

Diagnóstico del parvovirus canino-2 (pvc-2) por inmunohistoquímica en perros domésticos

Immunohistochemical diagnosis of canine parvovirus-2 (cpv-2) in domestic dogs

Rocío Angélica Ruiz Romero* Eugenia Candanosa Aranda*
Félix Sánchez Godoy* Andrés Ducoing Watty**

Abstract

Thirty cases of small intestine with suggestive histopathological lesions of canine parvovirus were evaluated by avidin-biotin-peroxidase complex using a monoclonal antibody developed in mouse against canine parvovirus-2 (CPV-2). Positive immunohistochemical reactions were obtained in 76.67% (23 cases) of processed samples. The lymphocytes, macrophages and necrotic cells of the intestinal crypts were the cells that most frequently showed immunopositivity. The intestinal histopathological lesions which were associated to CPV-2 were the regeneration cells in the intestinal crypts by the evidence of parvoviral antigen. The immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen is a useful and reliable method for confirming an etiologic diagnosis in cases with suggestive intestinal lesions of this disease.

Key words: CANINE PARVOVIRUS, IMMUNOHISTOCHEMISTRY, DOGS.

Resumen

Se evaluaron 30 casos de intestino delgado con lesiones histopatológicas que sugerían parvovirus canino por el complejo avidina-biotina-peroxidasa, con base en el uso de un anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón contra parvovirus canino-2 (PVC-2). Se obtuvieron reacciones inmunohistoquímicas positivas en 76.67% (23 casos) de las muestras procesadas. Los linfocitos, macrófagos y células necróticas de las criptas intestinales representaron las células que con frecuencia presentaron inmunopositividad. Las lesiones intestinales histopatológicas que se asociaron a PVC-2, mediante la evidencia del antígeno parvoviral, fueron las células de regeneración en las criptas intestinales. La demostración inmunohistoquímica del antígeno de PVC-2 constituye un método útil y confiable para confirmar el diagnóstico etiológico en casos con lesiones intestinales sugerentes de dicha enfermedad.

Palabras clave: PARVOVIRUS CANINO, IMMUNOHISTOQUÍMICA, PERROS.

Recibido el 14 de abril de 2006 y aceptado el 12 de septiembre de 2006.

*Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

**Departamento de Producción Animal: Rumiantes, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Nota: El presente trabajo forma parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

Correspondencia: Eugenia Candanosa Aranda, correo electrónico: ieca@servidor.unam.mx

Introduction

Canine parvovirus is one of the most important causes of death in puppies. This disease is worldwide distributed and is closely related to feline panleucopenia virus (FPV). Viral canine gastroenteritis became very important since 1978 after the appearing of canine parvovirus type 2 (PVC-2).¹⁻⁵ This one was identified by Eugster y Nairn² in North America as the cause of a new illness in dogs and other members of the Canidae family, like wolves, coyotes, south-american dogs and Asian raccoons. It is thought that this virus developed as a mutation of the feline panleucopenia virus.³

In Mexico, since June 1980, the reception of dead dogs with an acute gastroenteric clinical history, which had been mostly younger than a year old, became frequent. Over their *post mortem* study, similar gastroenteric lesions to the ones from feline panleucopenia were found.^{6,7} Small animal practitioners in Mexico confirmed the presence of a highly contagious disease with different characteristics to well known enteritis.⁶

In this context, several electronical microscopy studies were performed during 1981. These confirmed the presence of spherical viral particles 22 nm in diameter on samples of intestinal mucosa compatible with canine parvovirus.⁷ In 1982, 193 non-vaccinated dog serum samples were examined. This samples came from Mexico City and some other regions of the country and had been collected between April and December 1981, to determine the presence of immunoglobulin against canine parvovirus by a hemagglutination inhibition test in which 17.04% were positive cases.⁸ In 2003, the first report of CPV-2 detection was presented based on the polymerase chain reaction technique (PCR), as well as on the isolation of this virus from samples of feces of animals with a clinical gastro enteric history.⁹

Immunohistochemistry is important for the histopathological diagnosis of diverse diseases and presents a useful technique able to detect antigens in tissue sections with the use of labeled specific antibodies, making the sites of union microscopically visible; it is used in the diagnosis of infectious, autoimmune and neoplastic diseases. The specificity of the antigen-antibody interaction to locate a particular marker associated to a tissue- shows its importance, for example: a hormone, an enzyme, a protein or a virus in a tissue section. Besides, this sensitive and specific technique provides an excellent morphological detail, since the samples can be counterstained and examined under light microscopy. The development of antibodies to resistant epitopes at tissue fixation and the availability of a highly sensitive detection

Introducción

El parvovirus canino es una de las causas más importantes que provocan mortalidad en cachorros. Esta patología de distribución mundial está estrechamente relacionada con el virus de la panleucopenia felina (VPF). Las gastroenteritis virales en perros cobraron gran importancia a partir de 1978 con la aparición del parvovirus canino tipo 2 (PVC-2).¹⁻⁵ Este último fue identificado por Eugster y Nairn² en Norteamérica como la causa de una enfermedad nueva en los perros y en otros miembros de la familia Canidae, como lobos, coyotes, perros sudamericanos y mapacheros asiáticos. Se piensa que este virus surgió como una mutación del virus de la panleucopenia felina.³

En México, a partir de junio de 1980, fue frecuente recibir cadáveres de perros con historia clínica de cuadro gastroentérico agudo, la mayoría de los animales eran menores de un año. Durante la necropsia de éstos se encontraron lesiones gastroentéricas similares a las de panleucopenia felina.^{6,7} Los médicos veterinarios zootecnistas dedicados a la clínica en pequeñas especies en México, confirmaron la presencia de una enfermedad altamente contagiosa con características diferentes a los cuadros gastroentéricos conocidos.⁶

En este contexto, durante 1981 se realizaron estudios de microscopía electrónica, con ello se confirmó la presencia de partículas virales de 22 nm de diámetro, esféricas, en muestras de mucosa intestinal compatibles con parvovirus canino.⁷ En 1982 se examinaron 193 sueros de perros que no fueron vacunados contra parvovirus canino, procedían de la ciudad de México y de algunos estados del país; aquéllos se recolectaron entre abril y diciembre de 1981 para determinar la presencia de inmunoglobulinas contra el parvovirus canino por medio de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, en ésta se observó 17.04% de casos positivos.⁸ En 2003 se presentó el primer informe de detección del PVC-2 con base en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como en el aislamiento del virus a partir de muestras de heces de animales con cuadro clínico de gastroenteritis.⁹

La inmunohistoquímica es importante en el diagnóstico histopatológico de diversas enfermedades, pues constituye una técnica útil que detecta antígenos en secciones de tejidos con el uso de anticuerpos específicos marcados, de tal forma que los sitios de unión sean visibles microscópicamente; es utilizada para el diagnóstico de enfermedades infecciosas, autoinmunes y neoplásicas. Su utilidad radica en la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo para localizar un marcador particular asociado con un tejido; por ejemplo, una hormona, enzima, pro-

system, make immunohistochemistry (IHC) a friendly and useful tool for pathologists.¹⁰

In a study carried out in the Department of Pathology of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National Autonomous University of Mexico (FMVZ-UNAM) during 1998-2003, 1 654 dogs were received for *post mortem* study from which 11% (190 cases) showed lesions suggesting CPV-2 infection.¹¹ Commonly viral enteritis are diagnosed on the basis of sheer morphology of microscopic changes. However, this is not specific for the diagnosis of this disease. Therefore, due to the need of safer methods for diagnosis, immunohistochemistry is suggested for the identification of CPV-2 in dogs with indicative intestinal lesions of the virus.

The objective of this research was to use immunohistochemistry for the diagnosis of PVC-2 in samples of intestines obtained from *post-mortem* studies of dogs, with suggestive intestinal lesions of this disease, consequently to perform the immunohistochemical evaluation according to the histological location and grade of immuno-positivity.

Material and methods

This work corresponds to a longitudinal and experimental, retrospective and prospective descriptive study. Cases from the Department of Pathology diagnosis service (FMVZ-UNAM) were used.

For the immunohistochemical research, 30 cases from 2002 to 2004 of *post-mortem* studies of well-preserved dead dogs younger than a year old which presented suggestive lesions of CPV-2 in intestinal tissue were picked. The sections of the small intestine were fixed for 24 hours in neutral formalin at 10% and processed with the usual method of paraffin inclusion.¹² Then 5 µm tissue sections were cut and stained under the standard hematoxylin-eosine¹³ staining for microscopic observation.

The intestinal lesions were evaluated in all four histological layers as follows: *a) mucosa*; atrophy of villi, fusion of villi, necrosis of crypts, presence of regeneration or proclastic cells, non suppurative inflammation; *b) Submucosa*, muscular and serosa congestion, edema, hemorrhages and inflammatory infiltration.

According to the lesion's degree, these were classified in slight (a third of tissue), moderate (when two thirds of tissue are included) and severe (when the whole tissue is affected). For low grade atrophy of villi, this technique was used when the atrophy appeared at the tip of villi; the severe degree corresponded to atrophy involving the crypts.

To identify the viral antigen, the standardization of the strepto-avidin-biotin-peroxidase immunohis-

teína o virus en una sección de tejido. Esta técnica es sensible y específica, permite un excelente detalle morfológico; las muestras pueden ser contrateñidas y examinadas con un microscopio de luz. El desarrollo de anticuerpos para epitopos resistentes a la fijación de tejidos y la disponibilidad de un sistema de detección altamente sensible hacen de la inmunohistoquímica una herramienta práctica para la patología.¹⁰

En un estudio realizado durante 1998-2003 en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), donde se recibieron 1 654 perros para su estudio *post mortem*, se observó que 11% (190) de ellos presentaban lesiones sugerentes de PVC-2.¹¹ Es común que el diagnóstico de las enteritis virales se base en la morfología pura de las lesiones observadas por microscopía de luz; sin embargo, éste no es específico para el diagnóstico de la entidad. Ante la necesidad de otros métodos que dieran mayor seguridad en el diagnóstico, se plantea el uso de la inmunohistoquímica para la identificación del PVC-2 en perros con lesiones intestinales sugerentes de este virus.

El objetivo de este trabajo fue aplicar la técnica de inmunohistoquímica para efectuar el diagnóstico de PVC-2 en muestras de intestinos obtenidos en necropsias de perros con lesiones sugerentes de esa enfermedad, y de esta manera realizar la evaluación inmunohistoquímica según sus grados de inmunopositividad y localización histológica.

Material y métodos

Esta investigación corresponde a un estudio descriptivo, retrospectivo y prospectivo, longitudinal y experimental. Se utilizaron casos del acervo del servicio de diagnóstico del Departamento de Patología (FMVZ-UNAM).

Para el estudio inmunohistoquímico se seleccionaron 30 casos de necropsias de perros menores de un año de edad con lesiones sugerentes a PVC-2 en tejido intestinal, en buen estado de conservación, tomadas de 2002 a 2004, las secciones de intestino delgado habían sido fijadas durante 24 horas en formalina neutra al 10% y procesadas mediante el método habitual de inclusión en parafina.¹² Se realizaron cortes de 5 µm y posteriormente se tiñeron con la tinción de rutina de hematoxilina-eosina¹³ para su observación microscópica.

Las lesiones intestinales se evaluaron en las cuatro capas histológicas de la siguiente forma: *a) mucosa*: atrofia de vellosidades, fusión de vellosidades, necrosis de criptas, presencia de células de regeneración o proclásticas, infiltrado inflamatorio no supurativo;

tochemical technique was done, described by Ruiz *et al.*¹¹ A monoclonal antibody from a canine* murine antiparvovirus origin under a dilution at 1/300 was set. An anti-mouse secondary antibody** from caprine origin was used, labeled with biotin and applying 50 µL to the tissue.

As positive control, a small intestine section was used, which resulted positive for this virus after the immunohistochemical technique. Two negative controls were used; the first one corresponded to a section of the positive tissue where the primary antibody was changed for smoothed phosphates solution (PBS); for the second control, a small intestine section from a dog without CPV-2 lesions was used, to which a primary antibody was applied.

From samples of small intestine included in paraffin, 5 µm cuts were done from each case. Previously treated slides with adhesive solution Poli-L-Lysina*** at 1% to avoid a detachment of the sections during the process. Paraffin was taken off from the sections on a stove at 60°C for two hours. Immediately, the tissues were immersed in xilol and were washed twice for 20 minutes in each case and then the same procedure was followed with acetone. To conclude, a new wash was done twice for 5 minutes at room temperature. For re-hydration of tissues, the slides were immersed in ethylic alcohol at different concentrations: 100%, 96%, 80% and 50%. These were washed twice for 5 minutes for each concentration of alcohol and finally were washed in distilled water three times for 5 minutes at room temperature.

To inhibit the activity of the endogen peroxidase, the sections of the organs were treated with hydrogen peroxide and absolute methanol in a 1:8 relation. Two incubations were carried out for 30 minutes each. Subsequently, three washes of 5 minutes each at room temperature^{12,14} were done in a smoothed phosphates solution (PBS) con pH de 7.2.^{12,14}

For the recovering of antigens, the tissues in PBS were put in physical treatment (heat) in a microwave oven* at medium level over 4 minutes. Immediately after, the hot PBS was changed for cold PBS to stop the reaction of the recovering.

With the purpose of blocking the endogen avidin and the endogen biotin of the tissues, a regular blocker was used with two solutions.** The first solution was targeted against the avidin and it consisted in the applying of 2 drops (50 µL/drop) of avidin solution over the tissues, incubated for 45 minutes in a moisture room at average temperature (20-25°C), and then three washes with PBS for 5 minutes each were done. For the second solution, set against the biotin, two drops of biotin solution were applied for 45 minutes in a moisture room at average temperature and

b) *submucosa*, muscular y serosa: congestión, edema, hemorragias e infiltrado inflamatorio.

Según el grado de la lesión se clasificaron en leve (abarca un tercio del tejido), moderada (cuando incluye dos tercios del tejido) y grave (que compromete todo el tejido). Para el caso de la atrofia de vellosidades en grado leve, esta técnica se empleó cuando la atrofia se presentaba en la punta de las vellosidades; el grado grave correspondió a la atrofia que abarcaba hasta las criptas.

Con el fin de identificar el antígeno viral, se realizó la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica estreptoavidina-biotina-peroxidasa, descrita por Ruiz *et al.*¹¹ Se utilizó un anticuerpo monoclonal de origen murino antiparvovirus canino* a una dilución de 1/300. Se empleó un anticuerpo secundario antirratón** de origen caprino marcado con biotina, aplicando 50 µL en el tejido.

Como testigo positivo se utilizó una sección de intestino delgado, que resultó positivo para este virus a través de la técnica de inmunohistoquímica. Se emplearon dos testigos negativos; el primero corresponde a una sección del tejido positivo al cual se le cambió el anticuerpo primario por PBS; para el segundo se utilizó una sección de intestino delgado de un perro sin lesiones de PVC-2, al que se le aplicó anticuerpo primario.

De las muestras de intestino delgado incluidas en parafina se realizaron cortes de 5 µm de grosor de cada uno de los casos, luego se colocaron en portaobjetos tratados previamente con la solución adhesiva Poli-L-Lysina*** al 1% para evitar el desprendimiento de las secciones durante el proceso. Se retiró la parafina de las secciones en una estufa a 60°C durante dos horas. Enseguida los tejidos se sumergieron inmediatamente en xilol, y se lavaron dos veces durante 20 minutos en cada ocasión y después se realizó el mismo procedimiento en acetona, y se concluyó con un nuevo lavado durante dos veces por cinco minutos a temperatura ambiente. Para la rehidratación de los tejidos las laminillas se sumergieron en alcohol etílico a diferentes concentraciones: 100%, 96%, 80% y 50%; se lavaron dos veces durante cinco minutos por cada concentración de alcohol, y finalmente se sumergieron en agua destilada para lavarlas tres veces por cinco minutos a temperatura ambiente.

Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones de los órganos se trataron con peróxido de hidrógeno y metanol absoluto en relación 1:8, y se realizaron dos incubaciones de 30 minu-

*Biodesign International, núm. catálogo: C86004M, 60 Industrial Park Road Saco, Maine 04072, Estados Unidos de América.

**Zymed Laboratorios Inc. 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

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

then three washes with PBS were done for 5 minutes each.

For the blocking of nonspecific adherence to proteins coming from the secondary antibody, two drops of non-immune goat serum† were dropped over the tissues and were incubated for an hour in a moisture chamber at room temperature.¹²

Next, the primary antibody was applied. It was diluted in PBS at 1/300 µL, homogenized with a mixer.‡ From the primary antibody, two drops were taken for each slide and were let incubate for about 12 hours in a moisture chamber at room temperature. For the first negative control, the primary antibody for PBS was substituted and for the second one the primary antibody was used with the same dilution. After the incubation, the tissues were washed three times with PBS for 5 minutes each.

The secondary antimouse antibody of caprine origin labeled with biotin was used. Two drops were dropped to each tissue and were incubated for 90 minutes in a moisture chamber at room temperature. To eliminate the excess of secondary antibody, three washes with PBS for 5 minutes each were done.

Two drops were dropped to each tissue and were left acting for 30 minutes in a moisture chamber and three washes with PBS were done for 5 minutes each. For the preparation of the chromogen, a drop of each one of the reagents which had been included in the commercial equipment* (buffer concentrate substrate, diaminobenzidin chromogen and 0.6% of hydrogen peroxide) was added, at 1 mL of distilled water, homogenized with a mixer. Fifty µL was applied on each slide for 3 to 6 minutes depending on room temperature. Soon after, a mild wash with distilled water was done on each slide and put in distilled water again to stop the reaction of the developing. The sections were contrasted with Meyer hematoxylin by putting two drops of it on each sample, were let rest for 4 minutes and washed with distilled water for 5 minutes. Subsequently the slides were immersed in PBS for 30 seconds to obtain a slight blue counterstaining over the tissue and were put back into distilled water.

Finally, slides were covered with coverglasses and were sealed with synthetic resin. A positive reaction was determined when observing intracellular granules stained in ochre.

The evaluation was done from the immuno-positivity of the mucosa of each cases through the visualization of ten random fields with the objective 40X; for this purpose, the Motik Images Advanced 3.1 program for Windows was used. The positivity was graded in three states according to the intensity of the reaction. Grade 1 was given to slight immuno-positivity in light

tos cada una. Posteriormente se hicieron lavados con solución amortiguada de fosfatos (PBS) con pH de 7.2, tres lavados de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente.^{12,14}

Para la recuperación de antígenos, los tejidos sumergidos en PBS se sometieron a tratamiento físico (calor) en un horno de microondas* a nivel medio durante cuatro minutos. Inmediatamente se cambió el PBS caliente por PBS frío para detener la reacción de recuperación.**

Con el propósito de bloquear la avidina y biotina endógenas de los tejidos, se utilizó un bloqueador de tipo comercial con dos soluciones.*** La primera solución estuvo dirigida en contra de la avidina y consistió en aplicar 2 gotas (50 µL/gota) de solución de avidina sobre los tejidos, incubadas por 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C), y después se realizaron tres lavados con PBS de cinco minutos cada uno. De la segunda solución, dirigida en contra de la biotina, se aplicaron dos gotas de solución de biotina por 45 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente y luego se realizaron tres lavados con PBS de cinco minutos cada uno.

Para bloquear la adherencia no específica a proteínas por parte del anticuerpo secundario, se utilizó suero de cabra no inmune,† del cual se aplicaron dos gotas sobre los tejidos, dejándolos incubar durante una hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.¹²

Se procedió a la aplicación del anticuerpo primario, diluido en PBS a una dilución de 1/300 µL, homogeneizado con un mezclador.‡ Del anticuerpo primario se aplicaron dos gotas en cada laminilla y se dejaron incubar aproximadamente 12 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para el primer testigo negativo se sustituyó el anticuerpo primario por PBS, y para el segundo se aplicó el anticuerpo primario con la misma dilución, después de la incubación, los tejidos se lavaron tres veces con PBS por cinco minutos cada uno.

Se aplicó el anticuerpo secundario antirratón de origen caprino marcado con biotina. Se aplicaron dos gotas a cada tejido y se incubaron durante 90 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se realizaron tres lavados con PBS de cinco minutos cada uno.

*Sanyo, modelo EMA-108s, Estados Unidos de América.

**Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508 St. Louis Missouri, 63178-0016, Estados Unidos de América.

***Endogenous Avidin/Biotin Blocking Kit, Zyned Laboratories Inc. 561, San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

†Zymed Laboratories Inc. 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

‡Vortex Thermolyne Inc. 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

ochre; grade 2 to moderate in ochre color and grade 3 to intense in dark ochre.

For statistical analysis the software JMP 5.1* was employed. Also descriptive statistics, contingency tables, and sensitivity and specificity for diagnostic techniques by the Galen method.¹⁵

Results

From the 30 evaluated cases with immunohistochemistry for CPV-2, only 23 results were positive (76.67%). Over the evaluation of the histopathological lesions of the 23 immunopositive cases to CPV-2, the lesions which showed more frequently on the intestinal mucosa were: necrosis of crypt, non-suppurative inflammatory infiltration, atrophy of villi and fusion, with 95.65% each one (22 cases each one), and regeneration cells in 73.91% (17 cases). In the submucosa 82.61% (19 cases) edema was observed. In the muscular layer the most frequent lesion was edema with 82.61% (19 cases). Finally, in the serosa also edema was also frequent with 56.52% (13 cases) (Table 1). Immunopositivity to CPV-2 occurred in variable grades. It mainly showed in epithelial cells of intestinal crypts, of regeneration, necrotic and mononuclear inflammatory ones in the lamina propria (Figures 1-4). The distribution of the immunopositivity observed by IHC of the 23 positive cases to CPV was mainly seen in necrotic cells, 91.30% (21 cases), mononuclear inflammatory cells, 86.96% (20 cases), regeneration cells, 78.26% (18 cases) and epithelial cells, 73.91% (17 cases) (Table 2). The presence of regeneration cells in the intestinal crypts, which is observed in the intestinal mucosa, is a good indicator of the presence of CPV-2, with sensitivity of 79% and specificity of 33%. In the case of villi atrophy and fusion, as well as in necrotic cells 96% of sensitivity was obtained, but none specificity. The lesions associated to CPV-2 that showed low sensitivity and specificity were: crypt distension, suppurative inflammatory infiltration, hemorrhage, edema and the presence of bacteria colonies. It was observed that females were more affected at 65.22% (15 cases); 100% of the cases correspond to younger than six months old dogs and the season with the highest morbidity was winter with 52.17% (12 cases), while only one case occurred in spring (4.35%).

Discussion

In the small intestine, the crypt epithelial cells mature and migrate from the germinal epithelium to the tip of villi. Once there, the epithelial cells acquire their capacity of absorption and help in the assimilation of nutrients. The CPV-2 infects the germinal epithelium

Se aplicaron dos gotas a cada tejido, se dejó actuar durante 30 minutos en cámara húmeda y se realizaron tres lavados con PBS de cinco minutos cada uno.

Para la preparación del cromógeno se agregó una gota de cada uno de los reactivos incluidos en el equipo comercial* (sustrato de amortiguador concentrado, el cromógeno diaminobenzidina y 0.6% de peróxido de hidrógeno), a 1 mL de agua destilada homogeneizados con un mezclador. A cada laminilla se aplicaron 50 µL, y se le dio de tres a seis minutos, dependiendo de la temperatura ambiente. Enseguida se realizó un lavado suave con agua destilada sobre cada laminilla, para detener la reacción del revelado, en seguida se sumergieron nuevamente en agua destilada. Las secciones se contrastaron con hematoxilina de Meyer, aplicando dos gotas en cada muestra y se les dejó reposar por cuatro minutos, después se lavaron en agua destilada durante cinco minutos. Posteriormente, las laminillas se sumergieron en PBS por 30 segundos para obtener una contraindicación azul tenue sobre el tejido y se regresaron al agua destilada.

Por último, las laminillas se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con resina sintética. Una reacción positiva se determinó al observar gránulos intracelulares teñidos de color ocre.

Se realizó la evaluación de la inmunopositivity de la mucosa de cada caso a través de la visualización de diez campos aleatorios con el objetivo de 40X, con este propósito se usó el programa Motik Images Advanced 3.1 para Windows. La positividad se clasificó en tres grados de acuerdo con la intensidad de la reacción. El grado 1 fue para una inmunopositivity ligera con color ocre claro; el grado 2, moderado con color ocre; y el grado 3, intenso con color ocre oscuro.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete JMP 5.1** y se emplearon estadística descriptiva, tablas de contingencia y análisis de sensibilidad y especificidad para técnicas de diagnóstico por el método de Galen.¹⁵

Resultados

De los 30 casos evaluados por inmunohistoquímica para PVC-2 sólo se obtuvieron 23 resultados positivos (76.67%). En la evaluación de las lesiones histopatológicas de los 23 casos inmunopositivos a PVC-2, las lesiones que se presentaron con mayor frecuencia en la mucosa intestinal fueron: necrosis de criptas, infiltrado inflamatorio no supurativo, atrofia y fusión de vellosidades, con 95.65% cada uno (22 casos c/u), y células de regeneración en 73.91% (17 casos). En la

*Zymed Laboratorios Inc. 561 Eccles Avenue, South San Francisco, CA 94080, Estados Unidos de América.

** SAS Institute Inc., Estados Unidos de América.

Cuadro 1
FRECUENCIA DE LESIONES HISTOPATOLÓGICAS EN INTESTINOS
DE PERROS INMUNOPOSITIVOS A PVC-2
INCIDENCE OF HISTOPATHOLOGICAL LESIONS IN IMMUNO POSITIVE
DOG INTESTINES TO CPV-2

<i>Lesion</i>	<i>Number of cases</i>	<i>Light</i>	<i>%</i>	<i>Mild</i>	<i>%</i>	<i>Severe</i>	<i>%</i>
MUCOSA							
Atrophy of villi	22	4	18.18	13	59.09	5	22.73
Fusion of villi	22	2	9.09	14	63.64	6	27.27
Necrosis of crypt	22	5	22.73	10	45.45	7	31.82
Non suppurative inflammation	22	14	63.64	5	22.73	3	13.64
Proclastics cells	17	10	58.82	6	35.29	1	5.88
Superficial necrosis	16	6	37.50	5	31.25	5	31.25
Congestion	13	10	76.92	3	23.08	0	0.00
Repair	11	6	54.55	3	27.27	2	18.18
Dilatation of crypts	7	4	57.14	3	42.86	0	0.00
Edema	6	4	66.67	2	33.33	0	0.00
Colonies of bacteria	4	2	50.00	2	50.00	0	0.00
Hyperplasia of crypts	4	3	75.00	0	0.00	1	25.00
Hyperplasia of goblet cells	3	0	0.00	1	33.33	2	66.67
Hemorrhages	3	2	66.67	1	33.33	0	0.00
Exudate mixed	2	1	50.00	1	50.00	0	0.00
Suppurative inflammation	2	2	100.00	0	0.00	0	0.00
Inclusion bodies	0	0	0.00	0	0.00	0	0.00
SUBMUCOSA							
Edema	19	10	52.63	8	42.11	1	5.26
Congestion	16	9	56.25	7	43.75	0	0.00
Non suppurative inflammation	9	7	36.84	1	5.26	1	5.26
Linfoide atrophy	9	4	21.05	3	15.79	2	10.53
Hemorrhages	7	4	57.14	3	42.86	0	0.00
Repair	2	1	50.00	1	50.00	0	0.00
MUSCULAR							
Edema	19	11	57.89	8	42.11	0	0.00
Congestion	7	6	85.71	1	14.29	0	0.00
Non suppurative inflammation	4	3	75.00	0	0.00	1	25.00
Hemorrhages	3	1	33.33	2	66.67	0	0.00
SEROSA							
Edema	13	9	69.23	3	23.08	1	7.69
Non suppurative inflammation	7	7	100.00	0	0.00	0	0.00
Congestion	6	5	83.33	1	16.67	0	0.00
Fibrin	5	3	60.00	1	20.00	1	20.00
Hemorrhages	2	2	100.00	0	0.00	0	0.00

of the intestinal crypts and originates the destruction and collapse of the epithelium. As a result, villi shorten and the normal exchange of cells wrecks.^{16,17}

The histopathological lesions in the intestines of positive dogs to CPV-2 caused by immunohistochemistry, which were most frequently present in the mucosa,

submucosa se observó edema en 82.61% (19 casos). En la capa muscular la lesión más frecuente fue edema con 82.61% (19 casos). Por último, en la serosa la lesión más recurrente fue edema con 56.52% (13 casos) (Cuadro 1).

were necrosis of crypt, presence of regeneration cells, mononuclear inflammatory infiltration, and atrophy and fusion of villi. These lesions coincide with the ones described by other authors, who refer that those are registered in natural infections in puppies that presented hemorrhagic diarrhea, as well as in experimental infections when 9 month old Beagle were deliberately infected through oral and intravenous via with CPV-2.¹⁸

Although there are several reports of the presence of anofilic intranuclear inclusion bodies in uncapped cells of the intestinal crypts, in this study they were not seen.^{1,6}

It was observed that the lymphoid atrophy is one of the most characteristic lesions in the submucosa, which coincides with Meunier.¹⁸ The lesions in the muscular layer and serosa happen to be minimal, even few times they have been reported; however, conges-

En este trabajo la inmunopositividad a PVC-2 se presentó en grado variable, se observó principalmente en células epiteliales de criptas intestinales, de regeneración, necróticas e inflamatorias mononucleares en la lámina propia (Figuras 1-4). La distribución de la inmunopositividad observada por IHQ de los 23 casos positivos a PVC-2, se centró principalmente en células necróticas, 91.30% (21 casos), células inflamatorias mononucleares, 86.96% (20 casos), células de regeneración, 78.26% (18 casos) y células epiteliales, 73.91% (17 casos) (Cuadro 2). La presencia de células de regeneración en las criptas intestinales que se observan en la mucosa intestinal es buen indicador de presencia del PVC-2, con sensibilidad de 79% y especificidad de 33%. En el caso de la atrofia y fusión de vellosidades, así como en células necróticas se obtuvo sensibilidad de 96%, pero especificidad nula. Las lesiones asociadas con PVC-2 que mostraron

Cuadro 2

FRECUENCIA Y GRADO* DE INMUNOPOSITIVIDAD A PVC-2 EMPLEANDO LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN INTESTINO DELGADO

INCIDENCE AND GRADE* OF INMUNO POSITIVITY TO CPV-2 EMPLOYING THE INMUNOHISTOQUEMICAL TECHNIQUE IN SMALL INTESTINE

<i>Type of cell</i>	<i>Positive cases</i>	<i>Percentage</i>
<i>Epithelial cells</i>	17	73.91
<i>Grade 1</i>	6	35.29
<i>Grade 2</i>	8	47.06
<i>Grade 3</i>	3	17.65
<i>Necrotic cells</i>	21	91.30
<i>Grade 1</i>	6	28.57
<i>Grade 2</i>	12	57.14
<i>Grade 3</i>	3	14.29
<i>Regeneration cells</i>	18	78.26
<i>Grade 1</i>	7	38.89
<i>Grade 2</i>	8	44.44
<i>Grade 3</i>	3	16.67
<i>Mononuclear inflammatory cells</i>	20	86.96
<i>Grade 1</i>	11	55
<i>Grade 2</i>	9	45
<i>Grade 3</i>	0	0

*Grade 1: Slight
Grade 2: Moderate
Grade 3: Intense

tion and edema stand out. In the case of serosa, the presence of fibrin is due to vascular changes during illness.⁶

According to the results of the immunohistochemical study, 76.67% of the cases were positive to this technique. This percentage is smaller than those obtained from studies done by Ku *et al.*¹⁹ and Svava *et al.*²⁰ In 1994, Ku *et al.*¹⁹ performed, in the Pathology Department of the National University of Seoul, a retrospective study of a diagnosis' file where 97 puppy cases were included with a suggesting histopathological diagnosis of CPV-2. Immunohistochemical technique was applied on the bases of the strepto-avidin-biotin-peroxidase method by using a monoclonal antibody of murine origin. Ninety four percent of the cases were positive to this technique. In more recent studies, Svava *et al.*²⁰ applied the immunohistochemical technique on intestine sections and other organs of 20 dogs with a clinical and histopathological diagnosis of CPV-2 using the strepto-avidin-biotin-peroxidase complex with a polyclonal antibody. Positivity was detected in 95% of the small intestine cases and in 88.24% of various organs: liver, kidney, spleen, thymus, lymph nodes and lungs; it was not found in heart. The histological structures in which the most amount of antigen CPV-2 was found were the epithelial and necrotic cells of intestinal crypts, lymphoid plates and mononuclear inflammatory cells in lamina propria, either in nucleus as in cytoplasm, where mononuclear and necrotic cells presented the highest percentage of positivity.²⁰ In this study, necrotic cells and mononuclear inflammatory cells present the main number of positive cases, this coincide with Svava *et al.*,²⁰ while it was minimal in the epithelial cells. There are no reports of the positivity that occurs in regeneration cells.

In the present study, it was possible to see that the location of the antigen coincides with the histopathological lesions; the intense positivity is located in tissues with minimal histopathological lesions and the lowest in tissues with a higher grade of lesion. This was also observed by Mc Cartney *et al.*,²¹ who employed between 8 and 14 week old puppies, which orally received CPV-2 from feces.

In the statistic study, the regeneration cells were an indicator of the presence of CPV-2. Miura *et al.*²² considered that the presence of these cells are characteristic in CPV-2 infection, as well as the presence of necrosis of intestinal crypts and inclusion bodies. These last two lesions were not meaningful here. Although atrophy and fusion of villi are recurrent in immuno-positive cases, specificity is null. This suggests that these type of lesions were compatible with various etiologies. However, the nonspecific lesions to associate this virus are: hyperplasia of crypts, hyper-

baja sensibilidad y especificidad fueron dilatación de criptas, infiltrado inflamatorio supurativo, hemorragia, edema y presencia de colonias bacterianas. Se observó que las hembras resultaron más afectadas con 65.22% (15 casos); 100% de los casos corresponden a perros menores a seis meses de edad y la estación en que más se presentó fue invierno con 52.17% (12 casos), mientras que sólo un caso se presentó en primavera (4.35%).

Discusión

En el intestino delgado las células epiteliales de las criptas maduran y migran del epitelio germinal a las puntas de las vellosidades. Al llegar a éstas, las células epiteliales adquieren su capacidad de absorción y ayudan en la asimilación de nutrimentos. El PVC-2 infecta el epitelio germinal de las criptas intestinales y origina la destrucción y colapso del epitelio. Como resultado, se acortan las vellosidades y se deteriora el recambio normal de células.^{16,17}

Las lesiones histopatológicas en intestinos de perros positivos a PVC-2 por inmunohistoquímica, que se presentaron con mayor frecuencia en la mucosa, fueron necrosis de criptas, presencia de células de regeneración, infiltrado inflamatorio mononuclear, atrofia y fusión de vellosidades. Estas lesiones concuerdan con las que describen otros autores, quienes refieren que aquéllas se registran tanto en infecciones naturales en cachorros que presentaron diarrea hemorrágica, como en infecciones experimentales cuando se utilizaron cachorros Beagle de nueve semanas de edad, infectados por vía oral e intravenosa por PVC-2.¹⁸

A pesar de que existen varios informes de la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares anfófilos en células descamadas de las criptas intestinales; en el presente estudio no se observaron.^{1,6}

Se observó que la atrofia linfoide es de las lesiones más características en la submucosa, lo cual concuerda con lo descrito por Meunier.¹⁸ Las lesiones en la capa muscular y serosa suelen ser mínimas, incluso pocas veces se han notificado; sin embargo, pueden destacar la congestión y el edema; para el caso de la serosa, la presencia de fibrina se debe a cambios vasculares durante la enfermedad.⁶

De acuerdo con los resultados del estudio inmunohistoquímico, 76.67% de los casos fueron positivos a esta técnica, este porcentaje es menor a los estudios realizados por Ku *et al.*,¹⁹ y Svava *et al.*²⁰ En 1994, Ku *et al.*¹⁹ realizaron, en el Departamento de Patología de la Universidad Nacional de Seúl, un estudio retrospectivo del archivo de diagnóstico en donde se incluyeron 97 casos de cachorros con diagnóstico histopatológico sugerente a PVC-2, se les aplicó la

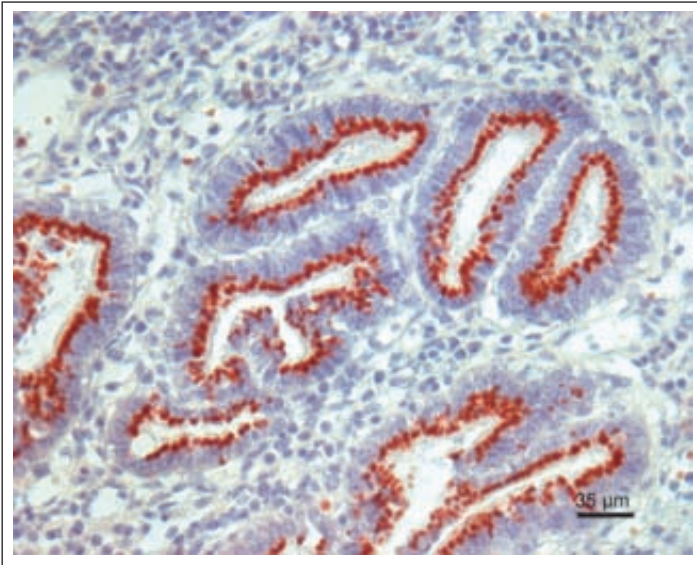


Figura 1: Intestino delgado con lesión de PVC-2, muestra inmunopositividad intensa en células epiteliales de criptas. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

Figure 1: Small Intestine with PVC-2 lesion, with intense immuno positivity in crypt epithelial cells. Immunohistochemical technique (ABP). 35 μm bar.

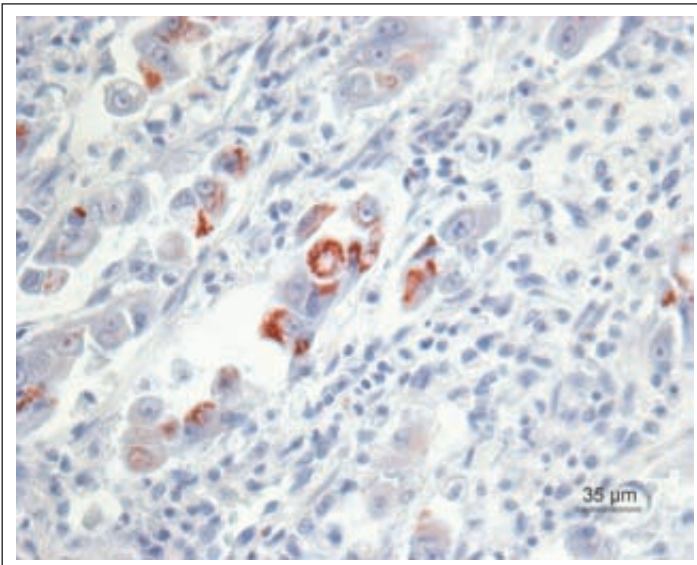


Figura 2: Intestino delgado con lesión de PVC-2, muestra inmunopositividad moderada en células de regeneración epiteliales de criptas. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

Figure 2: Small intestine with PVC-2 lesion, which shows moderate immuno positivity in crypt regeneration epithelial cells. Immunohistochemical technique (ABP). 35 μm bar.

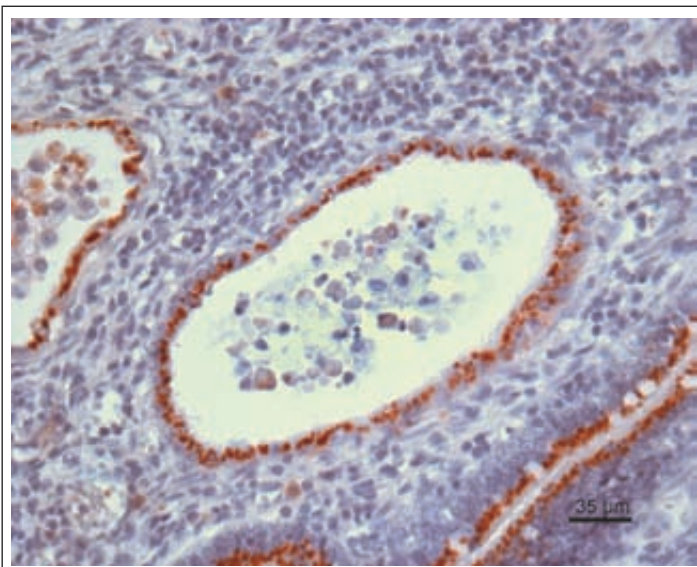


Figura 3: Intestino delgado con lesión de PVC-2, muestra inmunopositividad moderada en células necróticas de criptas. Técnica de inmunohistoquímica (ABP). Barra 35 μm.

Figure 3: Small intestine with PVC-2 lesion, which shows moderate immuno positivity in crypt necrotic cells. Immunohistochemical technique (ABP). 35 μm bar.

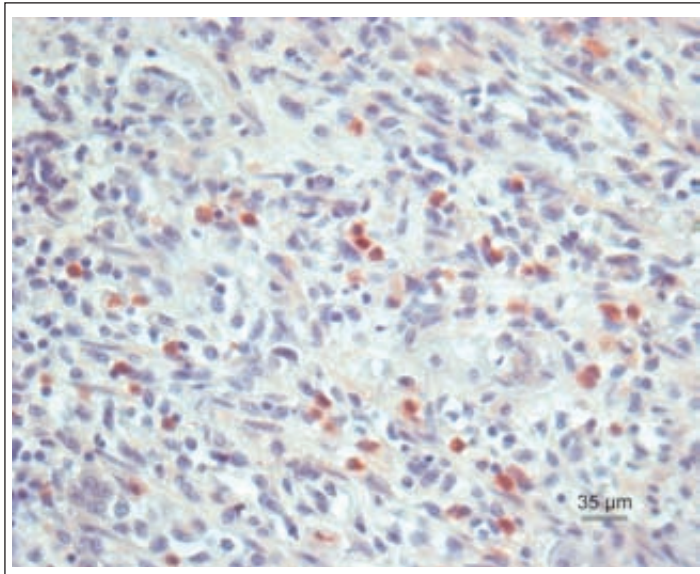


Figura 4: Intestino delgado con lesión de PVC-2, muestra inmunopositividad en células inflamatorias mononucleares en la lámina propia. Técnica de inmunohistoquímica. Barra 35 μ m.

Figure 4: Small intestine with PVC-2 lesion, which shows immunopositivity in mononuclear inflammatory cells in the lamina propria. Immunohistochemical technique (ABP). 35 μ m bar.

plasia of goblet cells, suppurative inflammatory infiltration, hemorrhage, edema and bacteria colonies, always considering that these lesions can be present in other digestive pathologies.²³ At the present time, there is no study done with an analysis of sensitivity and specificity of the histological lesions associated to CPV-2, which makes this research the first one in its kind.

The negative cases to CPV-2 by IHC could suggest the participation of other etiological agents that cause similar lesions; like corona virus.²⁴ In other studies, Turk *et al.*²⁵ demonstrated that both canine rotavirus and coronavirus in association with *Clostridium perfringens* are able to cause necrosis of intestinal crypts. These virus were detected with the immune fluorescence test; however, there are no reports about them in Mexico.

In relation to the breed that has more propensities to this disease, Poodle is the most affected, although other studies differ, maybe due to the popularity of the breed in each entity. More than 50% of the affected dogs were female and the season with the highest morbidity was winter. However, in other studies it is reported that infections took place mainly in fall and spring.²⁶⁻²⁸

In conclusion, it was possible to demonstrate the presence of CPV-2 by performing the immunohistochemical technique on most of the suspected cases after a histopathological diagnosis. However, the percentage was smaller than the literature reference. The lesions that were sensitively associated to CPV-2 were the presence of regeneration cells according to what was observed by immunohistochemistry. It is necessary to keep on establishing techniques for the etiological diagnosis of the different viral diseases that affect the digestive system of domestic animals, in order to make

técnica de inmunohistoquímica mediante el método estreptoavidina-biotina-peroxidasa, utilizando un anticuerpo monoclonal de origen murino; 94% de los casos fueron positivos a esta técnica. En estudios más recientes, Svara *et al.*²⁰ aplicaron la técnica de inmunohistoquímica en secciones de intestino y otros órganos de 20 perros con diagnóstico clínico e histopatológico de PVC 2, utilizando el complejo estreptoavidina-biotina-peroxidasa con un anticuerpo policlonal; la positividad se detectó en 95% de los casos en intestino delgado y en 88.24% en varios órganos, como hígado, riñón, bazo, timo, linfonodos y pulmón; no se encontró en corazón. Las estructuras histológicas en donde se halló la mayor cantidad de antígeno PVC-2 fueron células epiteliales y necróticas de criptas intestinales, placas linfoides y células inflamatorias mononucleares en lámina propia, tanto en núcleo como en citoplasma, en donde las células mononucleares y necróticas presentaron el mayor porcentaje de positividad.²⁰ En este estudio las células necróticas y células inflamatorias mononucleares presentan mayor número de casos positivos, ello concuerda con lo notificado por Svara *et al.*, mientras que en las células epiteliales fue mínima. No existen informes sobre la positividad que se presenta en las células de regeneración.

En el presente estudio, se pudo observar que la localización del antígeno coincide con las lesiones histopatológicas; la positividad intensa se localiza en tejidos con lesiones histopatológicas mínimas y la más débil en tejidos con mayor grado de lesión, esto también fue observado por Macartney *et al.*²¹ quienes emplearon cachorros de entre 8 y 14 semanas de edad, los cuales fueron inoculados por vía oral con PVC-2 de origen fecal.

En el estudio estadístico, las células de regeneración fueron un indicador de la presencia del PVC-2.

better decisions for the control and eradication of the illness. It is recommended the use of the immunohistochemical technique to carry out epidemiological studies in the future.

Acknowledgements

We thank the valuable collaboration of Dr. Alfonso Lopez Mayagoitia for facilitating the positive control of this research; as well as the technicians Luis Antonio Morales, Guadalupe Juarez and Eduardo Miranda, from the Histopathology Laboratory of the Pathology Department (FMVZ-UNAM), and Jaime Eugenio Cordova for the images of this work.

Referencias

1. Cooper BJ, Carmichael LE, Appel MJG, Greisen H. Canine viral enteritis II. morphologic lesions in naturally occurring parvovirus infection. *Cornell Vet* 1979; 69:134-144.
2. Eugster AK, Nairn C. Diarrhea in puppies: Parvovirus-like particles demonstrated in their feces. *Southwest Vet* 1977;30:59-60.
3. Parrish CR. Emergence, natural history and variation of canine, mink and feline parvoviruses. *Adv Virus Res* 1990; 38: 403-450.
4. Woods CB, Pollock RVH, Carmichael LE. Canine parvoviral enteritis. *J Am Anim Hosp Assoc* 1980; 16: 171-179.
5. Parrish CR, O'Connell PH, Evermann JF, Carmichael LE. Natural variation of canine parvovirus. *Science* 1985; 230: 1046-1048.
6. Stephano HA. Epizootia de enteritis viral en México: posible infección por parvovirus. *Vet Méx* 1980; 11 :141-148.
7. Stephano HA, Gómez ES. Enteritis hemorrágica en cachorros en México: observación de partículas similares a parvovirus en raspado de mucosa intestinal. *Vet Mex* 1981; 12: 1 03-104.
8. Águila TH. Determinación de anticuerpos contra el parvovirus canino en sueros de perros en México (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 1982.
9. Amaro NM. Determinación de Parvovirus canino en heces por medio de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
10. Rodríguez MHA, Gómez RAM, Orozco EH, Alcántara VA, Cruz OH. La inmunoperoxidasa: generalidades y evaluación de 500 casos. *Rev Fac Med* 1986; 29: 155-166.
11. Ruiz RR. Diagnóstico de parvovirus canino tipo 2 (PVC-2) en perros domésticos por inmunohistoquímica (tesis de licenciatura). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.

Miura *et al.*²² mencionan que la presencia de estas células son características en la infección por PVC-2, al igual que la necrosis de criptas intestinales y la presencia de cuerpos de inclusión, estas últimas dos lesiones no fueron significativas aquí. A pesar de que lesiones como atrofia y fusión de vellosidades son recurrentes en los casos inmunopositivos, la especificidad es nula, ello sugiere que ese tipo de lesiones son compatibles con varias etiologías. Sin embargo, las lesiones inespecíficas para asociar este virus son: hiperplasia de criptas, hiperplasia de células caliciformes, infiltrado inflamatorio supurativo, hemorragia, edema y colonias bacterianas, considerando que estas lesiones se pueden presentar en otras patologías digestivas.²³ Actualmente no hay ningún estudio con un análisis de sensibilidad y especificidad de las lesiones histológicas asociadas con PVC-2, por lo que este trabajo es el primero en su tipo.

Los casos negativos a PVC-2 por IHQ pudieran sugerir participación de otros agentes etiológicos que causan lesiones similares, como los coronavirus.²⁴ En estudios de Turk *et al.*²⁵ se demostró que tanto el rotavirus como el coronavirus canino en asociación con *Clostridium perfringens* son capaces de provocar necrosis de criptas intestinales; estos virus fueron detectados por la prueba de inmunofluorescencia; sin embargo, en México no existen informes sobre ellos.

Respecto de las razas con mayor predisposición a la enfermedad, se observa que Poodle es la más afectada, a pesar de que otros estudios difieren, quizá debido a la popularidad de la raza en cada entidad. Más de 50% de los perros afectados fueron hembras y la época en que más se presentó dicho padecimiento fue en invierno; sin embargo, en trabajos de otros autores se informa que la enfermedad se presentó principalmente en otoño y primavera.²⁶⁻²⁸

Se concluye que fue posible demostrar la presencia de PVC-2 mediante la técnica de inmunohistoquímica en la mayoría de los casos sospechosos diagnosticados por histopatología; sin embargo, el porcentaje fue menor a lo referido en la literatura. Las lesiones que se asociaron sensiblemente a PVC-2 fueron la presencia de células de regeneración de acuerdo con lo observado por IHQ. Es necesario seguir estableciendo técnicas para el diagnóstico etiológico de diferentes enfermedades virales que afectan el aparato digestivo de los animales domésticos, para tomar mejores decisiones de control y erradicación. Se recomienda el empleo de la técnica de IHQ para realizar estudios epidemiológicos en lo futuro.

Agradecimientos

Se agradece la valiosa colaboración del Dr. Alfonso López Mayagoitia, por facilitar el control positivo

12. Haines DM, Chelack SJ. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest* 1991; 3: 101-112.
 13. Prophet ES, Mili S, Arrington JS, Sobin, LH. Métodos histotecnológicos. 2ª ed. Washington DC: Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1995.
 14. Damián SM. Identificación de virus respiratorios en pulmones neumónicos de perros domésticos a través de inmunohistoquímica (tesis de licenciatura). México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2004.
 15. Daniel WW. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ª ed. México: Limusa Wiley, 2002.
 16. Hoskins JD. Enteritis Viral Canina. En: Greene CE, editor. Enfermedades Infecciosas en Perros y Gatos. 2ª ed. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2000:40-45
 17. Ramos SR. Infecciones por parvovirus canino como causa de mortalidad: estudio retrospectivo (tesis de licenciatura) México (D.F) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
 18. Meunier PC. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Vet Pathol* 1985; 22: 60-71.
 19. Ku JL, Seo IL, Lim CH. Histopathological and immunohistochemical studies on the intestinal lesions related to the infected age in spontaneous canine parvovirus enteritis. *Korean J Vet Res* 1994; 34: 537-547.
 20. Svára T, Juntés P, Pogacnik M, Gombac M, Hostnik P. de este estudio; así como a los técnicos Luis Antonio Morales, Guadalupe Juárez y Eduardo Miranda, del Laboratorio de Histopatología del Departamento de Patología (FMVZ-UNAM), y a Jaime Eugenio Córdova por las imágenes de este trabajo.
-
- Immunohistochemical demonstration of parvoviral antigen in the organs of dogs with canine parvovirus. *Slov Vet Res* 2003; 40: 81-90.
 21. Macartney I, McCandlish IAP, Thompson H, Cornwell HJC. Canine parvovirus enteritis 2: pathogenesis. *Vet Rec* 1984; 115: 453-460.
 22. Miura K, Tsuchitani M, Narama I. Histopathological characteristics as diagnostic indicators in canine parvovirus enteritis. *Jpn J Vet Sci* 1986; 48: 797-800.
 23. Jones TC, Hunt RO, King NW. *Veterinary Pathology*. 6th ed. USA: Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.
 24. Nelson OT, Eustis SL, McAdaragh JP, Stotz I. Lesions of spontaneous canine viral enteritis. *Vet Pathol* 1979; 16: 680-686.
 25. Turk J, Fales W, Miller M. Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc* 1992; 200: 991-994.
 26. Houston OM, Ribble CA, Head LL. Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1996; 208: 542-546.
 27. Glickman L T, Oamanski LM, Patronek GJ. Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 589-594.
 28. Mason MJ, Gillet NA, Muggenburg BA. Clinical, pathological and epidemiological aspects of canine parvovirus enteritis in an unvaccinated closed beagle colony: 1978-1985. *Am Anim Hosp Assoc* 1987; 23: 183-192.