

Detección viral en cachorros con diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino (CPV)

Puentes, R.¹; Eliopulos, N.¹; Finger, P.²; Castro, C.²; Nunes, C.²; Furtado, A.¹; Franco, G.¹; Hübner, O. S.²

RESUMEN

Dentro de las causas infecciosas más importantes de gastroenteritis hemorrágica en caninos, se puede citar a la Parvovirus causada por Parvovirus canino (CPV). Es una enfermedad presente en el Uruguay que afecta principalmente a cachorros, produciendo cuadros de diarreas que pueden llevar a la muerte de los animales en pocos días. El diagnóstico de CPV se realiza principalmente de forma clínica, aunque existen técnicas de laboratorio como la Inmunocromatografía (IC) Hemaglutinación (HA), ELISA y PCR para el diagnóstico definitivo de la enfermedad. El objetivo de este trabajo fue confirmar la infección en casos agudos con diagnóstico presuntivo de CPV mediante tests de IC y HA. Un total de 26 muestras fecales fueron analizadas. La IC fue capaz de detectar 15/26 (58%) y la HA detectó 16/26 (61,5%). Las posibles causas de las diferencias encontradas entre la clínica y el resultado del laboratorio pueden deberse entre otras cosas a la sensibilidad de los tests utilizados, al momento de la toma de muestra o al diagnóstico clínico equivocado. En cualquier caso, los resultados de este trabajo advierten sobre las posibles diferencias que se pueden encontrar entre la clínica y las técnicas de IC y HA, debiéndose ser cauteloso en la interpretación de resultados obtenidos para esta enfermedad.

Palabras clave: Parvovirus Canino, diagnóstico, gastroenteritis.

SUMMARY

One of the main infectious causes of hemorrhagic gastroenteritis in canines, is Parvovirus caused by Canine Parvovirus (CPV). This is a disease in Uruguay which affects mainly puppies causing diarrheas that can lead to death of animals within a few days. The main method of diagnosis is the clinical, although there are laboratory techniques such as immunochromatography (IC), hemagglutination (HA), ELISA and PCR for the final diagnosis of the disease. The aim of this work was to confirm the infection in acute cases with presumptive diagnosis of CPV through IC and HA test. A total of 26 fecal samples were analyzed. IC was able to detect 15/26 (58%) and HA detected 16/26 (61,5%). The differences found between the clinic and the laboratory results may be, among other causes, due to the sensibility of the tests used, the time of sampling or a mistaken clinical diagnosis. As it is shown in the results derived from this study, differences between the clinical diagnosis and the IC and HA techniques can be found, therefore interpretation of results should be of concern when the diagnosis of this disease is made.

Keys words: Canine Parvovirus, diagnosis, gastroenteritis.

INTRODUCCIÓN

Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) es el agente etiológico de la Parvovirus canina, considerada la causa más importante de enteritis viral en cachorros (Kapil y col 2007). El virus infecta el epitelio intestinal, produciendo necrosis de las criptas y atrofia de las vellosidades. Los animales afectados, cursan generalmente con un cuadro de depresión, vómitos, anorexia y diarrea (gastroenteritis mucoide a hemorrágica), que puede llevarlos a la muerte en pocos días. La enfermedad es más común en cachorros no vacunados, pudiendo producir además miocarditis no supurativa con infiltrado celular depen-

diendo de la edad al momento de la infección (Nho y col 1997, Greene, 2007).

Luego de su aparición a fines de la década del 70, CPV-2 fue reemplazado por un nuevo tipo denominado CPV-2a, el cual junto a otra mutación (CPV-2b), se extendieron por todo el mundo. Más recientemente en el año 2000 emergió el genotipo CPV-2c (Hoelzer & Parrish 2010). Estas 3 variantes virales, son las detectadas en la actualidad en casos clínicos de Parvovirus canina en todo el mundo, habiendo desaparecido de la naturaleza el genotipo CPV-2, presente en la mayoría de las vacunas comerciales actuales. En el Uruguay, si bien existen

pocas investigaciones sobre Parvovirus Canina, es una enfermedad diagnosticada clínicamente desde hace varias décadas, siendo CPV-2c la variante más encontrada en la actualidad (Perez y col 2007).

Los antecedentes epidemiológicos y la sintomatología clínica, permiten la realización de un diagnóstico presuntivo de la enfermedad en la mayoría de los casos. Sin embargo existen otras causas de gastroenteritis en perros. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo debería ser realizado por alguna técnica disponible para la detección viral de CPV como la Hemaglutinación, Inmunocromatografía, ELISA o PCR.

¹Área de Inmunología – Dpto de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria - UdelaR, Montevideo, Uruguay.
Correo electrónico: rpuentes@adinet.com.uy

²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – Rio Grande do Sul – Brasil.

Recibido: 18/6/10 Aprobado: 25/10/10

El objetivo de este trabajo fue verificar la concordancia entre el diagnóstico presuntivo de Parvovirus canino realizado por clínicos veterinarios y el diagnóstico de laboratorio realizado por tests inmunodiagnósticos (Inmunocromatografía y Hemaglutinación).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se colectaron muestras de materia fecal de 26 casos de gastroenteritis en caninos, con diagnóstico clínico presuntivo de Parvovirus canino y en la fase aguda de la enfermedad.

Los animales eran en su totalidad cachorros (entre 1.5 y 6 meses de edad), de distintas razas (Galgo, Rottweiler, Ovejero Alemán, Dogo, Cimarrón, Labrador, Pittbul, Caniche y distintas cruas).

Las muestras provinieron de diversas zonas de Montevideo (Pocitos, Manga, Puntas de Manga, Sayago, Parque Rodó y Buceo), siendo tres de ellas del Departamento de Treinta y Tres.

En cuanto a la sanidad de los animales muestreados, 5 eran de animales vacunados contra la *Parvovirus canina* y 21 eran de animales no vacunados.

Test de Inmunocromatografía

Para la detección de antígenos virales, se utilizó un test de Inmunocromatografía comercial disponible en el mercado, con una sensibilidad de detección del 99% (comparado con Hemaglutinación) según información del fabricante. Las muestras fueron tomadas a partir de hisopados rectales o directamente de la materia fecal fresca y procesadas siguiendo el protocolo del kit utilizado.

Test de Hemaglutinación (HA)

Por otro lado, se utilizó otra técnica de referencia para el diagnóstico de Parvovirus canino. La técnica de HA fue realizada según descripta por Senda et al. (1988). Brevemente, se hicieron diluciones de la muestra de materia fecal desde pura hasta 1/64 en buffer BABS pH 9 (1.5 M NaCl, 0.5 M H₃BO₃, 1.0 M NaOH, 0.2% BSA) y se incubó con el mismo volumen de una solución conteniendo 0.5 % de eritrocitos frescos de cerdos diluidos en buffer VAD pH 6.0 (0.15 M NaCl, 0.3 M Na₂HPO₄, 0.15 M

NaH₂PO₄). La mezcla fue incubada a 4 °C y leída luego de 30 minutos. Como cepa control positivo se utilizó la cepa Cornell (CPV-2, ATCC - VR2017) y el título viral fue expresado como la mayor dilución que produce completa hemaglutinación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de muestras procesadas, 58% (15/26) fueron positivas para CPV por Inmunocromatografía y 61.5% (16/26) positivas por Hemaglutinación, no encontrándose diferencias significativas en los resultados según la técnica utilizada.

Además, las 15 muestras positivas por IC fueron positivas por HA, concordando así los resultados de ambos métodos.

En cuanto al sexo del animal, se encontró un mayor porcentaje de hembras positivas (70%) que de machos (46%) para cualquiera de los dos métodos diagnósticos utilizados.

En cuanto a la raza no se pudo analizar si había asociación entre la raza y el resultado para CPV, ya que en el muestro habían muchas razas representadas, pero con pocas muestras de cada una.

El diagnóstico clínico de Parvovirus canino es relativamente fácil de realizar, ya que la anamnesis y los antecedentes epidemiológicos, así como la sintomatología clínica, nos permiten suponer la presencia de este patógeno. Sin embargo, las muestras negativas analizadas en este experimento sumaron un total de 42% y 38.5% para IC y HA respectivamente, lo que nos hace pensar que la técnica utilizada no fue capaz de detectar la presencia del virus o el agente causal de la gastroenteritis no era Parvovirus canino en todos los casos.

Aunque Parvovirus es el principal agente infeccioso de gastroenteritis en cachorros, otros patógenos han sido encontrado en casos de diarrea, como por ejemplo Coronavirus canino, Distemper canino, Reovirus e *Isospora canis*. Además se han encontrado casos de co-infecciones de Parvovirus junto con otros agentes patógenos (Decaro y col 2007). En este experimento no se buscaron otros patógenos para hacer el diagnóstico diferencial, ya que el objetivo central fue verificar la concordancia entre el diagnóstico clínico presuntivo y el laboratorio a través de técnicas inmunodiagnósticas.

La confirmación de la causa del cuadro clínico es importante, sea infecciosa o no, ya que el tratamiento y el pronóstico de la enfermedad pueden variar. Si bien para Parvovirus Canino, al igual que para otras virosis, el tratamiento en la actualidad sigue siendo de sostén fundamentalmente, a base de fluidoterapia, vitamínicos y antibióticos, se debería hacer un diagnóstico definitivo para predecir el pronóstico del paciente, al igual que instaurar medidas de manejo adecuadas, evitando el contagio del virus a otros animales (Greene, 2007).

Parvovirus canino es un virus que ha recobrado importancia en el mundo, debido a las nuevas variantes virales emergentes en la actualidad. En ningún país donde se ha estudiado la enfermedad recientemente, se ha podido detectar el genotipo original (CPV-2) en muestras clínicas (Hoelzer y Parrish 2010). Esto es importante ya que la mayoría de las vacunas existentes son elaboradas con CPV-2 y la inmunidad cruzada entre los distintos genotipos es discutida (Truyen 2006).

De hecho en este trabajo, 3 de las muestras positivas, eran de animales con historia de vacunación. Estos datos concuerdan con otros autores, que han encontrado CPV-2c en animales vacunados (Perez y col 2007, Calderón y col 2009). En nuestro caso no podemos discutir acerca de la eficacia de las vacunas, ya que la información sobre la vacunación del animal puede ser relativa, al igual que el estado de la vacuna a la hora de la inyección en el animal.

Sin embargo, a pesar de que algunos autores afirman que las vacunas existentes protegen contra los nuevos genotipos virales (Spibey y col 2008), diversos autores han sugerido la revisión de las vacunas utilizadas en la actualidad, teniendo en cuenta la protección relativa existente contra las nuevas variantes virales (Prattelli y col 2001, Truyen 2006, Oshima y col., 2008).

Desde el punto de vista clínico, a pesar de que 11 y 10 de las muestras analizadas fueron negativas por IC y HA respectivamente, no podemos afirmar que el diagnóstico clínico fue equivocado ya que las técnicas disponibles actualmente no son capaces de detectar todos los casos positivos de CPV. El momento para la toma de la muestra es importante, debiéndose

considerar que la excreción viral ocurre principalmente en los primeros 8 y 12 días pos infección. Luego de ese período es probable que no se pueda detectar el virus (Decaro y col 2005). Las muestras analizadas en este experimento fueron tomadas en la fase aguda de la infección, lo que supone que deberían estar excretando el virus. Investigaciones previas, analizando 89 muestras de gastroenteritis, han logrado detectar CPV por Inmuno-cromatografía y Hemaglutinación en el 46% y 56% respectivamente, mientras que por Real Time PCR se detectó en el 82% de los casos (Desario y col 2005). Estos resultados son similares a los hallados en nuestro trabajo. Una posible hipótesis que podría explicar la menor sensibilidad encontrada en la IC y HA con relación a las de detección de DNA viral (ej. PCR), se refiere al hecho de que los anticuerpos a nivel de mucosas logra-

rían neutralizar al virus, impidiendo la detección de antígenos virales por estos dos métodos (Desario y col 2005).

Por lo tanto, si bien la Real Time PCR es una técnica más sensible y capaz de reducir las posibles muestras falsas negativas, en este trabajo utilizamos técnicas más accesibles y de uso frecuente, por el hecho de que son herramientas sencillas, rápidas y de costo relativamente bajo, pudiendo ser realizadas por clínicos veterinarios.

Los resultados de este trabajo, plantean la discusión acerca de la utilidad de las técnicas Inmuno-cromatografía y/o Hemaglutinación, para el diagnóstico de la Parvovirus canina. Por un lado, es probable que en algunos de los animales diagnosticados clínicamente la causa de gastroenteritis hemorrágica no fuera CPV. Por otro lado, si bien no se utilizó una

técnica más sensible para minimizar los posibles falsos negativos, existen casos clínicos de CPV que no son detectados por IC y/o HA (Desario y col 2005), lo que se traduce en una alerta para los veterinarios frente a un resultado negativo por cualquiera de los métodos inmunodiagnósticos utilizado en este experimento (IC o HA).

Agradecimientos

Al Dr. Mario Quintero y a su equipo de «Veterinario en Casa» (Puntas de Manga), Dr. Gustavo Fernández (Veterinaria «Don Bicho» – Treinta y Tres), Dr. Santiago Camacho (Veterinaria «San Roque» - Sayago), Dr. Arturo Juambeltz (Veterinaria «Pets» - Pocitos) y al Hospital de la Facultad de Veterinaria (UdelaR) por colaboraren con el envío de muestras de casos clínicos.

Referencias Bibliográficas

- Calderón, M.; Mattiona, N.; Bucafuscob, D.; Fogel, F.; Remorinid, P.; La Torrea, J.** (2009). Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of Virological Methods* 159. 141–145.
- Decaro, N.; Desario, C.; Campolo, M.; Elia, G.; Martella, V.; Ricci, D.; Lorusso, E.; Buonavoglia, C.** (2005). Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest* 17: 133–138.
- Decaro, N.; Desario, C.; Elia, G.; Campolo, M.; Lorusso, A.; Mari, V.; Martella, V.; Buonavoglia, C.** (2007). Occurrence of severe gastroenteritis in pups after *Canine parvovirus*. Vaccine administration: A clinical and laboratory diagnostic dilemma. *Vaccine*, 25:1161–1166.
- 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? *Journal of Virological Methods*. 126, 179–185.
- Greene.** (2007). Enfermedades infecciosas del perro y el gato. 3ª edición. Intermédica.
- Hoelzer, K. and Parrish, C.** (2010) The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet. Res.* 41:39.
- Kapil, S.; Cooper, E.; Lamm, C.; Murray, B.; Rezabek, G.; Larry Johnston, L.; Campbell, G.; Johnson, B.** (2007). *Canine parvovirus* Types 2c and 2b Circulating in North American Dogs in 2006 and 2007. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(12): 4044–4047.
- Nho, W.; Sur, J.; Doster, A.; Kim, S.** (1997). Detection of *Canine parvovirus* in naturally infected dogs with enteritis and myocarditis by in situ hybridization. *J Vet Diagn Invest* 9:255-260.
- Oshima, T.; Hisaka, M.; Kawakami, K.; Kishi, M.; Tohya, Y.; Mochizuki, M.** (2008). Chronological Analysis of *Canine parvovirus* Type 2 Isolates in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 70(8): 769–775.
- Perez R.; Francia L.; Romero V.; Maya L.; Lopez I.; Hernandez M.** (2007). First detection of *Canine parvovirus* type 2c in South America, *Vet. Microbiol.* 124:147–152.
- Pratelli, A.; Cavalli, A.; Martella, V.; Tempesta, M.; Decaro, N.; Carmichael, L.; Buonavoglia, C.** (2001). *Canine parvovirus* (CPV) vaccination: Comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8: 612–615.
- Spibey, N.; Greenwood, N.; Sutton, D.; Chalmers, W.; Tarpey, I.** (2008). *Canine parvovirus* type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus. *Vet. Microbiol.* 128(1-2), 48-55.
- Truyen, U.** (2006). Evolution of *Canine parvovirus*: a need for new vaccines? *Vet. Microbiol.* 117, 9-13.