra 5; carril 8: Muestra 6; carril 9: Muestra 7; carril 10: Muestra 8; carril 11: Muestra 9; carril 12: Muestra 10; carril 13: Muestra 11; carril 14: Muestra 12; carril 15: Control de Reactivos; Carril 16: marcador de tamaño molecular (100 a 1000 pb).

Determinación de la identidad nucleotídica

Las secuencias de las doce muestras que fueron analizadas, se ingresaron al programa BLAST™, de acceso *online* y gratuito, generando alineamientos significativos con distintas cepas de las variantes de CPV-2 y entregando un porcentaje de identidad nucleotídica mayor al 90% (Tabla 3) respecto de las secuencias de parvovirus canino que se encuentran descritas en el BLAST™ (Anexo 1 y 2).

Tabla 3. Porcentaje de identidad nucleotídica respecto de las secuencias de las distintas variantes de CPV-2 descritas en el BLAST™.

Muestra	PIN
1	95
2	99
3	99
4	99
5	99
6	99
7	99
8	99
9	99
10	99
11	99
12	99

5.2 Objetivo específico 2

Evaluar la técnica de PCR en muestras de heces de perros con parvovirus confirmada por una técnica de inmunocromatografía

En el laboratorio de virus entéricos se realizaron pruebas de IC a diez de las doce muestras obtenidas (Figura 2), a las dos muestras restantes se les practicó IC directamente en la consulta veterinaria resultando positivas. Realizada la prueba en el laboratorio se obtuvieron solo tres muestras positivas. En total se obtuvieron 5 muestras positivas mediante IC, es decir 41,7%. No se obtuvieron resultados inválidos.

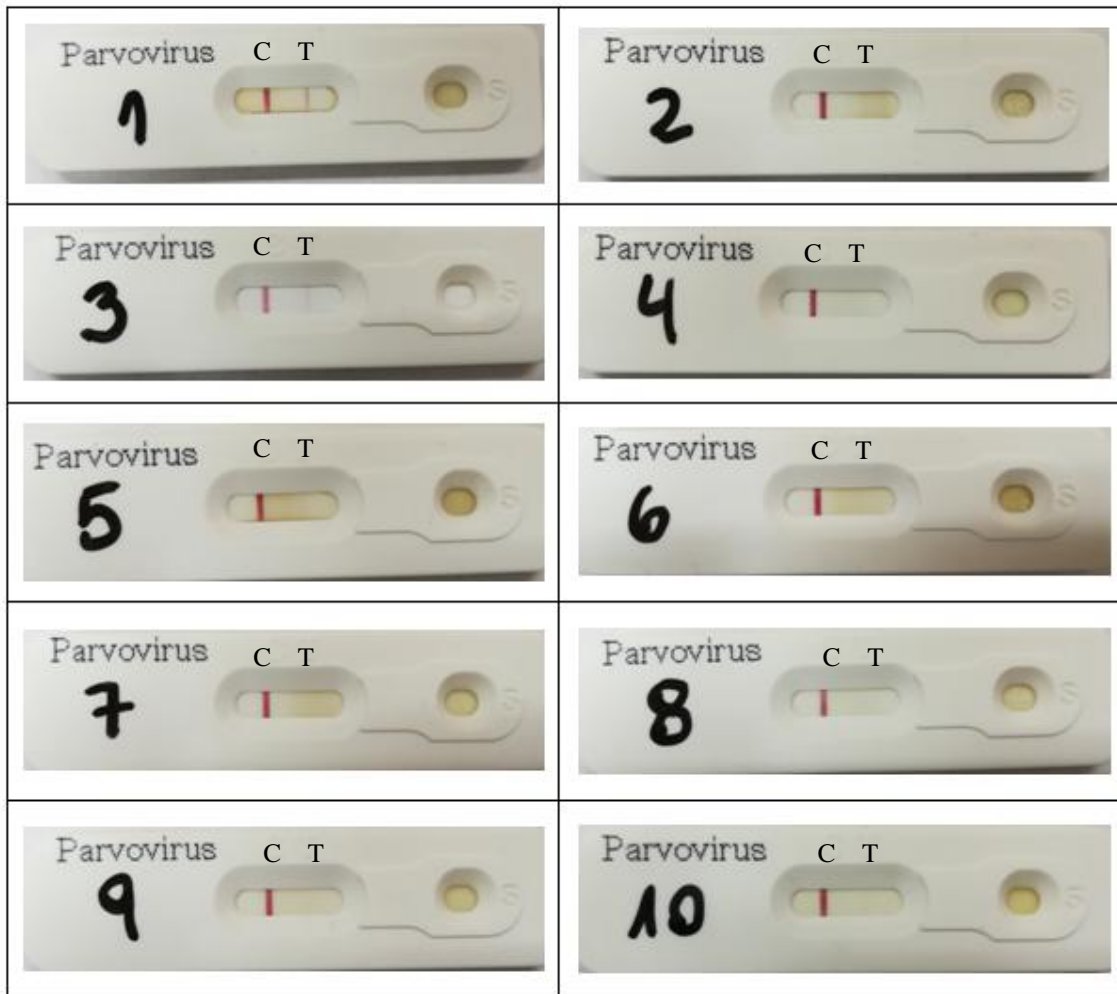


Figura 2. Resultado de las pruebas de IC realizadas en el laboratorio de virus entéricos. La línea roja en C indica que la técnica fue bien realizada. Línea roja en T indica resultado positivo de la prueba. Las muestras 11 y 12 fueron analizadas por la misma técnica en la consulta veterinaria y resultaron positivas.

6. DISCUSIÓN

Actualmente la infección por CPV-2 es una de las causas más frecuentes de enteritis infecciosa en perros de todo el mundo. Esta enfermedad presenta una alta morbilidad y mortalidad sobre todo en cachorros, lo que la convierte en una amenaza constante para la tenencia y crianza de perros. Lo anterior, hace necesario disponer de una técnica de diagnóstica eficiente, no sólo para instaurar un tratamiento adecuado en aquellos perros que se han enfermado, sino que también para evitar la diseminación de la enfermedad.

Entre los métodos de diagnóstico molecular, la PCR convencional se presenta como una buena alternativa de elección por su alta sensibilidad y alta especificidad, respecto de métodos tradicionales que se utilizan en clínica como por ejemplo la prueba de IC.

Uno de los hallazgos de este trabajo fue la diferencia entre los resultados de la PCR convencional y la IC. Mientras que la PCR detectó el 100% de las muestras como positivas, confirmado por la secuenciación de los amplicones obtenidos, la IC fue capaz de detectar solo el 41,7% de las muestras como positivas para CPV-2. Estos resultados, representados en la Figura 3, se condicen con diversos estudios que han determinado que los métodos tradicionales de diagnóstico, como la IC, poseen menor sensibilidad que los métodos moleculares como la PCR convencional utilizada en este trabajo (Desario *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 2009).

		PCR		Total
		+	-	
IC	+	5	0	5
	-	7	0	7
Total		12	0	12

Figura 3. Comparación de la PCR con la IC. La IC arroja una sensibilidad del 41,7% (5/12) respecto de la PCR convencional.

Algunos estudios que han comparado el desempeño de la IC frente a la PCR convencional, mostraron porcentajes de sensibilidad de la IC similares a los alcanzados por la PCR. Tinky

et al. (2015) y Mohyedini *et al.* (2013), describieron sensibilidades de 72,22% y 84% respectivamente para la IC y la recomiendan como herramienta de diagnóstico para su uso de rutina en la clínica veterinaria principalmente por su bajo costo, la rapidez con que entrega el resultado y su facilidad de aplicación. Sin embargo el consenso general es que la sensibilidad de las pruebas tradicionales de diagnóstico no supera el 50% respecto de los métodos moleculares en la detección de CPV-2 (Decaro y Buonavoglia, 2012). Los resultados de este trabajo van en línea con el consenso general.

Una posible explicación al resultado de este trabajo y a la variabilidad descrita en la sensibilidad en los diversos estudios que comparan IC con PCR convencional, que puede ser del 15,8% como la reportada por Schmitz *et al.* (2009) o del 84% reportado por Mohyedini *et al.* (2013), sería la existencia de varios factores que afectan la reacción antígeno anticuerpo en la que se basa la técnica de IC. Entre ellos, el principal factor es la alta concentración de antígeno viral que se requiere para producir una banda visible en el dispositivo de reacción. Otros factores como la presencia de agua, sangre u otros fluidos en la muestra, y la humedad ambiental, -a la que es altamente sensible la membrana de nitrocelulosa que posee el dispositivo-, pueden afectar la migración del complejo antígeno anticuerpo (Materlab, s.f.). Adicionalmente, la interpretación del resultado también depende de la habilidad del operador para detectar el cambio de color en el dispositivo de reacción (Kantere *et al.*, 2015). La presencia de anticuerpos en el lumen intestinal también disminuiría la cantidad de partículas virales disponibles en la muestra de deposiciones para realizar la prueba de IC (Decaro y Bounavoglia, 2012).

Por otra parte, la variante del virus presente en la muestra no afectaría la sensibilidad de la prueba diagnóstica, pues todas las variantes son detectadas por esta técnica (Decaro *et al.*, 2010). Todos los factores descritos podrían explicar la obtención de resultados falsos negativos con IC y la distinta intensidad en el cambio de color de las muestras que resultaron positivas.

A pesar de que la PCR en tiempo real tiene ventajas sobre la PCR convencional, como por ejemplo: requerir menos tiempo en el procesamiento de las muestras, ser más sensible y a la vez permitir la cuantificación del ADN viral de la muestra, la primera requiere de equipos más costosos, de reactivos más especializados, como la sonda que permite la cuantificación del producto amplificado (Chirinos-Arias, 2015), y de personal más capacitado, lo que la

convierte en una prueba que es poco aplicable a la práctica médico veterinaria de forma rutinaria (Desario *et al.*, 2005).

Respecto de los partidores utilizados en este trabajo cabe destacar que con éstos es posible detectar cualquiera de las tres variantes de CPV-2, debido a que amplifican un fragmento del gen que codifica las proteínas estructurales y que abarca los aminoácidos que otorgan las propiedades biológicas importantes del virus (Buonavoglia *et al.*, 2001). Si bien es posible el diseño de partidores específicos para cada variante del virus (Kaur *et al.*, 2016), la sola presencia del CPV-2, en cualquiera de sus variantes, es relevante en la práctica clínica, ya que no se ha observado una diferencia significativa en la forma de presentación de la enfermedad que producen las distintas variantes de CPV-2 (Wilson *et al.*, 2014). Lo anterior sumado al hecho de que no existe claridad sobre cuáles son las variantes que están circulando en el país y en qué proporción se encuentran éstas (Berríos y Durán, 2005).

La secuenciación nucleotídica permite confirmar lo anterior, pues la totalidad de las secuencias obtenidas se corresponden con distintas cepas de todas las variantes de CPV-2 que están descritas en la base de datos de BLAST™. Por lo tanto, la obtención de un resultado positivo de la PCR, que indicaría la presencia de cualquiera de las variantes de CPV-2, es suficiente para determinar la instauración de un tratamiento de soporte y la aplicación de medidas sanitarias que eviten la diseminación del virus.

Una de las desventajas de utilizar PCR convencional es la dificultad de diferenciar si el virus diseminado en las heces es a causa de la vacuna o una infección natural. Aunque se ha observado que un número mayor de amplicones después de una PCR podría ser indicativo de una infección natural, éste no es un criterio confiable debido a la sensibilidad de las pruebas moleculares (Meggiolaro *et al.*, 2017), por lo que un resultado positivo con esta técnica, debe ir en concomitancia con los signos clínicos del paciente. Se han estudiado nuevos métodos de diagnóstico para detectar la presencia de CPV-2 como la microbalanza de cristal de cuarzo (Kim *et al.*, 2015) y la Amplificación Isotérmica Mediada por *Loop* de ácidos nucleicos (Sun *et al.*, 2017), que destacan por su simpleza y rapidez, pero que aún están en etapa de estandarización. También se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real múltiple que permite además de la detección del virus y su cuantificación, la identificación de la variable presente (Kaur *et al.*, 2016).

Adicionalmente, las 12 secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas (Anexo 3) utilizando el programa BioEdit versión 7.2.6.1 (Hall, 1999) e ingresadas al programa MEGA

versión 7 (Kumar *et al.*, 2016) lo que permitió obtener el porcentaje de variabilidad entre los fragmentos de CPV-2, el cual, en promedio fue de 0,7%. Esto indicaría que ese segmento del genoma viral es muy conservado entre las distintas variantes del virus y explicaría el alto porcentaje de identidad nucleotídica obtenido con las distintas cepas de todas las variantes de CPV-2 que se encuentran en el BLAST™.

Igualmente, los partidores utilizados en este trabajo fueron ingresados en el programa BLAST™ y se constató que en teoría, pueden detectar FPV, generando un fragmento similar al producido con CPV-2, unos 600 pb (Anexo 4). En consecuencia la técnica implementada en este trabajo también podría ser aplicada para el diagnóstico de FPV. Esto se explicaría por la alta similitud que tiene el genoma de los parvovirus agrupados dentro de la especie *Protoparvovirus carnívoros 1* (Shackelton *et al.*, 2005), pues la diferencia en la proteína de la cápside VP2 del FPV y del CPV-2 original no son más de seis aminoácidos (Decaro y Buonavoglia, 2012). Esto deberá ser confirmado con estudios posteriores.

El manejo de una enfermedad y las medidas de control que se puedan tomar dependen de la correcta identificación del agente causal y según los resultados obtenidos en este trabajo, la PCR convencional es efectiva en la detección de CVP-2 y si bien su realización tiene un costo mayor en equipos, reactivos y personal, su sensibilidad y especificidad supera ampliamente a las pruebas rápidas utilizadas en forma rutinaria en la clínica veterinaria. Por lo tanto, mientras los métodos de diagnósticos que se encuentran actualmente en desarrollo no se conviertan en métodos estandarizados y confiables, la PCR convencional seguirá siendo un método de diagnóstico eficaz.

Es importante señalar también que el presente estudio es la primera aproximación molecular al CPV-2 que se lleva a cabo en el país. Restan estudios por realizar que permitan aportar al entendimiento de la evolución de CVP-2 y determinar cuáles son las variantes del virus que se encuentran circulando y su distribución en el país.

7. CONCLUSIÓN

La técnica de PCR convencional para la detección de CPV-2 fue implementada de forma exitosa. Adicionalmente, se demostró una vez más la superioridad en términos de sensibilidad de la PCR convencional respecto de la IC que se usa habitualmente en la práctica. Por lo anterior no se debe considerar un resultado negativo de IC como definitivo, debiendo ser confirmado por una prueba de PCR.

8. BIBLIOGRAFÍA

BERRIOS, P. 2001. Evolución y epidemiología de virus influenza, parvovirus canino tipo 2 y virus Nipah. [en línea]. Monografías de Medicina Veterinaria. 21(1):sp. <<http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/view/5025/4909>> [consulta: 25-06-2015]

BERRIOS, P.; DURAN, C. 2005. Principales enfermedades virales de los caninos. Situación en Chile. [en línea]. Monografías de Medicina Veterinaria. 2(2):68-93. <<http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET2-2005/html/Mepavet11.htm>> [consulta: 09-06-2017]

BLAST. 2017. Basic Local Aligmente Search Tool. [en línea] <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome> [consulta 18-07-2017].

BOUNAVOGLIA, C.; MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; CAVALLI, A.; BOUNAVOGLIA, D.; BOZZO, G.; ELIA, G.; DECARO, N.; CARMICHAEL, L. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. J. Gen. Virol. 82:3021-3025.

CARTER, J.; SAUNDERS, V. 2007. Parvoviruses (and other ssDNA viruses). **In:** Virology: principles and applications. John Wiley & Sons. West Sussex, Inglaterra. pp. 137-146.

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. 24:239-242.

CHIRINOS-ARIAS, M. 2015. Guía práctica de PCR en tiempo real. [en línea]. <<http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1417599>> [consulta: 21-008-2017]

COHN, L.; LANGDON, P. 2008. Viral Infection. **In:** Morga, R. (Ed). Handbook of Small Animal Practice. 5^{ta} ed. Saunders. St. Louis, USA. pp. 1087-1103.

DECARO, N.; BOUNAVOGLIA, C. 2012. Canine parvovirus – A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Vet. Microbiol. 155:1-12.

DECARO, N.; DESARIO, C.; BEALL, M.; CAVALLI, A.; CAMPOLO, M.; DIMARCO, A.; AMORISCO, F.; COLAIANNI, M.; BUONAVOGLIA, C. 2009. Detection of canine parvovirus type 2c by a commercially available in-house rapid test. Vet. J. 198:504-507.

DESARIO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; CAVALLI, A.; CIRONE, F.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; LORUSSO, E.; CAMERO, M.; BUNAVOGLIA, C. 2005. Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus?. J. Viral. Method. 126:179-185.

GOODARD, A.; LEISEWITZ, A. 2010. Canine Parvovirus. Vet. Clin. Small. Anim. 40:1041-1053.

- HALL, T.** 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- HOEZLER, K.; PARRISH, C.** 2010. The emergence of parvoviruses of carnivores. Vet. Res. 41:39.
- HUMM, K.; HUGHES, D.** 2009. Canine Parvovirus Infection. **In:** Silverstein, D.; Hopper, K. (Eds). Small Animal Critical Care Medicine. Saunders. St. Louis. USA. pp. 482-485.
- ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES.** 2014. Virus Taxonomy: 2014 Release. [en línea] <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> [consulta: 09-09-2015]
- KANTERE, M.; ATHANASIOU, L.; SPYROU, V.; KYRIAKIS, C.; KONTOS, V.; CHATZOPOULOS, D.; TSOKANA, C.; BILLINIS, C.** 2015. Diagnostic performance of a rapid in-clinic test for the detection of *Canine Parvovirus* under different storage conditions and vaccination status. J. Virol. Method. 215-216:52-55.
- KAUR, G.; CHANDRA, M.; DWIVEDI, P.; NARANG, D.** 2016. Multiplex real-time PCR for identification of canine parvovirus antigenic types. J. Virol. Method. 233(1-5).
- KIM, Y.; LIM, S.; CHOI, S.; CHO, I.; PARK, E.; AN, D.** 2015. A novel assay for detecting canine parvovirus using a quartz crystal microbalance biosensor. J. Virol. Method. 219:37-27.
- KUMAR, S.; STECHER, G. TAMURA, K.** 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33:1870-1874.
- LI, R.; HUMM, K.** 2015. Canine Parvovirus Infection. **In:** Silverstein, D.; Hopper, K. (Eds). Small Animal Critical Care Medicine. 2^{da} ed. Saunders. St. Louis. USA. pp. 509-513.
- MATERLAB.** s.f. –Test Virus Parvovirus Canino (C.P.V.). [en línea] <http://www.materlab.com/index.php?controller=attachment&id_attachment=8> [consulta: 10-07-2017]
- MARKOVICH, J.; STUCKER, K.; CARR, A.; HARBISON, C.; SCARLETT, J.; PARRISH, C.** 2012. Effects of canine parvovirus strain variations on diagnostic test results and clinical management of enteritis in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 241(1):66-72.
- MEGGIOLARO, M.; LY, A.; RYSNIK-STECK, B.; SILVA, C.; ZHANG, J.; HIGGINS, D.; MUSCATELLO, G.; NORRIS, J.; KROCKENBERGER, M.; ŠLAPETA, J.** 2017. MT-PCR panel detection of canine parvovirus (CPV-2): Vaccine and wild-type CPV-2 can be difficult to differentiate in canine diagnostic fecal samples. Moll. Cell. Probe. 33:20-23.
- MOHYEDINI, S.; JAMSHIDI, S.; RAFATI, S.; NIKBAKHT, G.; MALMASI, A.; TASLIMI, Y.; AKBAREIN, H.** 2013. Comparison of immunochromatographic rapid test with molecular method in diagnosis of canine parvovirus. Iran. J. Vet. Med. 7(1):57-61.
- NANDI, S.; KUMAR, M.** 2010. Canine Parvovirus: Current Perspective. Indian. J. Virol. 21(1):31-44.

PARRISH, C. 2011. Parvoviridae. **In:** Maclachlan, J.; Dubovi, E. (Eds). Fenner's Veterinary Virology. 4^{ta} ed. Academic Press. San Diego, USA. pp. 225-235.

PRATELLI, A.; CAVALLI, G.; NORMANNO, MG.; PALMA, G.; PASTORELLI, A.; BUONAVOGLIA, C.; MARTELLA, V. 2000. Immunization of pups with maternally derived antibodies to canine parvovirus (CPV) using a modified-live variant (CPV-2b). *J. Vet. Med.* 47:273–6.

SAG. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 2015. Medicamentos de uso Veterinario. [en línea] <http://medicamentos.sag.gob.cl/ConsultaUsrPublico/BusquedaMedicamentos_1.asp> [consulta: 28-06-2015]

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.* 102:379–384.

SHERDING, R. 2006. Intestinal Viruses. **In:** Bichard, S.; Sherding, R. (Eds). Saunders Manual of Small Animal Practice. 3^{ra} ed. Saunders. St. Louis, USA. pp. 158-167.

SCHMITZ, S.; COENEN, C.; KONING, M.; THIEL, H.; NEIGER, R. 2009. Comparison of three rapid commercial Canine parvovirus antigen detection test with electron microscopy y polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21:344-345.

SUN, Y.; YEN, C. TU, C. 2017. Immunocapture loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of canine parvovirus. *J. Virol. Method.* 249:94-101.

SYKES, J. 2013. Canine Parvovirus Infections and Other Viral Enteritides. **In:** Canine and Feline Infectious Diseases. Elsevier. St. Louis, USA. pp. 141-151.

TINKY, 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(4):523-526.

TRUYEN, U. 2006. Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines?. *Vet. Microbiol.* 115(1):9-13.

WILSON, S.; ILLAMBAS, J.; SIEDEK, E.; STIRLING, C.; THOMAS, A.; PLEVOVÁ, E.; STURE, G.; SALT, J. 2014. Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c. *Vaccine.* 32:5420-5424.

9. ANEXOS

Anexo 1. Ejemplo de secuencias que producen alineamientos significativos, en este caso con la muestra n° 12.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2a isolate Art3OlivosMay08 VP2 gene, partial cds	989	989	93%	0.0	99%	HQ413321.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate CPV016 capsid protein VP1 and capsid protein VP2 genes, partial cds	983	1086	93%	0.0	99%	KP881687.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate CPV015 capsid protein VP1 and capsid protein VP2 genes, partial cds	983	1086	93%	0.0	99%	KP881668.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate MAF.4 capsid protein VP1 and capsid protein VP2 genes, partial cds	983	1091	93%	0.0	99%	KP881653.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate MAF.3 capsid protein VP1 and capsid protein VP2 genes, partial cds	983	1091	93%	0.0	99%	KP881645.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate Simon VP2 protein gene, partial cds	983	983	93%	0.0	99%	KM236577.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2c isolate DogoArgentino2BB2008 VP2 gene, partial cds	983	983	93%	0.0	99%	HQ445619.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus isolate CPV-d Cornell #320 capsid protein genes VP1 and VP2, complete cds	983	1091	93%	0.0	99%	M23255.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus NS-1 protein and capsid proteins VP-1 and VP-2 genes, complete cds	983	1091	93%	0.0	99%	M38245.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2 strain 56/00 capsid protein VP2 (ORF2) gene, partial cds	981	981	92%	0.0	99%	AY380577.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2 isolate CPV2_773_08_HUN capsid protein VP2 gene, partial cds	979	979	92%	0.0	99%	EU815847.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus gene for capsid protein VP2	979	979	93%	0.0	99%	Z46651.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus strain CPV-N, complete cds	979	1440	93%	0.0	99%	M19296.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2b NS1, NS2, VP1, VP2 genes for nonstructural protein 1, nonstructural protein 2	977	1086	93%	0.0	99%	LC270891.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2 isolate 15-6585 capsid protein VP1/VP2 gene, partial cds	977	1086	93%	0.0	99%	KY242642.1
<input type="checkbox"/> Canine parvovirus 2 isolate 15-6583 capsid protein VP1/VP2 gene, partial cds	977	1086	93%	0.0	99%	KY242639.1

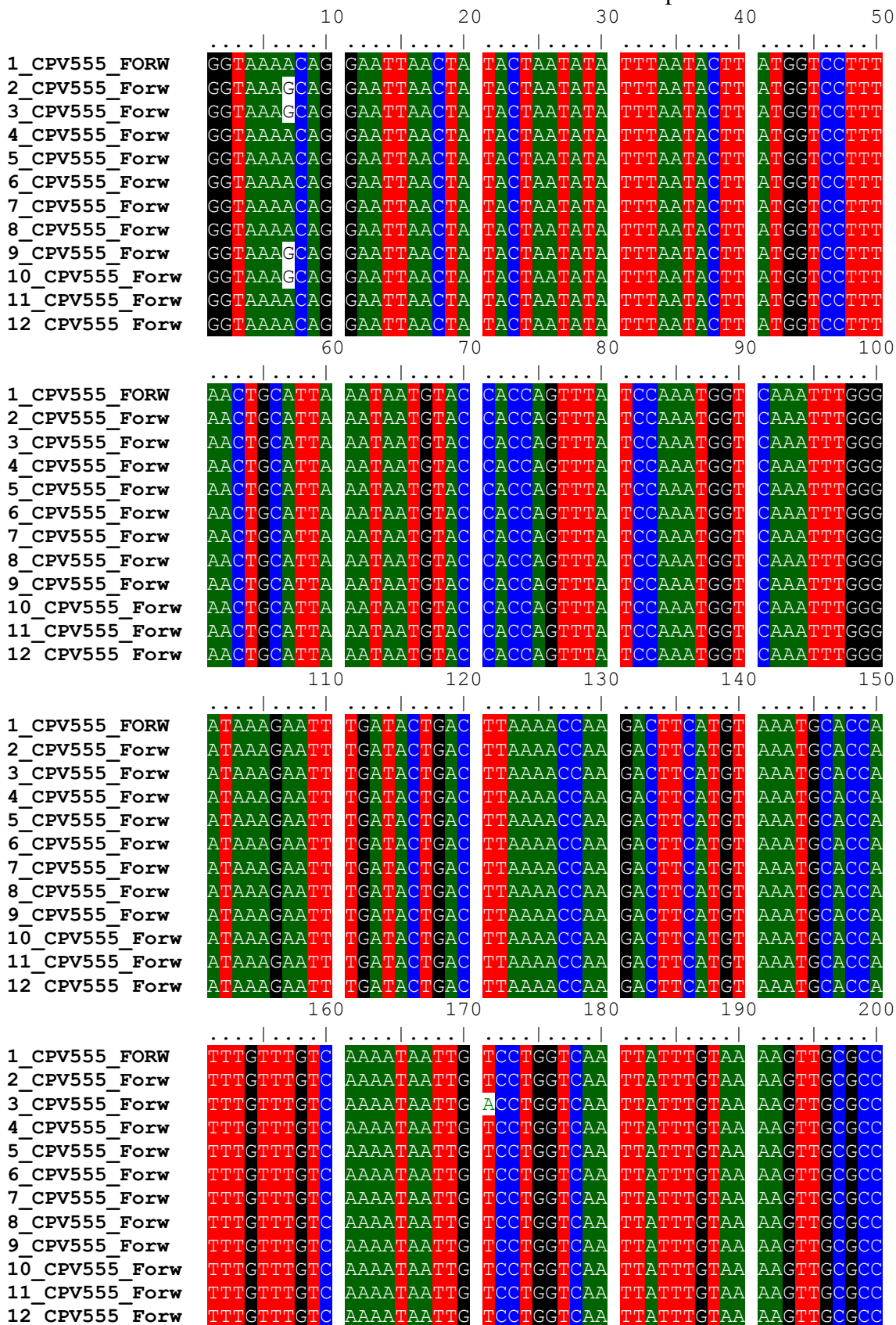
Anexo 2. Ejemplo de alineamiento de la muestra n° 12 con la secuencia HQ413321.1

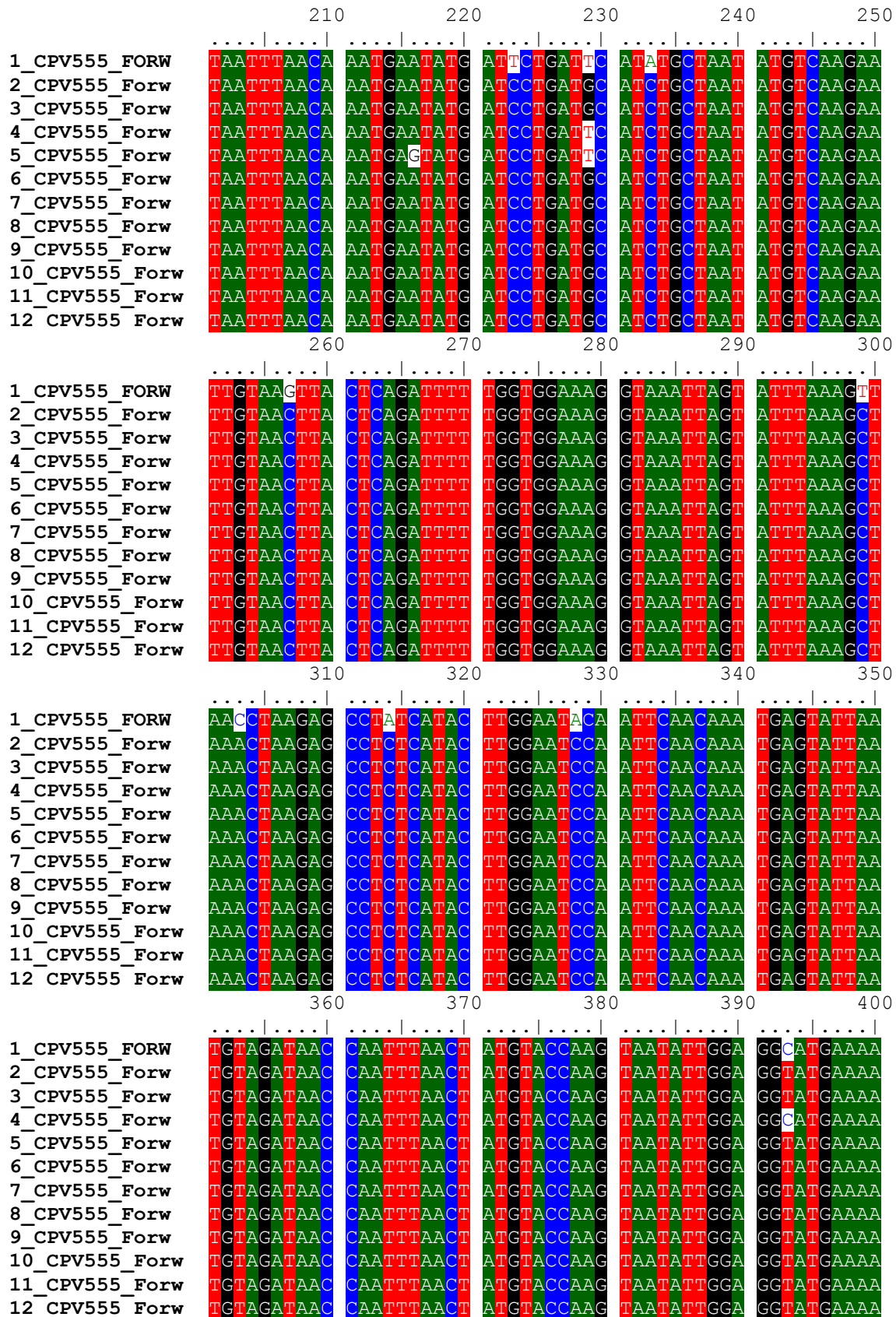
Canine parvovirus 2a isolate Art3OlivosMay08 VP2 gene, partial cds
 Sequence ID: [HQ413321.1](#) Length: 583 Number of Matches: 1

Range 1: 36 to 583 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
989 bits(535)	0.0	545/549(99%)	3/549(0%)	Plus/Plus
Query 5	ATT-ACITTAACCTTCCTGTAACAGAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGG			63
Sbjct 36	ATTAACITTAACCTTCCTGTAAC-GAATGATAATGTATTGCTACCAACAGATCCAATTGG			94
Query 64	AGGTAAAAACAGGAATTAACATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATT			123
Sbjct 95	AGGTAAAAACAGGAATTAACATACTAATATATTTAATACTTATGGTCCTTTAACTGCATT			154
Query 124	AAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGA			183
Sbjct 155	AAATAATGTACCACCAGTTTATCCAAATGGTCAAATTTGGGATAAAGAATTTGATACTGA			214
Query 184	CTTAAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAAATAATTGTCCTGGTCA			243
Sbjct 215	CTTAAAAACCAAGACTTCATGTAATGCACCATTTGTTTGTCAAAATAATTGTCCTGGTCA			274
Query 244	ATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAA			303
Sbjct 275	ATTATTTGTAAAAGTTGCGCCTAATTTAACAAATGAATATGATCCTGATGCATCTGCTAA			334
Query 304	TATGTCAAGAATTGTAACCTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGC			363
Sbjct 335	TATGTCAAGAATTGTAACCTACTCAGATTTTTGGTGGAAAGGTAAATTAGTATTTAAAGC			394
Query 364	TAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAA			423
Sbjct 395	TAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGGAAATCCAATTCAACAAATGAGTATTAATGTAGATAA			454
Query 424	CCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGATTTGAAAAATCTCA			483
Sbjct 455	CCAATTTAACTATGTACCAAGTAATATTGGAGGTATGAAAATTGATTTGAAAAATCTCA			514
Query 484	ACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATGTTTTTATGTTTATTACATATCA			543
Sbjct 515	ACTAGCACCTAGAAAATTATATTAACATACTTACTATGTTTTTATGTTTATTACATATCA			574
Query 544	CCTA-CACC 551			
Sbjct 575	ACTAGCACC 583			

Anexo 3. Alineación de las 12 secuencias nucleotídicas realizada por BioEdit.





		410	420	430	440	450

1_CPV555_FORW	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
2_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
3_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
4_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
5_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
6_CPV555_Forw	TTGTATTTGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
7_CPV555_Forw	TTGTATTTGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
8_CPV555_Forw	TTGTATTTGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
9_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
10_CPV555_Forw	TTGTATATGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
11_CPV555_Forw	TTGTATTTGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
12_CPV555_Forw	TTGTATTTGA	AAAACTCTCAA	CTAGCACCTA	GAAAAATTATA	TTAACATACT	
		460				
			
1_CPV555_FORW	TACTATGTTT	TTA				
2_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
3_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
4_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
5_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
6_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
7_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
8_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
9_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
10_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
11_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				
12_CPV555_Forw	TACTATGTTT	TTA				

Anexo 4.

- a) Alineación del partidor *555for* para CPV-2 con el genoma de FPV secuencia MF069447.1

Feline panleukopenia virus strain FPV/Raccoon/RC18/BC_2016, complete genome				
Sequence ID: MF069447.1 Length: 4528 Number of Matches: 1				
Range 1: 3751 to 3770 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
40.1 bits(20)	0.27	20/20(100%)	0/20(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	20		
Sbjct 3751	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	3770		

- b) Alineación del partidor *555rev* para CPV-2 con el genoma de FPV secuencia MF069447.1

Feline panleukopenia virus strain FPV/Raccoon/RC18/BC_2016, complete genome				
Sequence ID: MF069447.1 Length: 4528 Number of Matches: 1				
Range 1: 4309 to 4333 GenBank Graphics			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
50.1 bits(25)	7e-04	25/25(100%)	0/25(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	25		
Sbjct 4333	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	4309		