

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO DE LA OZONOTERAPIA *IN-VITRO* Y EN CANINOS
INFECTADOS NATURALMENTE CON *PROTOPARVOVIRUS*
*CARNÍVORO 1 (CPPV-1)***

GABRIELA FRANCO MORENO

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2022**



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFECTO DE LA OZONOTERAPIA *IN-VITRO* Y EN CANINOS
INFECTADOS NATURALMENTE CON *PROTOPARVOVIRUS*
*CARNÍVORO 1 (CPPV-1)***

GABRIELA FRANCO MORENO



Rodrigo Puentes
Director de Tesis



Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Co-director

2022

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**



**Claudia Della Cella, DMV, MSc.
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República-Uruguay**



**Zullit Zamora, DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Centro Nacional de Investigaciones -Cuba**



**Danilo Bucafusco, DMV, PhD
Facultad de Veterinaria
Universidad de Buenos Aires-Argentina**



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud Animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Aula .. Y PLATAFORMA Google meet, 13/06/2022

TRIBUNAL: Claudia Della Cella, Zullyt Zamora, Danilo Bucafusco

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4291128-1	FRANCO MORENO, GABRIELA VERONICA	12	SSS

TRIBUNAL

CLAUDIA DELLA CELLA

Zullyt B. Zamora Rodriguez
Danilo Bucafusco

FIRMA

Dra CLAUDIA DELLA CELLA
DMTV - MSc
CJPU 47480

[Handwritten signature]
[Handwritten signature]
[Handwritten signature]

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos simplemente gracias por estar y ser un pilar fundamental.

A mi tutor, Rodrigo Puentes por su ayuda y guía durante el proceso de maestría. A mi co-tutor Jean Joaquim, por su guía y enseñanza en el uso de la terapia implementada.

A mis compañeros del laboratorio, por ayudarme en el día a día del desarrollo del trabajo en el laboratorio, y por acompañarme en los altibajos durante el desarrollo de este trabajo.

Al Hospital Veterinario Escuela, a sus residentes y docentes por la ayuda en la realización del ensayo clínico. A Rafael por acompañarme en el desarrollo de este proyecto.

A los nuevos amigos que el desarrollo de esta tesis me regaló, por hacerme sentir parte de su familia, Nathalia, Brayan y Henry.

A CAP y Santander por otorgarme las becas que me permitieron realizar este proyecto.

A Geissy, Snoopy, Juliet, Bella, Muleque, Lilica, Lara, Bebe, Trovao, Lili, Cacao, Tequila, Jack, Belinha, Zoe, Simba, Lobo, Zeus y Thor y sus tutores por participar en este ensayo y tan amablemente colaborar con este proyecto permitiéndome ingresar a sus hogares para las consecutivas tomas de muestra.

Finalmente, a Luther por acompañarme tantos años.

ÍNDICE

RESUMEN	IV
SUMMARY	V
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Agente etiológico	3
2.2 Enfermedad causada por el CPPV-1 en caninos	4
2.3 Ozonoterapia	5
2.4 Diagnóstico de la infección por CPPV-1	8
2.4.1 Pruebas basadas en la interacción antígenos-anticuerpos	9
2.4.2 Pruebas basadas en las características biológicas	9
2.4.3 Pruebas moleculares	10
2.4.3.1 Aplicación de la PCR convencional y tiempo real para el diagnóstico de CPPV-1	11
2.4.3.2 Droplet digital PCR como nueva herramienta para el diagnóstico de CPPV-1	11
3. HIPÓTESIS	13
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo general	13
4.2 Objetivos específicos	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1 Materiales y métodos para el objetivo específico 1	14
5.1.1 Expansión viral en cultivos celulares	14
5.1.2 Tratamiento con ozono al CPPV-1	14
5.1.3 Hemaglutinación viral	14
5.1.4 Observación en Microscopio Electrónico de Transmisión (M.E.T.)	15
5.1.5 Cuantificación viral mediante Droplet digital PCR (ddPCR)	15
5.1.6 Viabilidad celular mediante la técnica de reducción del MTT	17
5.2 Materiales y métodos para el objetivo específico 2	17
5.2.1 Conformación de los grupos de estudio	17
5.2.2 Tratamiento con ozono en caninos naturalmente infectados	18
5.2.3 Tablas de seguimiento para el status clínico	18
5.2.4 Hemogramas diferenciales de los caninos incluidos en el ensayo	18
5.3 Materiales y métodos para el objetivo específico 3	19

5.3.1 Toma de muestras de hisopado rectal de los caninos incluidos en el ensayo	19
5.3.2 Cuantificación de la excreción viral de CPPV-1 en materia fecal.....	19
5.4 Materiales y métodos para el objetivo específico 4	19
5.4.1 Toma de muestras de suero sanguíneo de los caninos incluidos en el ensayo	19
5.4.2 Cuantificación de anticuerpos contra CPPV-1 mediante Inhibición de la hemaglutinación	20
5.5 Análisis estadístico.....	20
6. RESULTADOS.....	22
6.1 Capacidad hemaglutinante viral luego del tratamiento con ozono	22
6.2 Observación en Microscopio Electrónico de Transmisión (M.E.T.)....	23
6.3 Estandarización de la técnica ddPCR (droplet digital PCR)	24
6.4 Cuantificación viral por ddPCR (droplet digital PCR) de las alícuotas tratadas con ozono	28
6.5 Viabilidad celular observada mediante la técnica de reducción del MTT	29
6.6 Evolución clínica de los animales infectados con CPPV-1 y tratados con ozono	31
6.7 Evolución del hemograma de los caninos infectados con CPPV-1 tratados o no con ozonoterapia.....	35
6.8 Excreción viral de caninos infectados con CPPV-1 tratados o no con ozonoterapia	36
6.9 Inhibición de la hemaglutinación	37
6.10 Correlación entre las variantes título de anticuerpos por IHA y excreción viral.....	39
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXO I	63
ANEXO II	64

RESUMEN

La parvovirus canina es causada por el *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1). A pesar de la vacunación extensa sigue siendo una de las principales causas infecciosas de mortalidad canina, alcanzando un 90% en animales que no reciben tratamiento. La infección produce un cuadro de gastroenteritis hemorrágica e inmunosupresión. No existen tratamientos específicos para la misma, por tanto, la base terapéutica es controlar la sintomatología clínica. El tratamiento con ozono presenta propiedades virucidas, inmunomoduladoras y analgésicas comprobadas por una extensa bibliografía científica. Por lo antes mencionado, este trabajo analizó el efecto de la ozonoterapia frente a CPPV-1 *in-vivo* e *in-vitro*. Para el análisis *in-vitro* se expusieron alícuotas de CPPV-1 a diferentes concentraciones de ozono, una similar a la utilizada en el tratamiento clínico y otra descrita para procesos de desinfección ambiental. Posteriormente esas alícuotas fueron analizadas utilizando la técnica de hemaglutinación (HA), la técnica de reducción del MTT y *droplet digital* PCR (*ddPCR*). Para el análisis *in-vivo* se diseñaron 2 grupos de animales infectados naturalmente con CPPV-1, distribuidos aleatoriamente. Al grupo A se le aplicó el tratamiento convencional indicado por el veterinario a cargo y al grupo B se le aplicó tratamiento convencional y ozonoterapia concomitantemente. Se compararon la evolución clínica, los parámetros hematológicos, la seroconversión mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación y la carga de excreción viral mediante *ddPCR*. Se demostró un efecto nocivo del ozono *in-vitro* sobre CPPV-1, evidenciando una disminución en la capacidad hemaglutinante de la cápside viral y en el número de copias del material genético. En el tratamiento concomitante con ozonoterapia en caninos naturalmente infectados no se observaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los parámetros analizados entre ambos grupos. Teniendo en cuenta los resultados encontrados se puede concluir que la ozonoterapia posee potencial virucida *in-vitro* y por lo tanto es de esperar que pueda ser beneficiosa como agente terapéutico para esta enfermedad, debiéndose demostrar en futuros ensayos clínicos.

SUMMARY

Canine parvoviral enteritis is caused by carnivorous protoparvovirus 1 (CPPV-1). Despite extensive vaccination, it remains one of the main infectious causes of canine mortality, reaching 90% in not treated animals. The infection produces hemorrhagic gastroenteritis and immunosuppression. There are no specific treatments for it, therefore the therapeutic basis is to control the clinical symptoms. Ozone treatment has virucidal, immunomodulatory and analgesic properties proven by extensive scientific literature. For the aforementioned, this work analyzed the effect of ozone therapy against CPPV-1 *in-vivo* and *in-vitro*. For *in-vitro* analysis, aliquots of CPPV-1 were exposed to different concentrations of ozone, one similar to that used in clinical treatment and another described for environmental disinfection processes. Subsequently, these aliquots were analyzed using the hemagglutination technique (HA), the MTT reduction technique and digital droplet PCR (ddPCR). For the *in-vivo* analysis, 2 randomly distributed groups of animals naturally infected with CPPV-1 were designed. Group A received the conventional treatment and group B received conventional treatment and ozonotherapy concomitantly. Clinical course, hematological parameters, seroconversion using the hemagglutination inhibition technique, and viral excretion load through ddPCR were compared. A harmful effect of *in-vitro* ozone on CPPV-1 was demonstrated, showing a decrease in the hemagglutinating capacity of the viral capsid and in the number of copies of genetic material. In the concomitant treatment with ozone therapy in naturally infected canines, no significant statistical differences were observed in any of the parameters analyzed between both groups. Based on the results found in the *in-vitro* tests, it can be concluded that ozone therapy has therapeutic potential for the treatment of canine parvovirus, and therapeutic protocols should be adjusted in clinical cases.

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I	Resultados de la técnica de hemaglutinación viral con CPPV-1 tratado con ozono de forma <i>in-vitro</i> . Se muestran los resultados de los títulos de las Unidades Hemaglutinantes (UHA) del control viral (sin ozono) y ambas alícuotas tratadas con diferentes concentraciones de ozono.	22
Cuadro II	Resultados de la <i>dd</i> PCR sobre las alícuotas virales tratadas con ozono de forma <i>in-vitro</i> . Se muestran los resultados de la técnica en la alícuota control viral (sin ozono) y ambas alícuotas tratadas con diferentes concentraciones de ozono	28
Cuadro III	Absorbancia de células CRFK en diferentes condiciones de cultivo. Se observa diferencia estadística significativa entre el control celular con 10% de SFB y las células cultivadas sin SFB, y entre el control celular y las células cultivadas con diferentes concentraciones de DMSO	29
Cuadro IV	Absorbancia en células CRFK inoculadas con las alícuotas virales control, ozono A y ozono B. Se realizó el análisis comparativo de los cultivos celulares inoculados con el virus control y con los virus ozono A y ozono B en los controles celulares y en tres diluciones, los virus puros en la dilución 10^{-3} y 10^{-7} . Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivos inoculados con la alícuota viral pura y las alícuotas virales ozono A y ozono B. Asimismo no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los otros 3 ensayos analizados.	30
Cuadro V	Medias y desvío estándar para cada momento del muestreo para la excreción viral. El grupo A corresponde al grupo control y el grupo B corresponde al grupo que recibió tratamiento con ozono concomitantemente.	37
Cuadro VI	Medias y desvío estándar para cada momento del muestreo para el título de anticuerpos por IHA. El grupo A corresponde al grupo control y el grupo B corresponde al grupo que recibió tratamiento con ozono concomitantemente	38
Figura 1	Técnica de hemaglutinación viral para CPPV-1 tratado con ozono de forma <i>in-vitro</i> . En las filas A y B se observa el título en UHA del virus control. En las filas C y D el título de la alícuota tratada con ozono A (17 μg /ml). En las filas E y F el título de la alícuota tratada con ozono B (55 μg /ml).	22

- Figura 2 Imágenes obtenidas con un M.E.T de alta resolución de las partículas virales control y las tratadas con ozono a diferentes concentraciones. Las imágenes A y B corresponden a la alícuota control, en las mismas se observan partículas del tamaño esperado para CPPV-1. Las imágenes C y D corresponden a la alícuota viral A y las imágenes E y F corresponden a la alícuota viral B. Se observan partículas del tamaño esperado con daños morfológicos en su cápside. 23
- Figura 3 ddPCR de las diluciones crecientes de un plásmido utilizando el vector pUC57 al cual se le insertó una secuencia de 202 pd codificante para una parte de la proteína VP2. Se observan los resultados de las diluciones seriadas desde 10^{-2} en la columna A08 hasta 10^{-8} en la columna G08. La columna H08 corresponde al control negativo sin ADN. Se evidencia la disminución en el número de gotas positivas (puntos azules) correspondiente a las diluciones crecientes, pero no una clara diferenciación entre los cluster positivos (azul) y negativos (gris). 24
- Figura 4 ddPCR de la digestión y posterior diluciones crecientes del plásmido con el gen codificante para una parte de VP2. Se observan los resultados de las diluciones seriadas desde puro en la columna E01 hasta la dilución 10^{-6} en la columna E07. La columna E08 corresponde al control negativo sin ADN. Se evidencia saturación en las primeras 4 diluciones con la posterior disminución en el número de gotas positivas (puntos azules) correspondiente a las diluciones crecientes. Sin embargo, la diferenciación entre los cluster positivos (azul) y negativos (gris) debería ser más evidente. 25
- Figura 5 ddPCR de una muestra con alta carga viral. El gráfico A corresponde a las diluciones seriadas (pura- 10^{-6}) de la muestra digerida con la enzima FastDigest HindIII y el gráfico B corresponde a las diluciones seriadas (pura- 10^{-6}) de la muestra sin digerir. En el gráfico B se observa la saturación de las 3 primeras diluciones y la disminución progresiva de las gotas positivas (puntos azules). Se evidencia una clara diferenciación entre el cluster positivo (azul) y el negativo (gris). 26
- Figura 6 Repetibilidad de la técnica ddPCR. Se observan los resultados de 3 muestras de campo analizadas por triplicado. La A02, B02 y C02 corresponden a la primera muestra analizada, las columnas E02, F02 y G02 corresponden a la segunda muestra, las columnas E03, F03 y G03 corresponden a la tercera

	muestra analizada y finalmente la columna H03 corresponde al control negativo sin ADN. Se obtuvieron resultados similares en las 3 repeticiones realizadas a cada una de las muestras.	27
Figura 7	Alineamiento de las secuencias de 3 muestras seleccionadas al azar con la cepa de referencia de CPV-2 publicada en GenBank. Se observa alta similitud entre la cepa de referencia y las 3 muestras de campo seleccionadas.	28
Figura 8	Frecuencia de las posibles consistencias de las heces. Estadística descriptiva de la consistencia de las heces en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a no defeca, 1 corresponde a heces sólidas, 2 corresponde a heces pastosas y 3 corresponde a heces líquidas. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.	32
Figura 9	Presencia o ausencia de sangre en heces. Estadística descriptiva de la presencia de sangre en heces en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a no defeca, 1 corresponde a ausencia de sangre, y 2 corresponde a presencia de sangre. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.	32
Figura 10	Frecuencia de episodios eméticos. Estadística descriptiva de la frecuencia de vómitos en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a ausencia de vómitos, 1 corresponde a presencia de hasta 3 episodios de vómito, 2 corresponde a presencia de hasta 5 episodios de vómito y 3 corresponde a presencia de más de 6 episodios de vómito. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.	33
Figura 11	Respuesta frente al estímulo verbal. Estadística descriptiva de la respuesta al estímulo verbal en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0-en pie caminando, 1-permanece en decúbito lateral/esternal, pero se pone de pie con estimulación verbal, 2-decúbito esternal aun siendo estimulado, 3-decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza sin estímulo, 4-decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza solamente con estimulación verbal y 5-decúbito lateral, no mueve o levanta la cabeza aun siendo estimulado verbalmente. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.	33

Figura 12	Curva de supervivencia a la infección por CPPV-1. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia. No se observó diferencia estadística significativa entre ambos grupos.	34
Figura 13	Días de internación en el Hospital veterinario del total de caninos incluidos en cada uno de los grupos de estudio. No se observa diferencia significativa entre ambos grupos.	35
Figura 14	Días de internación en el Hospital Veterinario de los caninos que sobrevivieron a la infección por CPPV-1. No se observa diferencia significativa entre ambos grupos.	35
Figura 15	Evolución de los parámetros hemáticos de los caninos. El gráfico A corresponde a número de eritrocitos/ μ l, el gráfico B corresponde a hematocrito y el gráfico C corresponde a número de leucocitos/ μ l. Si se comparan ambos grupos no se observa diferencia estadística significativa entre las medias de cada grupo en cada uno de los días analizados	36
Figura 16	Comparación en la excreción viral entre ambos grupos. La figura A corresponde al día 1, la figura B corresponde al día 15 y la figura C corresponde al día 30. No se observan diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en ninguno de los momentos de muestreo.	37
Figura 17	Comparación del título de anticuerpos entre ambos grupos. La figura A corresponde al día 1, la figura B corresponde al día 15 y la figura C corresponde al día 30. No se observan diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en ninguno de los momentos de muestreo.	38
Figura 18	Correlación entre el título de anticuerpos y la excreción viral. La figura A corresponde al grupo control y la figura B al grupo que recibió tratamiento con ozono. En ambos grupos se observa una correlación negativa media y significativa.	39

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de la vacunación extensa, la parvovirus canina sigue siendo una de las principales causas infecciosas de mortalidad canina, especialmente entre los jóvenes (Decaro et al., 2020), alcanzando un 90% de mortalidad en animales que no reciben tratamiento (Gerlach et al., 2020). Esta enfermedad es causada por el *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1), un pequeño virus desnudo con un genoma ADN monocatenario lineal sumamente estable en el medio ambiente pudiendo, en condiciones adecuadas, mantener su infectividad durante meses (Flores, 2007; Knipe y Howley, 2013). Una característica distintiva de los parvovirus es su dependencia de las células en la fase S del ciclo celular para poder llevar a cabo su replicación (Flores, 2007). Su ingreso a la célula es mediante el receptor de transferrina, el cual es expresado en alta densidad en células en división (Truyen, 2006). Esto junto al aumento relativo de la disponibilidad de células mitóticamente activas en tejidos específicos en los animales jóvenes determina una susceptibilidad dependiente de la edad, lo que se refleja en el tropismo por las células hematopoyéticas, los linfocitos y las células progenitoras del revestimiento de la mucosa intestinal (MacLachlan et al., 2017).

La manifestación clínica típica inducida por CPPV-1 es la enteritis hemorrágica, con una sintomatología caracterizada por una diarrea por malabsorción frecuentemente hemorrágica, generalmente de inicio repentino con depresión, anorexia, vómitos frecuentes, deshidratación, babeo, fiebre y dolor abdominal severo. La consecuencia inmediata de la infección intestinal por CPPV-1 es el aplanamiento de las vellosidades, el colapso y la necrosis epitelial con exposición de la lámina propia de la mucosa, permitiendo la translocación bacteriana hacia el torrente sanguíneo con la consecuente liberación de toxinas y septicemia. A medida que el cuadro progresa los animales pueden presentar deshidratación, hipovolemia y shock. La leucopenia es un hallazgo constante, esta inmunosupresión permite el establecimiento de infecciones secundarias (Hoelzer y Parrish, 2010; Decaro y Buonavoglia, 2012).

El diagnóstico confirmatorio debe ser realizado más allá de la sintomatología clínica. La confirmación etiológica de la enfermedad es necesaria para aislar los animales infectados y prevenir la infección de animales susceptibles, teniendo en cuenta la extensa permanencia del virus en el medio ambiente (Desario et al., 2005). Para el diagnóstico se emplean varias estrategias, técnicas basadas en las reacciones antígenos anticuerpos (inmunocromatografía, ELISA), técnicas basadas en las características biológicas del virus (hemaglutinación, aislamiento viral), identificación de partículas virales por microscopio electrónico y técnicas moleculares (LAMP (loop-mediated isothermal amplification), PCR, qPCR). Todas estas técnicas presentan diferencias en su capacidad de detectar las muestras positivas, siendo hasta la fecha la qPCR descrita como la técnica más sensible (Desario et al., 2005; Mazzaferro, 2020). La qPCR tiene como una las principales

desventajas la necesidad de curvas estándar que requieren valores de alta eficiencia cuando es necesario cuantificar moléculas blanco, así como menor sensibilidad comparado con la última generación en las PCR, la PCR digital (Arvia et al., 2017; Pinheiro-de-Oliveira et al., 2019; Liu et al., 2020).

No existe un tratamiento específico que actúe directamente frente al agente causal de la parvovirus, por lo tanto, el tratamiento se basa en conseguir un volumen circulatorio eficaz, mantener el equilibrio electrolítico y controlar las infecciones bacterianas secundarias (Gerlach et al., 2020). En este sentido, es bien conocido que el ozono puede ser usado como terapia complementaria en una gran variedad de patologías agudas y crónicas (Sciorsci et al., 2020). El principal problema en la ozonoterapia es la dosis a administrar, ya que un exceso conlleva efectos secundarios adversos (Murray et al., 2008; Viebahn-Hänsler et al., 2012). Sin embargo, el ozono medicinal administrado a dosis bajas controladas, provoca un estrés oxidativo transitorio que activa el sistema antioxidante endógeno (Sagai & Bocci, 2011) y la producción y liberación de una variedad de citoquinas, provocando un efecto inmunomodulador y analgésico (Díaz Luis et al., 2013). Asimismo, se le describen propiedades biocidas mediante la oxidación de los enlaces dobles (Bruce, 2001). La capacidad de reducir la infectividad viral del ozono es a través de la peroxidación de lípidos y la peroxidación de proteínas, siendo este último fundamental en la inactivación de virus desnudos (Murray et al., 2008).

Se han publicado diversos trabajos documentando la acción terapéutica del ozono para una variedad de patologías, tanto en medicina humana como veterinaria (Ogata y Nagahata, 2000; Escarpanter Buliés, 2005; Viebahn-Hänsler et al., 2012; Zobel et al., 2012; Mohammadi et al., 2013; Degli Agosti et al., 2016; Duricic et al., 2016; Hernández Avilés et al., 2016). Además, varios estudios demuestran su efectividad para inactivar enterovirus en aguas, así como su efecto virucida en superficies (Thurston-Enriquez et al., 2004; Hudson et al., 2007; Tseng y Li, 2008; Predmore et al., 2015).

Por lo tanto, y en base a lo explicado previamente, en esta tesis se evaluó la capacidad virucida del ozono contra CPPV-1 *in-vitro* y se analizó cómo esta terapia influye en el resultado clínico de animales naturalmente infectados con el virus, en la excreción viral a lo largo del tiempo y su influencia en el título de anticuerpos contra CPPV-1.

2. ANTECEDENTES

2.1 Agente etiológico

El *parvovirus canino tipo 2* (CPV-2) recientemente fue reclasificado junto a otros parvovirus (FPV, RPV, MEV) como una única especie viral denominada *Protoparvovirus carnívoro 1* (ICTV Taxonomy), siendo todos subespecies clasificadas según su huésped (Decaro et al., 2020). Es un virus autónomo, pequeño de aproximadamente 25 nm sin envoltura con cápside de simetría icosaédrica y una sola cadena lineal de ADN. Es un virus sumamente estable en el medio ambiente debido a su estructura simple y compacta, pudiendo mantenerse infectivo hasta un año en el ambiente permitiendo la exposición de caninos susceptibles a las heces o fómites contaminados. La estructura viral es estable a pH entre 3 y 9, a una temperatura de 56°C durante 60 minutos. Por otro lado, la infectividad se puede inactivar con desinfectantes a base de formalina, hipoclorito de sodio y agentes oxidantes (Kerr et al., 2006; Mylonakis et al., 2016).

Su genoma codifica para dos proteínas no estructurales NS1 y NS2, y 2 proteínas estructurales VP1 y VP2, constituyendo una cápside altamente antigénica (Flores, 2007; MacLachlan et al., 2017). VP1 y VP2 se codifican a partir de un único ORF en el genoma viral, por el mecanismo de splicing alternativo del RNA mensajero (mRNA). VP2 es la proteína más abundante y constituye el 90% de la cápside viral. Cuando se observa por cristalografía, la proteína VP2 tiene ocho cadenas estructurales en forma de barril β tipo "jelly-roll" conectadas por asas que quedan expuestas en la superficie del virión y son responsables de sus propiedades antigénicas, de la unión al receptor celular y de la estabilidad de las partículas en el medio ambiente (Flores, 2007; MacLachlan et al., 2017).

La cápside de los Parvovirus presenta una serie de características superficiales que están asociadas con su funcionamiento. Se observa un cilindro hueco, que contiene un poro central que conecta el interior del virión con la parte externa de la partícula, en cada eje de simetría quintuple, el cual está rodeado por una depresión circular tipo cañón; protuberancias prominentes (espículas) alrededor del eje de simetría triple; y, en la mayoría de los virus, una depresión en cada doble eje de simetría, denominada hoyuelo. El sitio de unión del parvovirus canino (actualmente clasificado como CPPV- 1) que determina el rango de huésped y el tropismo por los diferentes tejidos se encuentra en la superficie de las protuberancias, mientras que el sitio de unión del receptor del ácido siálico (capacidad hemaglutinante, HA) se encuentran en la depresión en el doble eje (Kerr et al., 2006; MacLachlan et al., 2017). Las proteínas de la cápside desarrollan múltiples funciones, entre ellas el reconocimiento del receptor de la superficie de la célula huésped, determinar la patogenicidad, la encapsidación del genoma viral, el autoensamblaje de la propia cápside, la maduración de viriones para producir una progenie infecciosa, la importación y exportación nuclear, el escape del

endosoma durante la infección y detección y evasión de la respuesta inmune del huésped, por tanto alteraciones en la cápside provocan una pérdida en la infecciosidad de los parvovirus (Kerr et al., 2006).

Desde su aislamiento en 1978 (Appel et al., 1979) hasta la actualidad han sido descritas 3 variantes antigénicas (CPV-2a, b y c) que difieren entre ellas en un solo aminoácido en la posición 426 de la VP2 (Parrish et al., 1991; Buonovaglia et al., 2001). La cepa original (CPV-2) fue reemplazada por las nuevas variantes (Miranda y Thompson, 2016). Los parvovirus afectan principalmente animales jóvenes debido a que, al ser incapaces de inducir mitosis, para su replicación necesitan que las células se encuentren en la fase S del ciclo celular; asimismo el receptor de transferrina que utilizan para ingresar a la célula es expresado en alta densidad en células en división (Truyen, 2006; Hoelzer y Parrish 2010).

2.2 Enfermedad causada por el CPPV-1 en caninos

Como mencionamos previamente los parvovirus afectan principalmente animales jóvenes debido a las condiciones que necesitan para poder realizar la multiplicación viral (Truyen, 2006; Hoelzer y Parrish, 2010). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen en gran medida de la edad del huésped. Cuando la infección ocurre por vía intrauterina o en animales neonatos menores a 4 semanas de edad se observa replicación viral en el miocardio. Se produce muerte súbita o signos inespecíficos con el posterior desarrollo de insuficiencia cardíaca; esta forma clínica prácticamente ya no se observa en el campo. En los animales mayores de alrededor de 4 semanas, el virus se replica principalmente en los tejidos que contienen células proliferantes, incluyendo la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y las células progenitoras en las criptas de Lieberkühn en el intestino, pero el virus puede propagarse a todos los tejidos. En estos animales se manifiesta la forma clínica más característica inducida por CPPV-1, la enteritis hemorrágica aguda que puede manifestarse con un inicio repentino con depresión, anorexia, vómitos frecuentes, babeo, diarrea por malabsorción provocada por la necrosis epitelial del intestino, dolor abdominal, apatía, deshidratación, hipoglucemia y fiebre. La sepsis, el shock hipovolémico o las invaginaciones intestinales pueden desarrollarse como complicaciones. Además de los síntomas gastrointestinales, la neutropenia y la linfopenia son hallazgos típicos del parvovirus, que dan como resultado un sistema inmunológico debilitado, lo que permite el establecimiento de infecciones secundarias.

Las anomalías más comunes que se encuentran en los parámetros hemáticos son leucopenia, neutropenia y linfopenia. Iris et al. (2010) encontraron que sólo alrededor de un tercio de los perros tenían leucopenia, esta puede desarrollarse después de la aparición de signos gastrointestinales. Contrariamente, se ha visto también que algunos animales presentan

leucocitosis debido a neutrofilia y monocitosis. Los animales a menudo desarrollan hipoalbuminemia, ya que la destrucción de la barrera intestinal conduce a graves pérdidas de proteínas. La sepsis puede resultar de la translocación bacteriana, que se ve favorecida por la neutropenia, con la consecuente liberación de toxinas en el torrente sanguíneo.

La tasa de mortalidad por la infección con CPPV-1 en los cachorros puede llegar a un 70%; pero es menor al 1% en perros adultos. Si los animales sobreviven a la infección aguda, normalmente se produce la recuperación completa (Flores, 2007; Hoelzer y Parrish, 2010; Decaro y Buonavoglia, 2012; Gerlach et al., 2020).

Decaro et al. (2005a) describieron que en animales naturalmente infectados se puede detectar el virus en heces hasta por 7 días por la técnica de aglutinación, por 12 días mediante el aislamiento viral y hasta por 46 días aproximadamente utilizando qPCR.

No existe un tratamiento específico que actúe directamente frente al agente causal, por lo tanto, la terapia se basa principalmente en el tratamiento sintomático. Este consiste en conseguir un volumen circulatorio eficaz, compensando la marcada deshidratación de los animales; mantener el equilibrio electrolítico debido a las pérdidas producidas por los vómitos y la diarrea profusa; compensar la hipoglucemia provocada por la incapacidad del hígado inmaduro para sintetizar glucosa en el caso de los cachorros menores a 3 meses de edad; controlar los vómitos, para detener la pérdida de líquidos y permitir la ingesta oral lo antes posible; analgesia debido al dolor abdominal intenso provocado por la gastroenteritis masiva, el cual se puede exacerbar por una posible intususcepción; por último es muy importante controlar las infecciones bacterianas secundarias, con el fin de evitar el establecimiento de sepsis (Greene, 2012; Gerlach et al., 2020).

2.3 Ozonoterapia

El ozono puede ser usado como terapia complementaria en una gran variedad de patologías agudas y crónicas. A pesar de ser uno de los oxidantes más potentes, también promueve la acción de las enzimas antioxidantes, estimula el sistema inmune e inactiva patógenos. Hoy en día se cuenta con una amplia bibliografía respaldando su acción terapéutica paradójica, ya que a pesar de su papel como molécula oxidante, aumenta las propiedades antioxidantes de las estructuras afectadas por patologías (Sciorsci et al., 2020).

Se tiene registro de su uso desde la primera guerra mundial, donde fue utilizado para tratar heridas gangrenadas en los soldados alemanes. En la década de los 70' con el desarrollo del primer generador de ozono médico, el cual permitió dosificar exactamente el ozono administrado, esta terapia comenzó a expandirse progresivamente (Bocci et al., 2009). Hoy en día el ozono es considerado una pro-droga, ya que puede inducir la activación de

un segundo mensajero en una cascada con múltiples acciones sistémicas y el consiguiente reordenamiento de las vías bioquímicas (Sciorsci et al., 2020). El ozono se disuelve en el agua del plasma activando una serie de reacciones, las cuales por un lado agotan el ozono, mientras que por otro lado generan nuevos compuestos químicos capaces de desencadenar una sucesión de reacciones bioquímicas. Se generan mensajeros reales del ozono como el peróxido de hidrógeno (compuesto de acción rápida), y compuestos de acción tardía como lo son los productos de la oxidación de lípidos (LOPs). Entonces, la ozonoterapia no puede explicarse por una única interacción directa entre la molécula y su receptor, sino por la cantidad de mensajeros formados y por el diferente destino y vida en el organismo de los mismos, por tanto, se la considera un modificador de la respuesta biológica (Bocci et al., 2009). En su efecto farmacológico el ozono médico sigue el principio de la hormesis: dosis bajas muestran una alta eficacia, la cual disminuye con el aumento de la dosis, finalmente invirtiéndose hasta un efecto cuestionable e incluso tóxico (Viebahn-Hänsler et al., 2012).

La línea entre la efectividad y la toxicidad del ozono puede ser dependiente del nivel de estrés oxidativo (Sagai y Bocci, 2011). El estrés oxidativo se relaciona con la patogenia de muchas enfermedades y afecciones inflamatorias. Se produce cuando el equilibrio redox dentro de la célula se altera debido a una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la deficiencia del sistema antioxidante contrarrestante (Panda et al., 2009), estas ROS modifican macromoléculas de relevancia (ADN, proteínas, lípidos, carbohidratos). Cuando aplicamos ozono medicinal provocamos un pequeño, controlado y transitorio estrés oxidativo que demanda de la célula una activación del sistema antioxidante endógeno. Las células pueden inducir rápidamente respuestas biológicas contra el estrés oxidativo para mantener la homeostasis y adaptarse a dicho estrés, asimismo se estimula la producción de factores nucleares promotores de diversas respuestas biológicas contra el stress (Sagai y Bocci, 2011).

El ozono al disolverse en el agua del plasma reacciona con los ácidos grasos insaturados formando una mezcla de productos lípidos ozonizados (LOPs), entre los principales encontramos radicales lipoperoxilo, hidroperóxidos, malonildialdeído, isoprostanos, el ozónido y alquenilos, y 4-hidroxinenal (4-HNE). Asimismo, reacciona con el agua formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Khan et al., 2017). A través de la membrana celular y el citosol, el H_2O_2 promueve la activación de la vía del factor nuclear derivado del eritroide 2 (Nrf2), este activa la transcripción de elementos de respuesta antioxidante (ARE) y la síntesis de proteínas que favorecen la supervivencia celular (Sciorsci et al., 2020). La degradación de 4-HNE envía una rápida señal de un stress oxidativo transitorio, activando la síntesis de varias sustancias como la γ -glutamil transpeptidasa (una enzima glicosilada que cataliza la transferencia del γ -glutamilo de los péptidos donados a los diferentes receptores, incluyendo aminoácidos, dipéptidos y H_2O), proteína de choque térmico (HSP-70, una proteína inducida por la respuesta fisiológica de las

células al estrés), hemo oxigenasa-1 (de respuesta generalizada al estrés oxidativo) y enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px), catalasa (CAT) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Este proceso explica la acción paradójica del ozono por el cual una molécula oxidante, desencadena una potente reacción antioxidante disminuyendo los ROS circulantes (Sciorsci et al., 2020). Se describe un posible mecanismo por el cual la ozonoterapia activa el sistema inmune mediante la activación de los factores nucleares NFAT, y del factor nuclear kappa B (NF- κ B), y del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Estos inducen la producción de citocinas, como IL-2, TNF alfa, IL-6, IFN γ , IL-8 e IL-1 β . El ozono, a su vez, también induce la acción de otros mediadores inmunes, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y un aumento en los niveles de IFN γ . Por otro lado, bajas dosis de ozono aumentan la secreción por parte de macrófagos y leucocitos e inhiben la síntesis de prostaglandinas y la liberación de bradiquinina (Sagai y Bocci, 2011; Díaz et al., 2013; Céspedes-Suarez et al., 2019; Sciorsci et al., 2020). A través de la oxidación de los enlaces dobles, el ozono posee la capacidad única de inactivar los contaminantes biológicos (virales y bacterianos) (Bruice, 2001). Esta actividad virucida y bactericida ha sido estudiada buscando tratamientos para diversas enfermedades con resultados exitosos. La capacidad de reducir la infectividad viral del ozono es a través de la peroxidación de lípidos y la peroxidación de proteínas. La peroxidación de proteínas se define como las modificaciones covalentes de las mismas directamente por su interacción con ROS, o indirectamente por su interacción con productos secundarios del estrés oxidativo. Este fenómeno desempeña un papel fundamental en la inactivación de virus desnudos (Murray et al., 2008). Varios estudios demuestran la efectividad del ozono para inactivar enterovirus en aguas, así como su efecto virucida en superficies (Thurston-Enriquez et al., 2004; Hudson et al., 2007; Tseng y Li, 2008). Petry et al. (2014) en su trabajo estudiaron la capacidad virucida *in-vitro* del ozono frente a dos Herpesvirus (Herpes Simplex Virus 1 – HSV-1 y Bovine Herpes Virus 1 – BoHV-1). Concluyeron que la exposición al ozono reduce la replicación viral en más de un 90% para ambos virus. El experimento llevado a cabo por Murray et al. (2008) también demuestra la capacidad virucida *in-vitro* del ozono frente a varios virus envueltos y desnudos (herpes simplex virus tipo 1, vesicular estomatitis Indiana virus, vaccinia virus, adenovirus tipo-2, e influenza A virus). Shinozuka et al. (2008) demostraron que la exposición de una preparación de *E. coli* al ozono indujo una menor liberación de endotoxinas a la inducida por los antibióticos.

La ozonoterapia puede ser aplicada de forma sistémica o local. Las vías sistémicas son autohemoterapia mayor (AHM), sueros ozonizados o mediante la aplicación de gas intrarrectal. La vía intrarrectal es una vía de fácil acceso, mínimo disconfort y de rápida administración. En la mucosa colorrectal, el ozono se disuelve inmediatamente en el agua que recubre el epitelio y reacciona con el mucus o mucoproteínas, heces y cualquier otra

molécula presente en dicha película líquida, generando así peróxido de hidrógeno y LOPs. Sólo los LOPs, se absorben a través de los vasos linfáticos y capilares, llegando primero al hígado y luego entrando en la circulación general (Bocci et al., 2000). La concentración que representa niveles fisiológicamente eficaces para la aplicación sistémica de ozono en forma de insuflación rectal debe encontrarse en el rango de 10-40 µg ozono/ml (Viebahn-Hänsler et al., 2012).

Se han publicado diversos trabajos documentando la acción terapéutica del ozono para una variedad de patologías, tanto en medicina humana como veterinaria (Ogata y Nagahata, 2000; Escarpanter Buliés, 2005; Zobel et al., 2012; Mohammadi et al., 2013; Degli Agosti et al., 2016; Duricic et al., 2016; Hernández Avilés et al., 2016). Asimismo, está indicado para complementar el tratamiento frente a las infecciones virales ocasionadas por herpes simplex, herpes zoster, y Virus de la hepatitis B y C (Viebahn-Hänsler et al., 2012).

Panda et al. (2009) en su estudio concluyen que las gastroenteritis caninas se asocian con niveles elevados de peróxidos lipídicos y alteración de las enzimas antioxidantes lo que sugiere un estado de estrés oxidativo, el cual era más pronunciado cuando el agente causal era el Parvovirus canino, por tanto, sugieren que la incorporación de antioxidantes en el tratamiento o la mejora del estado redox del paciente durante la gastroenteritis, puede ayudar a mejorar el proceso de la enfermedad.

Hasta la fecha en la bibliografía se encuentra un solo reporte del uso de ozono como terapia complementaria en animales con gastroenteritis hemorrágica causada por CPV-2 utilizando la técnica de autohemoterapia mayor ozonizada. Los autores reportan una recuperación en el 87% de los caninos incluidos en el ensayo (Ortega y Pérez, 1989).

2.4 Diagnóstico de la infección por CPPV-1

Dado que la exactitud del diagnóstico clínico de esta enfermedad es de aproximadamente un 60% (Mazzaferro, 2020), este siempre debe ser confirmado por análisis de laboratorios, ya que CPPV-1 comparte sintomatología con otras patologías (Decaro y Buonavoglia 2012; Mylonakis et al., 2016). El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad se realiza mediante la búsqueda del agente viral en las heces de los animales sospechosos, asimismo, en las últimas etapas de la infección se puede detectar el virus en sangre ya que se observa una viremia excepcionalmente prolongada (Desario et al., 2005). Para el diagnóstico se emplean varias estrategias como ser técnicas basadas en las reacciones antígenos anticuerpos, técnicas basadas en las características biológicas del virus, identificación de partículas virales por microscopio electrónico y técnicas moleculares (Desario et al., 2005; Mazzaferro, 2020).

2.4.1 Pruebas basadas en la interacción antígenos-anticuerpos

Para el diagnóstico de esta enfermedad se han desarrollado test de ELISA y de inmunocromatografía (IC). Estos últimos son test de rápida ejecución, los únicos disponibles para ser utilizados a campo, pero presentan menor sensibilidad al ser comparados con las técnicas moleculares (Decaro et al., 2005a; Decaro y Buonavoglia 2012). Su principal desventaja es que, frente a la sospecha de parvovirus canino, un resultado negativo siempre se debe confirmar con técnicas moleculares (Mazzaferro, 2020).

Las técnicas de IC al ser comparadas con las moleculares, demuestran una sensibilidad de aproximadamente el 50%, mientras que su especificidad es del 100%. Posiblemente la baja sensibilidad esté dada por la unión de los anticuerpos presentes en la materia fecal a los viriones, impidiendo así la detección de los mismos (Decaro et al., 2005a; Decaro y Buonavoglia 2012; Decaro et al., 2013). Se cree que el efecto dilución efectuado por la diarrea, y el muestreo en etapas tempranas de la infección, con causas de los resultados falsos negativos en este test. Por otro lado, se describe que, aunque muy infrecuentemente, una vacunación reciente puede interferir dando resultados falsos positivos (Mylonakis et al., 2016). Finalmente, se reporta que para que esta técnica pueda detectar la presencia viral en las heces, las mismas deben contener una carga viral superior a 10^6 copias de ADN/mg de heces (Decaro et al., 2013, Mazzaferro, 2020).

En cuanto a la técnica de ELISA, es útil para analizar un número elevado de muestras de materia fecal de animales sospechosos. El análisis realizado por Kumar et al. (2010) describe una sensibilidad de aproximadamente 88%, por lo cual sugieren que es recomendable para usar como screening en ambientes con alta densidad poblacional donde se sospeche de esta patología.

Se han reportado otras técnicas para evidenciar la unión antígeno-anticuerpo entre ellas la microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés), a la cual se le describe una sensibilidad de 95% y una especificidad de 98% (Kim et al., 2015). Esta técnica no ha sido muy difundida, ya que para el desarrollo de la misma son necesarios equipamientos específicos.

2.4.2 Pruebas basadas en las características biológicas

Las técnicas basadas en características biológicas, como lo son la medición de la capacidad hemaglutinante mediante la prueba de Hemaglutinación (HA), y la capacidad infectiva, analizada mediante el aislamiento viral, se pueden realizar únicamente en laboratorios especializados con la infraestructura adecuada. Sin embargo, la principal desventaja de estas técnicas son su baja sensibilidad, posiblemente a causa de los anticuerpos presentes en la luz intestinal de los animales infectados. Estos anticuerpos opsonizan los viriones impidiendo tanto la HA como la unión del virus a los

receptores celulares y, por tanto, el aislamiento (Desario et al., 2005; Segev et al., 2022).

Además de su baja sensibilidad al compararla con las pruebas moleculares, la HA necesita eritrocitos frescos para su realización, y la calidad de los mismos es determinante para los resultados. Los eritrocitos utilizados generalmente son de cerdo, ya que son los más fáciles y económicos de obtener, aunque también se pueden utilizar eritrocitos de mono rhesus o gatos (Desario et al., 2005). Factores como el estrés o algunas enfermedades pueden alterar el coeficiente de sedimentación de los eritrocitos, alterando por tanto el resultado de la técnica. Pero, esta técnica presenta la ventaja de que su realización es rápida y en cuatro horas se obtiene un resultado (Decaro et al., 2005a).

Por otro lado, a pesar de que el aislamiento viral es la técnica *gold standard* para analizar la infectividad viral, para el diagnóstico presenta desventajas como lo son su baja sensibilidad, la infraestructura necesaria, el personal capacitado, el tiempo necesario para obtener resultados (5-8 días) y la necesidad de pruebas confirmatorias posteriores como lo son la HA o técnicas moleculares (Decaro y Buonavoglia 2012).

2.4.3 Pruebas moleculares

Desde la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1985, la PCR ha sido utilizada en el diagnóstico molecular de enfermedades genéticas, patógenos, y oncogenes. En las últimas tres décadas, la PCR ha evolucionado desde la PCR de punto final, pasando por la PCR en tiempo real diseñada en 1992, hasta su versión actual, que es la PCR digital cuantitativa absoluta (dPCR) (Cao et al., 2016).

Las técnicas moleculares se consideran los métodos más precisos y sensibles para el diagnóstico de CPPV-1 (Desario et al., 2005; Segev et al., 2022). La ventaja de estas técnicas es que no se ven afectadas por la respuesta inmune, sin embargo, demandan tiempo, y el trabajo de personal capacitado (Decaro y Buonavoglia 2012). Por otro lado, animales sin sintomatología o con diarreas crónicas pueden dar resultados positivos por estas técnicas, debido a su alta sensibilidad, siendo esto un hallazgo de importancia clínica incierta (Mylonakis et al., 2016).

Otras técnicas moleculares descritas para esta patología son la Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP por sus siglas en inglés), a la cual se le describe mayor sensibilidad que la PCR convencional y la *nested-PCR* (Mukhopadhyay et al., 2012; Parthiban et al., 2012)

2.4.3.1 Aplicación de la PCR convencional y tiempo real para el diagnóstico de CPPV-1

La PCR en tiempo real (*qPCR*) es una técnica sensible, específica, reproducible, que permite la detección y cuantificación del ácido nucleico de CPV-2 en pocas horas. Además, se le describe menor riesgo de contaminación por arrastre que con la PCR convencional (Desario et al., 2005). Varios trabajos reportan mayor sensibilidad de la *qPCR* que la PCR convencional para la detección de este patógeno (Decaro et al., 2005b; Mech et al., 2012; Yip et al., 2020).

Decaro et al. (2005b) describieron una *qPCR* para el diagnóstico de las 3 variantes del parvovirus canino (CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c) capaz de realizar una cuantificación precisa de ADN en un rango de ocho órdenes de magnitud (de 10^2 a 10^9 copias de ADN blanco). Asimismo, demostraron una mayor sensibilidad frente a técnicas basadas en la interacción antígeno-anticuerpo, además de la PCR convencional. Mech et al. (2012) describen una *qPCR* con una especificidad y sensibilidad del 100%, con una detección mínima en una dilución de 10^4 de la dosis TCID₅₀/ml (con un promedio de 6.33×10^5 TCID₅₀/ml). Por otro lado, Yip et al. (2020), reportaron nuevamente una mayor sensibilidad de *qPCR* al compararla con otros métodos tradicionales y la PCR convencional. El límite de detección de la prueba *qPCR* en materia fecal determinado en este estudio fue de aproximadamente $8,3 \times 10^8$ partículas virales por gramo de heces, siendo *qPCR* casi 7000 veces más sensible que los métodos de detección de antígeno (IC).

Debido a la alta sensibilidad y reproductibilidad de la técnica *qPCR*, la cual permite identificar los caninos que excretan mínimas cargas virales al ambiente, se la considera una herramienta útil para ayudar a adoptar medidas adecuadas de profilaxis para prevenir la infección por CPV, especialmente en perreras y refugios, donde este virus suele ser responsable de epizootias dramáticas (Decaro y Buonavoglia 2012).

2.4.3.2 Droplet digital PCR como nueva herramienta para el diagnóstico de CPPV-1

La PCR digital (*dPCR*) es un método estadístico que divide una muestra en numerosas particiones y permite la enumeración de particiones positivas y negativas para determinar la concentración de una secuencia objetivo presente en una muestra. *dPCR* es un método de cuantificación absoluta que no se basa en curvas de calibración y cuya precisión es más fácilmente predecible (Quan et al., 2018). Es una técnica cuantitativa de ácido nucleico con una sensibilidad incomparable, donde una cantidad mínima de ácido nucleico es suficiente para obtener resultados cuantitativos confiables. El término "digital" representa el cambio de señal (por ejemplo, fluorescente o no fluorescente) en entidades individuales (Cao et al., 2016).

En la droplet digital PCR (*ddPCR*) la muestra es dividida en 20.000 gotas, resultando en que las moléculas de ADN pueden estar completamente dispersas en las gotas separadas, las cuales contendrán moléculas "0" o "1" (es decir, reacción negativa o positiva), antes del proceso de amplificación. Para formar las gotas se produce una emulsión con aceite y la solución mix de PCR, en el cartucho microfluídico se generan gotas con un volumen de nanolitros, cada una de estas gotas actúa como un tubo de reacción en donde se lleva a cabo el proceso de amplificación. Dado que la concentración molecular de ADN es mucho menor que la cantidad de gotas, la mayoría de las gotas contienen una o ninguna molécula objetivo bajo la guía de la distribución de Poisson, permitiendo la medición de miles de eventos de amplificación independientes dentro de una sola muestra. Los productos de amplificación generalmente se detectan mediante señales fluorescentes y las gotas contienen una única molécula molde que produce señales positivas. Los casos excepcionales con dos o más objetivos producirían una intensidad de fluorescencia inusual que se puede utilizar para eliminarlos. Por tanto, la reacción de PCR se lleva a cabo en cada gota y las gotas se recogen para el análisis de fotomultiplicador (PMT), cuya tecnología es similar a la citometría de flujo. Durante la amplificación, sólo las gotitas que contienen moléculas de ADN diana acumularán fluorescencia.

La interpretación de una señal de fluorescencia es "1", mientras que el opuesto es "0", en el que el valor umbral se determina en función de la distribución de Poisson de la fluorescencia. Los datos se registran mediante el software de imágenes basado en la amplitud de fluorescencia utilizando el lector de gotas (PMT). Dado que se conoce el número total de gotas, se obtiene la proporción de gotas positivas (que contienen ADN blanco) y se calcula la concentración de ADN blanco en la muestra (Cao et al., 2016).

En comparación con la *qPCR*, la PCR digital demostró presentar una mayor sensibilidad y especificidad para muestras con una carga de patógeno baja (Li et al., 2018; Falzone et al., 2020). Los primers y sonda diseñados para el ensayo de *qPCR* pueden ser utilizados para poner a punto esta nueva tecnología, como ha sido reportado en la literatura (Lillsunde Larsson y Helenius, 2017). Asimismo, esta técnica puede ser utilizada para la detección viral en una amplia gama de fluidos corporales, incluyendo los hisopados rectales (Scutari et al., 2020).

En los últimos años se ha reportado su uso para el diagnóstico de varias enfermedades infecciosas virales (Hayden et al., 2013; Taylor, et al., 2015; Li et al., 2018; Park et al., 2021). Con respecto a la Familia *Parvoviridae*, hasta la fecha existe un reporte del uso de esta técnica. Baylis et al. (2020) describieron la presencia de un nuevo parvovirus como contaminante de los sueros fetales bovinos, el cual pertenece al género *Copiparvovirus*. La *ddPCR* fue capaz de detectar ~ 50,000 copias/ml de SFB.

3. HIPÓTESIS

1. El ozono presenta efecto deletéreo para el *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1) *in-vitro*, asimismo mejora la respuesta clínica al tratamiento convencional en caninos naturalmente infectados por esta virosis.
2. La Droplet digital PCR (*ddPCR*) es capaz de detectar cargas virales mínimas en hisopados rectales de caninos cursando y ya recuperados de la infección por *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1)

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del ozono *in-vitro* e *in-vivo* sobre el *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1) y estandarizar una nueva herramienta para la cuantificación viral en materia fecal.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto virucida del ozono en cultivos celulares infectados con CPPV-1
2. Evaluar el efecto de la ozonoterapia en el tratamiento clínico de caninos naturalmente infectados con CPPV-1
3. Cuantificar la carga viral absoluta de CPPV-1 mediante Droplet digital PCR en caninos naturalmente infectados y tratados o no con ozono.
4. Determinar el título de anticuerpos hemaglutinantes contra CPPV-1 en caninos infectados naturalmente tratados o no con ozono.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales y métodos para el objetivo específico 1

5.1.1 Expansión viral en cultivos celulares

Se cultivaron células de la línea CRFK mantenidas en medio esencial mínimo de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10% y 1,25 mg/mL de gentamicina en botellas de cultivo a 37° C y una atmósfera de 5% de CO₂. Una muestra de referencia de CVP-2 obtenida a partir del aislamiento del virus vaccinal en dicha línea celular y mantenida en el banco del laboratorio de Virología de Facultad de Veterinaria se expandió en cultivos celulares CRFK y se obtuvo un inóculo viral. Cuando la monocapa de células CRFK presentaba una confluencia de 100%, se realizó un subcultivo el cual fue inoculado con una suspensión viral de un título aproximado de 10³ TCIDC₅₀. Luego, se incubó en estufa a 37° C con 5% de CO₂ hasta la aparición del efecto citopático característico. Se obtuvo un inóculo viral de 50 ml, que fue congelado y descongelado 3 veces y luego dividido en 3 alícuotas. Una de estas se utilizó como control de virus y las otras 2 alícuotas (denominadas A y B), se les aplicó el tratamiento con ozono en una cabina de flujo laminar.

5.1.2 Tratamiento con ozono al CPPV-1

La alícuota A se expuso al tratamiento con ozono a una concentración similar a la utilizada en el tratamiento clínico. Durante 10 minutos se aplicó la mezcla de gases oxígeno/ozono a una concentración de ozono de 17 µg/ml mediante burbujeo directo con materiales estériles. Por otra parte, a la alícuota B se le aplicó una concentración de ozono de 55 µg/ml durante 10 minutos. Finalmente, las alícuotas control viral, la A y la B fueron almacenadas en microtubos ARN y ADNasa free en freezer de -80° hasta su procesamiento.

5.1.3 Hemaglutinación viral

Las alícuotas virus control, A y B fueron procesadas mediante la técnica de hemaglutinación. Brevemente en placas de 96 pocillos con fondo "U" se colocaron 50 µl de solución buffer y en la primera fila de la placa se colocaron 50 µl de cada una de las alícuotas y luego se realizaron diluciones seriadas en base 2 hasta la fila 11. En todos los pocillos se colocaron 50 µl de una suspensión de eritrocitos suinos al 0,5%. La fila 12 se utilizó como control de eritrocitos. Se incubó *overnight* a 4° C y se realizó la lectura determinando la mayor dilución de la alícuota en la cual se observó hemaglutinación total, correspondiendo la misma a 1 unidad hemaglutinante (UHA)/50µl. Cada una de las alícuotas se estudió por duplicado.

5.1.4 Observación en Microscopio Electrónico de Transmisión (M.E.T.).

Las 3 alícuotas virales (control, virus A y virus B) fueron procesadas 24 horas antes de su visualización en el M.E.T. Para el procesamiento se tomó 1ml de cada alícuota y se realizó una primera centrifugación a 4° y una fuerza de 4000g durante 15 minutos. Se recuperó el sobrenadante y colocó en un nuevo microtubo ARN-ADNasa free, bajo condiciones de esterilidad se les adiciono glutaraldehído alcanzando una concentración final de 2.5% del mismo. Dicha mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, posteriormente se incubó durante 2 horas a 4°. Una vez finalizados los pasos de incubación, a cada alícuota viral se les agregó buffer cacodilato 0.1M alcanzando un volumen final de 2ml. Se realizó un segundo paso de centrifugación a una fuerza de 50.000g a 4° durante 3 horas. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 3 ml de buffer cacodilato resuspendiendo el pellet repetidas veces. Se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente y se repite el paso de centrifugación a 50.000g a 4° durante 3 horas. Una vez finalizado, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 30 µl de buffer cacodilato. Una vez procesadas las muestras fueron mantenidas refrigeradas hasta su procesamiento y visualización en el M.E.T. Previo a su visualización cada muestra fue procesada mediante tinción negativa con Acetato de Uranilo Acuoso 1%. Las alícuotas virales fueron visualizadas utilizando un Microscopio Electrónico de Transmisión - Barrido de Alta Resolución marca JEOL 2100 200kV, LaB6. Cámara CCD Orius 1000 de GATAN, con sonda EDS Oxford X-Max 65 T.

5.1.5 Cuantificación viral mediante Droplet digital PCR (ddPCR)

Para cuantificar la carga viral en cada una de las alícuotas (control viral, A y B) se puso a punto la técnica de droplet digital PCR (ddPCR), adaptando el protocolo de qPCR descrito por Streck et al. (2013) y utilizando como control positivo una muestra de campo previamente confirmada como positiva por qPCR en el laboratorio de diagnóstico del Hospital Veterinario Escuela.

Asimismo, se envió a sintetizar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) un plásmido utilizando el vector pUC57, al cual se le insertó la secuencia de 202 pb detectada por los primers diseñados por Streck et al. (2013), la cual codifica una parte de la proteína de la cápside VP2.

Para la extracción del material genético, en primer lugar, se realizó la técnica de fast boiling, donde brevemente se colocaron 500 µl de muestra a hervir durante 10 minutos e inmediatamente se colocaron en hielo durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 minutos y se extrajo el sobrenadante. Para la extracción de ADN viral a partir de dicho sobrenadante se utilizó un kit comercial (ZR Viral DNA Kit™, Zymo Research), siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se visualizó la calidad del ADN en geles de agarosa al 1% teñido con GoodView™ nucleic acid stain (SBS Genetech ©).

Con el fin de evaluar la extracción del ADN se realizó una PCR a tiempo final del gen constitutivo codificante para la enzima GADPH, utilizando los cebadores 5'-CTGAGAAGCGGAAGCTTGTC-3' (*Forward*) y 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (*Reverse*). Las condiciones de la corrida utilizadas fueron una desnaturalización inicial durante 4 minutos a 95°, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°, 1 minuto a 60.6° y 1 minuto a 72°, con una extensión final a 72° durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con GoodView™.

Posteriormente se realizó una PCR a tiempo final frente a la proteína VP2 del CPV comprobando la presencia del genoma viral blanco en las muestras. Se utilizaron los cebadores descritos por Streck et al. (2013) y empleados para la realización de la *ddPCR*. Para la realización de la PCR a tiempo final se mezclaron 12, 5 µl de PCR master mix, 1 µl de cada uno de los cebadores, 9,5 µl de agua destilada ultrapura y 1 µl del ADN blanco. Las condiciones de la corrida fueron 15 segundos a 95° para una desnaturalización primaria del ADN, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95°, 30 segundos a 60° y 30 segundos a 72°, con una extensión final de 5 minutos a 72°. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con GoodView™. Una vez obtenidos los amplicones se seleccionaron al azar 3 y fueron purificados y secuenciados por MacroGen Inc., Seúl, Corea del Sur.

Para la *ddPCR* se utilizó un equipo QX200 Droplet Digital PCR (*ddPCR*) System Bio Rad adaptando el protocolo descrito por Streck et al. (2013) para la técnica de *qPCR*. Se utilizaron las secuencias de cebadores 5'-TGGAAGTAGTGGCACACCAA-3' (*Forward*) y 5'-AAATGGTGGTAAGCCCAATG-3' (*Reverse*), y la sonda de hidrólisis Taqman 5'-CAGGTGATGAATTTGCTACAGG-3' marcada con el fluoróforo 6-carboxyfluorescein (FAM) en el extremo 5' y por desactivador de fluorescencia BlackBerry Quencher (BBQ) en el extremo 3'. La técnica se realizó mezclando 10 µl *ddPCR* Supermix for probes (Bio Rad), 1.8 µl de primer Forward (900uM), 1.8 µl de primer Reverse (900uM), 1 µl de sonda (250uM), 1 µl de ADN y 4.4 µl agua destilada ultrapura, componiendo un volumen final de 20 µl. Las condiciones de corrida fueron: una activación de la enzima de 10 min a 95° C, seguida de 40 ciclos de 30 segundos a 94° C, 1 minuto a 58° C y una desactivación de la enzima de 10 minutos a 98° C. La carga viral fue determinada utilizando el software QuantaSoft.

Asimismo, se realizaron procesos de digestión enzimática, tanto del plásmido como de 2 muestras, utilizando la enzima FastDigest HindIII (Thermo Scientific). Brevemente se mezclaron 1 µl de ADN, 2 µl de enzima, 2 µl de buffer de digestión y 15 µl de agua destilada ultrapura, se incubaron 1 hora a 37° y posteriormente 20 minutos a 80° para la inactivación de la enzima.

5.1.6 Viabilidad celular mediante la técnica de reducción del MTT

Para determinar la viabilidad celular luego de la inoculación con las alícuotas de CPPV-1, se utilizó el protocolo descrito por Petry et al. (2014) de reducción del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol) (Invitrogen). Brevemente, para el ensayo MTT se retiró el medio de cultivo y se agregó medio de cultivo fresco con 50 µl de MTT (1 mg / ml) y las células se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ durante 4 hs. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y los cristales de formazan se disolvieron en 100 µl de DMSO. La absorbancia se midió a 550 nm en un lector de ELISA.

Para la estandarización del ensayo se realizaron pruebas preliminares cultivando células de la línea CRFK en diferentes condiciones de viabilidad celular. Para esto, en placas de 96 pocillos se sembraron 20.000 células con las siguientes condiciones: 1. células sin suero fetal bovino, 2. células con 5% de suero fetal bovino, 3. células con 20% de suero fetal bovino, 4. células con 10% de suero fetal bovino y 3% de DMSO, 5. células con 10% de suero fetal bovino y 10% de DMSO. Como control, se utilizaron células en condiciones normales de cultivo con 10% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas y se les realizó el ensayo de reducción del MTT. Posteriormente y una vez estandarizado el método, se realizó el ensayo con las alícuotas virales almacenadas a -80° C. Para esto en placas de 96 pocillos se sembraron 20.000 células por pocillos y se inocularon con 100 µl de diluciones crecientes de cada una de las alícuotas por quintuplicado. Se incubaron durante 48 horas a 37° C con 5% de CO₂ y se les realizó el ensayo de reducción del MTT para cuantificar la viabilidad celular.

5.2 Materiales y métodos para el objetivo específico 2

5.2.1 Conformación de los grupos de estudio

Para incluir los animales en el ensayo clínico los criterios de inclusión utilizados fueron presentar sintomatología compatible con esta enfermedad y un diagnóstico confirmatorio de CPPV-1 mediante técnicas moleculares. A los caninos que llegaron al Hospital Veterinario Escuela con sintomatología sospechosa de Parvovirus canina se les confirmó la infección mediante qPCR realizado en el laboratorio de diagnóstico de dicho centro hospitalario. Una vez confirmada la infección se dividieron en 2 grupos utilizando el programa Research Randomizer (<https://www.randomizer.org/>). Un primer grupo, el grupo A, recibió el tratamiento clínico convencional para esta patología, y el segundo grupo, el grupo B, recibió el tratamiento clínico convencional más ozonoterapia concomitante.

5.2.2 Tratamiento con ozono en caninos naturalmente infectados

La terapia consistió en la aplicación de una mezcla de los gases oxígeno y ozono, este último no sobrepasando el 5% de la mezcla. El tratamiento se aplicó mediante la introducción de una cánula en el recto aproximadamente 3 cm e insuflando la mezcla de gases. Se aplicó el tratamiento el día de ingreso al Hospital veterinario y cada 48 horas durante el tiempo de internación de los caninos. Basadas en la Declaración de Madrid sobre la Ozonoterapia (Schwartz et al., 2015), se extrapolo la dosis a utilizar a partir de patologías humanas comparables a la estudiada en este ensayo. Se determinó utilizar una dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y un volumen de 1.4 ml/kg, completando una dosis final de 28 $\mu\text{g}/\text{kg-pv}$ de los animales incluidos en el ensayo clínico.

5.2.3 Tablas de seguimiento para el status clínico

Se diseñaron tablas con ponderación numérica para los siguientes parámetros: consistencia de las heces, presencia de sangre en heces, frecuencia de vómitos, respuesta frente al estímulo verbal (ver Anexo I). Dichas tablas fueron completadas diariamente registrando el avance clínico de la enfermedad en cada paciente. Las mismas fueron completadas por la estudiante que realiza este trabajo de maestría, teniendo en cuenta que conocía a qué grupo pertenecía cada animal, se siguió una rutina estricta de estimulación con cada animal con el fin de disminuir la subjetividad y las diferencias que surgen entre distintos observadores. Asimismo, los veterinarios residentes del Ambulatorio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Veterinario Escuela colaboraron con el registro de la evolución clínica en frecuencia de vómitos, consistencia de las heces y presencia de sangre en las mismas.

5.2.4 Hemogramas diferenciales de los caninos incluidos en el ensayo

Con las medidas de asepsia correspondientes, se puncionó la vena yugular de los caninos y se extrajo aproximadamente 1 ml de sangre en tubo con anticoagulante EDTA. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio de análisis clínicos del Hospital Veterinario Escuela para su procesamiento y análisis. Se tomaron muestras cada 48 horas de cada canino durante su periodo de internación en el Hospital.

5.3 Materiales y métodos para el objetivo específico 3

5.3.1 Toma de muestras de hisopado rectal de los caninos incluidos en el ensayo

Utilizando un hisopo estéril, se introdujo en el ano de los animales infectados aproximadamente 1 cm, realizando movimientos circulares y luego el mismo fue sumergido en un microtubo conteniendo 1 ml de suero fisiológico estéril, presionado en las paredes del tubo para la obtención de las muestras que posteriormente fueron utilizadas para analizar la excreción viral. Dichos microtubos fueron rotulados y almacenados a -80° C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Virología en la Facultad de Veterinaria. Las muestras fueron extraídas el día de ingreso de los caninos al Hospital Veterinario Escuela, a los 15 días y a los 30 días luego de su ingreso al centro hospitalario.

5.3.2 Cuantificación de la excreción viral de CPPV-1 en materia fecal

Para la cuantificación absoluta viral en materia fecal se centrifugaron los microtubos conteniendo suero fisiológico en los que había sido sumergido el hisopado rectal a 3000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar detritos de las muestras a analizar. Se colectó el sobrenadante y se almacenó en el freezer de -80° hasta su procesamiento en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria (UdelaR, Montevideo-Uruguay). Posteriormente para la extracción del material genético y cuantificación de las copias virales presentes se utilizó el mismo protocolo descrito previamente en el punto 5.1.5.

5.4 Materiales y métodos para el objetivo específico 4

5.4.1 Toma de muestras de suero sanguíneo de los caninos incluidos en el ensayo

Con las medidas de asepsia correspondientes, se puncionó la vena yugular de los caninos y se extrajo aproximadamente 1-2 ml de sangre en tubo seco. Luego de coaguladas, las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 3000 rpm y se separaron los sueros sanguíneos que fueron almacenados en microtubos. Estos fueron rotulados y conservados a -80° C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Virología en la Facultad de Veterinaria - UdelaR. Las muestras fueron extraídas el día de ingreso de los caninos al Hospital Veterinario Escuela, a los 15 días y a los 30 días luego de su ingreso al centro hospitalario.

5.4.2 Cuantificación de anticuerpos contra CPPV-1 mediante Inhibición de la hemaglutinación

Las muestras de suero fueron procesadas mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación descrita por Carmichael et al. (1980). Previo a la realización de la técnica, las muestras fueron tratadas mediante inactivación del sistema del complemento en baño María a 56° durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron a temperatura ambiente con una suspensión de Caolín al 25% durante 30 minutos, y luego fueron centrifugados durante 10 minutos a 2000 rpm quedándonos con el sobrenadante. Finalmente, los sueros se incubaron con una suspensión al 50% de eritrocitos suinos durante 1 hora a 4°, luego se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm y se recolectó el suero sobrenadante para poder ser estudiado. Para la realización de la técnica en placas de 96 pocillos se colocaron desde la fila 2 hasta la fila 11, 25 µl de solución buffer, dejando la fila 12 con 50 µl de solución buffer (control). En las filas 1 y 2 se colocaron 25 µl de la muestra de suero tratado, y a partir de la fila 2 se realizaron diluciones seriadas en base 2 hasta la fila 9. En la fila 10 se colocaron 25 µl de suero tratado como control de suero sanguíneo. En las filas 1 hasta la 9 se colocaron 25 µl de una solución viral de 8 UHA. En la fila 11 se colocaron 25 µl de virus como control viral. Se incubó la placa durante 2 horas en estufa a 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Luego en todas las filas se colocaron 50 µl de una suspensión de eritrocitos suinos al 0,5%. La fila 12 fue el control de eritrocitos suinos. Se incubó *overnight* a 4° C y se realizó la lectura comenzando por los controles de eritrocitos, virus y posteriormente los sueros tratados. Se determinó la mayor dilución de cada suero en el cual se observaba una inhibición total de la hemaglutinación. Para calcular el título de unidades de inhibición de la hemaglutinación (UIHA), se multiplicó dicha dilución por las 8 UHA utilizadas.

5.5 Análisis estadístico

Para la viabilidad celular según la técnica de MTT, la homocedasticidad de los datos se analizó según la prueba de varianza F para 2 muestras. Según resultó la homocedasticidad o no de los datos, se aplicó el test de Student o al estadístico de Welch respectivamente, considerándose diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0,05$.

Para los parámetros de excreción viral y título de anticuerpos la normalidad en la distribución de los datos, así como la homocedasticidad, fueron abordadas utilizando el test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. La comparación de las variables que no presentaron distribución normal, se realizó mediante el test de Mann Whitney. Los resultados son mostrados como mediana, cuartil 25 y 75.

Las variables clínicas fueron analizadas mediante estadística descriptiva. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SAS versión 9.4 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) y GraphPad Prism versión 9.0.0.

La curva de supervivencia dentro de cada grupo fue realizada empleando el test de Kaplan- Meier y las diferencias estadísticas significativas se consideraron cuando $p < 0,05$.

La comparación entre los grupos para la variante días de internación fue analizada mediante el test de Mann Whitney.

Para analizar los resultados de los componentes hemáticos se aplicó un análisis de medidas repetidas en el tiempo. Grupo, día, y su interacción, fueron considerados como efectos fijos. La comparación entre los promedios de los grupos se realizó empleando PDIFF y ajuste de Tukey. Los resultados están presentados como promedio \pm error estándar (EE).

El test de Mann Whitney fue usado para comparar los resultados de los grupos en los parámetros de excreción viral (resultado de la técnica ddPCR) y título de anticuerpos (resultado de la técnica IHA). Se utilizó un intervalo de confianza de 95% y un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

Para analizar la correlación entre los resultados de excreción viral y los títulos de anticuerpos, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. Los coeficientes de correlación fuerte, moderado y débil, fueron considerados cuando $r > 0,6$; $0,6 \leq r \leq 0,4$ e $r < 0,4$, respectivamente. Se consideró un nivel de significancia cuando $\alpha = 0,05$.

Los gráficos fueron realizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 9.0.0.

6. RESULTADOS

6.1 Capacidad hemaglutinante viral luego del tratamiento con ozono

La técnica de hemaglutinación para el virus control presentó un título de 128 UHA. La alícuota A tratada con una concentración similar a la utilizada en el ensayo clínico (17 $\mu\text{g/ml}$) mostró un título de 32 UHA. La alícuota B tratada con 55 $\mu\text{g/ml}$ de ozono no mostró capacidad hemaglutinante (Cuadro I, Figura 1).

Cuadro I: Resultados de la técnica de hemaglutinación viral con CPPV-1 tratado con ozono de forma *in-vitro*. Se muestran los resultados de los títulos de las Unidades Hemaglutinantes (UHA) del control viral (sin ozono) y ambas alícuotas tratadas con diferentes concentraciones de ozono.

Muestra	Título en UHA
Alícuota control viral	128
Alícuota A, 17 $\mu\text{g/ml}$	32
Alícuota B, 55 $\mu\text{g/ml}$	-

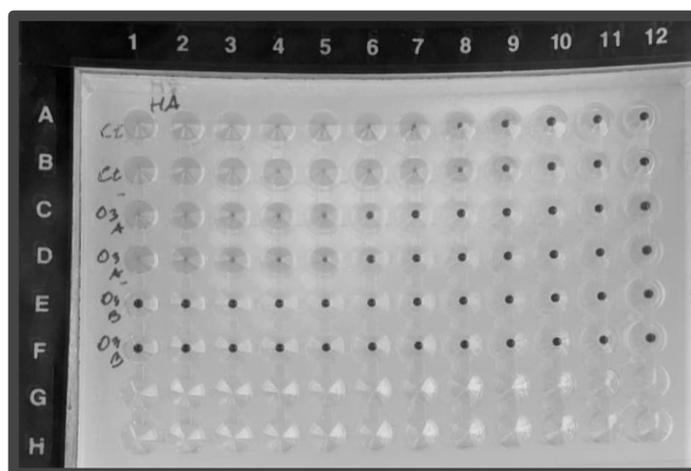


Figura 1: Técnica de hemaglutinación viral para CPPV-1 tratado con ozono de forma *in-vitro*. En las filas A y B se observa el título en UHA del virus control. En las filas C y D el título de la alícuota tratada con ozono A (17 $\mu\text{g/ml}$). En las filas E y F el título de la alícuota tratada con ozono B (55 $\mu\text{g/ml}$).

6.2 Observación en Microscopio Electrónico de Transmisión (M.E.T.).

Las alícuotas virales (virus control, A y B) fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Transmisión de alta resolución.

En la alícuota control se observaron partículas virales de un tamaño correspondiente a CPPV-1 de aproximadamente 25-28nm (Parrish, 2010; Mietzsch et al., 2019). En las alícuotas virales tratadas con ozono (A y B), se identificaron también partículas virales del tamaño esperado para CPPV-1 con daños en su cápside (Figura 2).

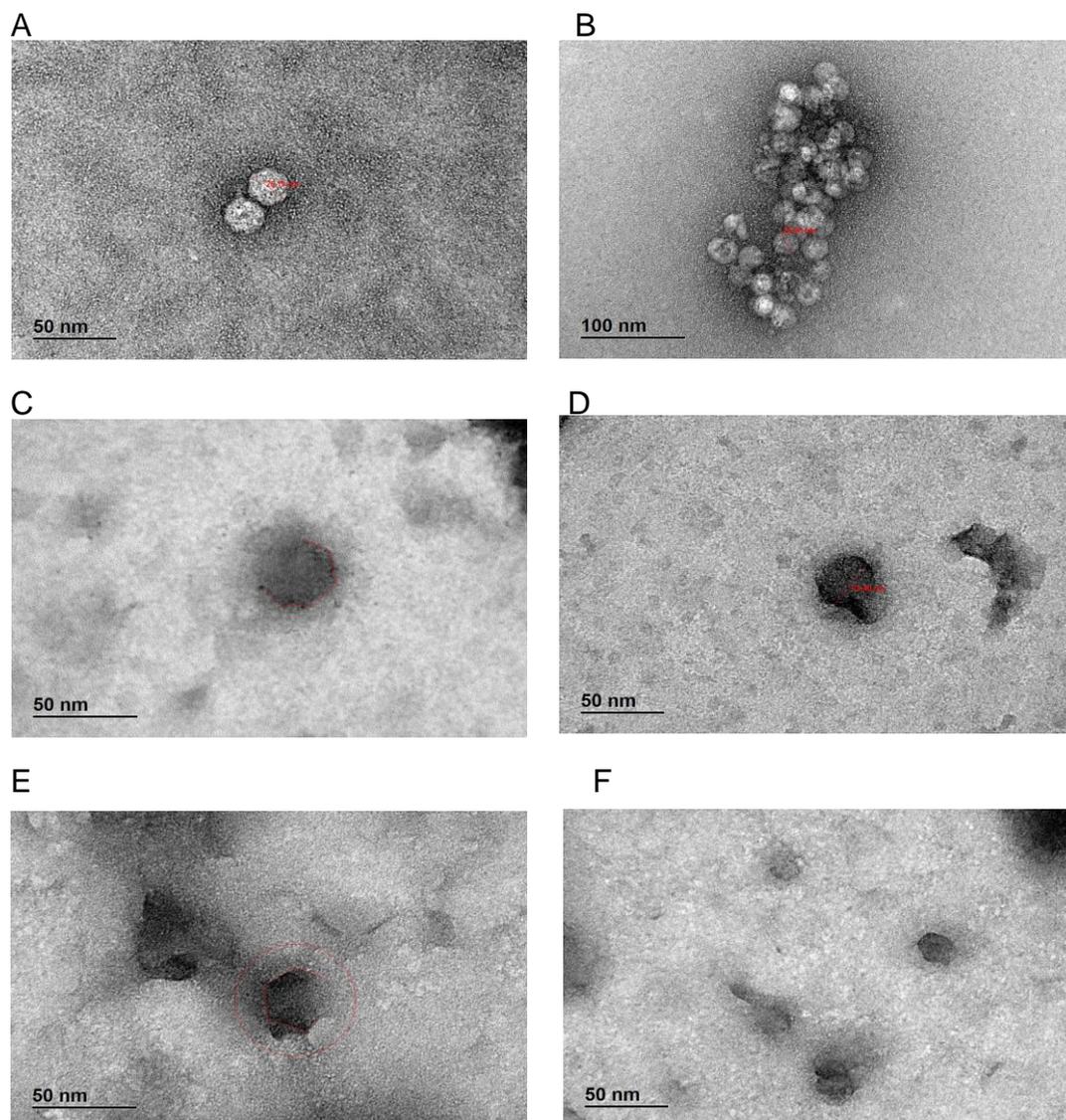


Figura 2: Imágenes obtenidas con un M.E.T de alta resolución de las partículas virales control y las tratadas con ozono a diferentes concentraciones. Las imágenes A y B corresponden a la alícuota control, en las mismas se observan partículas del tamaño esperado para CPPV-1. Las imágenes C y D corresponden a la alícuota viral A y las imágenes E y F corresponden a la alícuota viral B. Se observan partículas del tamaño esperado con daños morfológicos en su cápside.

6.3 Estandarización de la técnica ddPCR (droplet digital PCR)

Con el fin de estandarizar la técnica se comenzó realizando una dilución creciente del plásmido pUC57 al cual se le insertó una secuencia de 202 pb codificante de una porción de la proteína VP2. En primer lugar, para determinar la temperatura de annealing más adecuada se realizó un gradiente de temperatura desde los 57° hasta los 63°, determinándose que se utilizaría 58° como temperatura de annealing. Para la puesta a punto se realizaron corridas con diluciones crecientes del plásmido, desde la dilución 10^{-2} hasta la dilución 10^{-8} . Buscando lograr una clara separación entre los cluster de gotas positivas y negativas, se probaron varias concentraciones de cebadores y sonda. Sin embargo, no se logró una clara separación entre ambos cluster (Figura 3).

Por otro lado, con la intención de lograr una adecuada separación, en un paso previo se sometió al plásmido a un proceso de digestión enzimática utilizando la enzima FastDigest *HindIII*. Este proceso mejoró la separación de los cluster de gotas positivas y negativas, pero aún se evidenciaba poca definición entre ambos clusters (Figura 4).

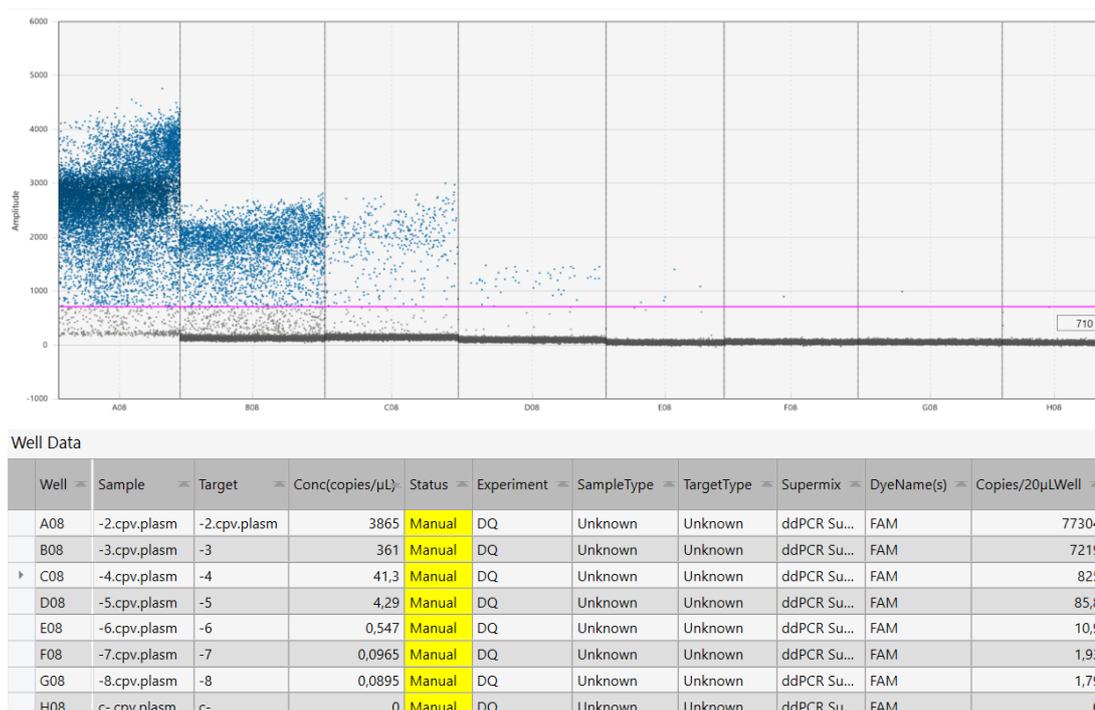
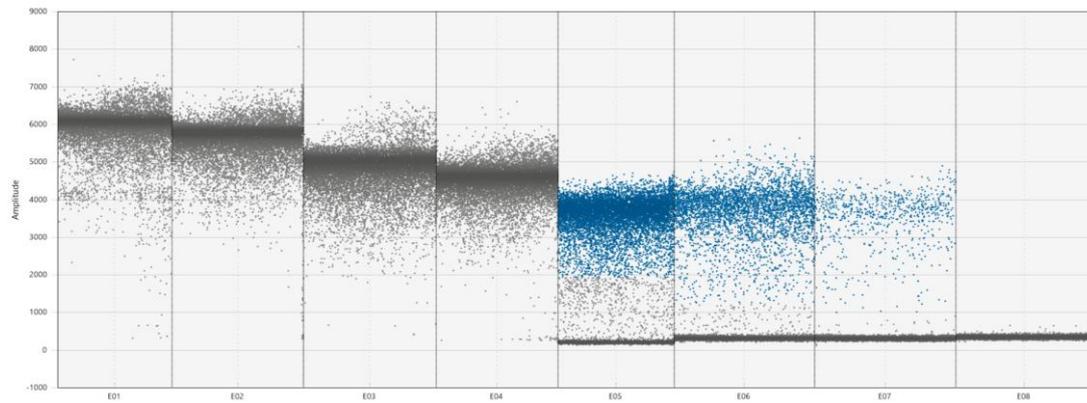


Figura 3: ddPCR de las diluciones crecientes de un plásmido utilizando el vector pUC57 al cual se le insertó una secuencia de 202 pb codificante para una parte de la proteína VP2. Se observan los resultados de las diluciones seriadas desde 10^{-2} en la columna A08 hasta 10^{-8} en la columna G08. La columna H08 corresponde al control negativo sin ADN. Se evidencia la disminución en el número de gotas positivas (puntos azules) correspondiente a las diluciones crecientes, pero no una clara diferenciación entre los cluster positivos (azul) y negativos (gris).



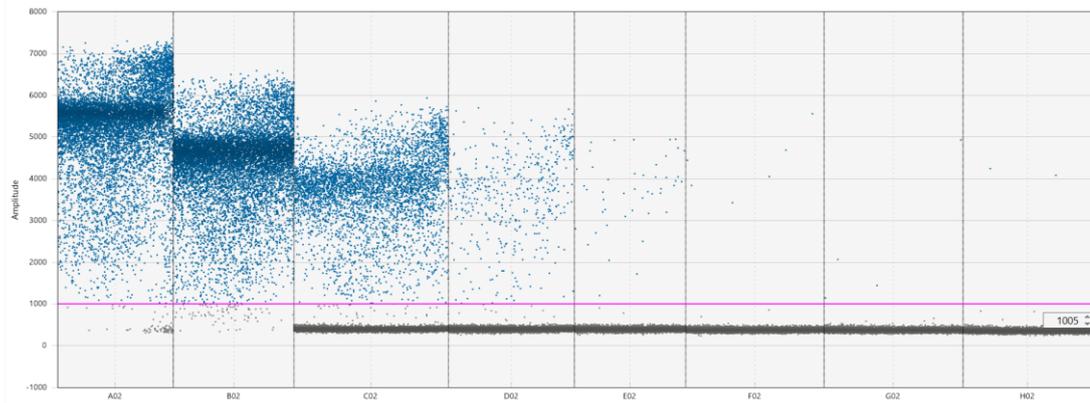
Well	Sample	Target	Conc(copies/ μ L)	Status	Experiment	SampleType	TargetType	Supermix	DyeName(s)	Copies/20 μ LWell
E01	pl dig 58g	pl dig 5...	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
E02	-1pl dig...	-1pl di...	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
E03	-2pl dig...	-2pl di...	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
E04	-3pl dig...	-3pl di...	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
E05	-4pl dig...	-4pl di...	1643	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	32862
E06	-5pl dig...	-5pl di...	367	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	7346
E07	-6pl dig...	-6pl di...	62,6	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	1252
E08	c-.pl dig...	c-.pl di...	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	

Figura 4: ddPCR de la digestión y posterior, diluciones crecientes del plásmido con el gen codificante para una parte de VP2. Se observan los resultados de las diluciones seriadas desde puro en la columna E01 hasta la dilución 10^{-6} en la columna E07. La columna E08 corresponde al control negativo sin ADN. Se evidencia saturación en las primeras 4 diluciones con la posterior disminución en el número de gotas positivas (puntos azules) correspondiente a las diluciones crecientes. Sin embargo, la diferenciación entre los cluster positivos (azul) y negativos (gris) debería ser más evidente.

Por sugerencia del equipo de expertos de BioRad (asesores y fabricantes del equipo de ddPCR utilizado), se realizó la técnica con una muestra de la cual se sospechaba presentaba alta carga viral (tomada durante el transcurso agudo de la infección). Para la realización de la técnica se hicieron diluciones de la muestra desde la muestra pura hasta la dilución 10^{-6} . Asimismo, la ddPCR se realizó con la muestra digerida y sin digerir. Se consideró que el mejor resultado se obtuvo con la muestra con alta carga viral sin digerir (Figura 5). En conjunto con el equipo de expertos se concluyó que la ddPCR estaba puesta a punto.

Se determinó que partiendo de una muestra cuya concentración de ADN medida en Nano Drop era 5 ng/ μ l (surgida del promedio de 2 mediciones), la ddPCR fue capaz de detectar copias del genoma viral hasta la dilución 10^{-6} , en donde se evidenció que en una concentración de 5×10^{-6} ng/ μ l (0,0000005 ng/ μ l) de ADN se detectaron 2 copias/ μ l del genoma viral blanco.

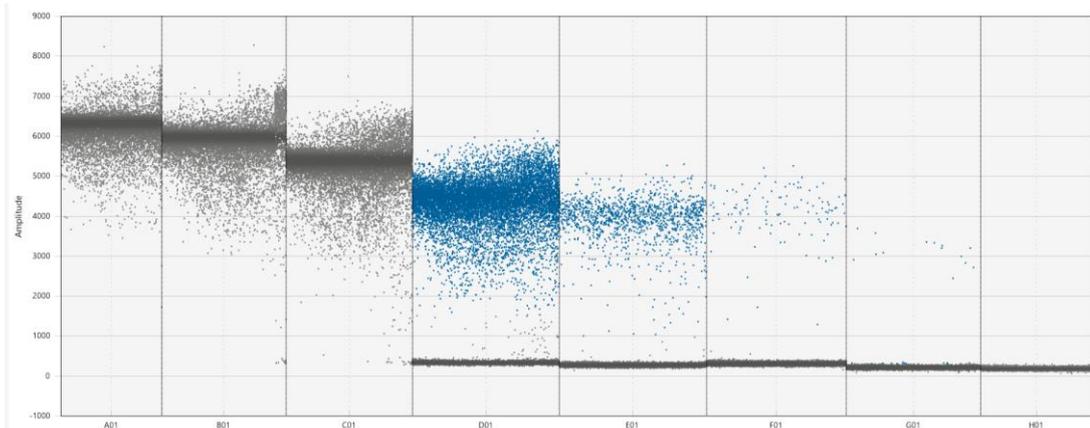
A



Well Data

Well	Sample	Target	Conc(copies/ μ L)	Status	Experiment	SampleType	TargetType	Supermix	DyeName(s)	Copies/20 μ LWell
A02	md2	md2	5569	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	111384
B02	md2-1	md2-1	5805	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	116103
C02	md2-2	md2-2	490	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	9803
D02	md2-3	md2-3	50,9	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	1018
E02	md2-4	md2-4	5,69	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	114
F02	md2-5	md2-5	0,583	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	11,7
G02	md2-6	md2-6	0,387	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	7,74
H02	c-	c-	0,207	Manual	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	4,15

B



Well Data

Well	Sample	Target	Conc(copies/ μ L)	Status	Experiment	SampleType	TargetType	Supermix	DyeName(s)	Copies/20 μ LWell
A01	m.2.	m.2.	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
B01	m.2.-1	m.2.-1	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
C01	m.2.-2	m.2.-2	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	
D01	m.2.-3	m.2.-3	1386	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	27723
E01	m.2.-4	m.2.-4	102	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	2040
F01	m.2.-5	m.2.-5	9,57	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	191
G01	m.2.-6	m.2.-6	2,09	OK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	41,9
H01	c-	c-	No Call	CHECK	DQ	Unknown	Unknown	ddPCR Su...	FAM	

Figura 5: ddPCR de una muestra con alta carga viral. El gráfico A corresponde a las diluciones seriadas (pura- 10^{-6}) de la muestra digerida con la enzima FastDigest HindIII y el gráfico B corresponde a las diluciones seriadas (pura- 10^{-6}) de la muestra sin digerir. En el gráfico B se observa la saturación de las 3 primeras diluciones y la disminución progresiva de las gotas positivas (puntos azules). Se evidencia una clara diferenciación entre el cluster positivo (azul) y el negativo (gris).

Para demostrar la repetibilidad de la técnica se tomaron 3 muestras de campo (previamente confirmadas positivas mediante *q*PCR) y se analizaron cada una de ellas por triplicado, obteniéndose resultados similares en las repeticiones para cada una de las muestras (Figura 6).

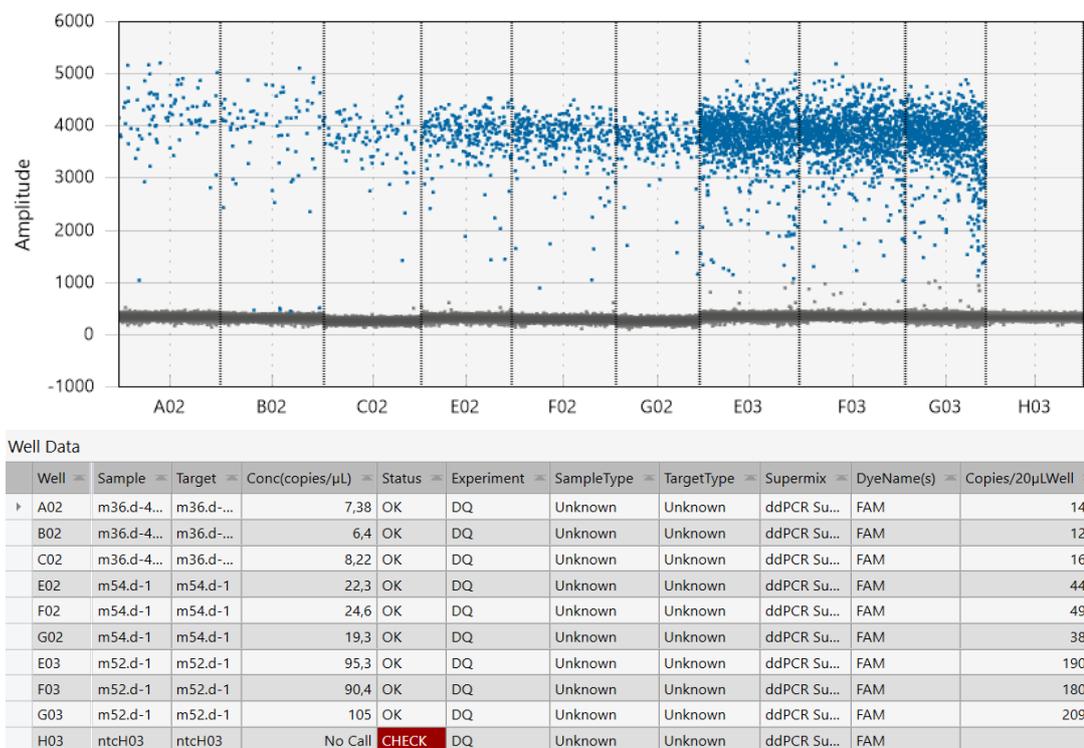


Figura 6: Repetibilidad de la técnica ddPCR. Se observan los resultados de 3 muestras de campo analizadas por triplicado. La A02, B02 y C02 corresponden a la primera muestra analizada, las columnas E02, F02 y G02 corresponden a la segunda muestra, las columnas E03, F03 y G03 corresponden a la tercera muestra analizada y finalmente la columna H03 corresponde al control negativo sin ADN. Se obtuvieron resultados similares en las 3 repeticiones realizadas a cada una de las muestras.

Asimismo, con el objetivo de confirmar que la secuencia amplificada correspondiera a CPPV-1, una vez obtenidos los amplicones, se seleccionaron al azar 3 muestras y fueron purificadas y secuenciadas por Macrogen Inc., Seúl, Corea del Sur. Para obtener la secuencia, el cromatograma recibido desde el servicio de secuenciación fue editado en el programa Bioedit, y mediante inspección visual se eliminaron los errores típicos del secuenciador Sanger. Utilizando dicho programa se consiguió una secuencia única, empalmando las secuencias de los cebadores *Forward* (directo) y *Reverse* (reverso). Una vez obtenidas las secuencias se compararon mediante alineamiento con la secuencia de referencia CPV-N (número de acceso GenBank M19296), la cual fue utilizada por Streck et al. (2013) para el diseño de los cebadores (Figura 7).

```

          10      20      30      40      50      60
CPV-N (M19296.1)  ATGGTGGTAA GCCCAATGCT CTATTGTTT GCCATGTATG TGTTAGTCTA CATGGTTTAC
CPV-m41          .....G.....
CPV-m44          .....G.....
CPV-m63          .....G.....

          70      80      90      100     110     120
CPV-N (M19296.1)  AATCAAAAAA AAATGTTCTT GTAGCAAATT CATCACCTGT TCTTAGTAAG TGTACTGGCA
CPV-m41          .....
CPV-m44          .....
CPV-m63          .....

          130     140     150
CPV-N (M19296.1)  CAGAATTTTC AATAGTATAA AATGAACAT CA
CPV-m41          .....
CPV-m44          ..A.....
CPV-m63          .....

```

Figura 7: Alineamiento de las secuencias de 3 muestras seleccionadas al azar con la cepa de referencia de CPV-2 publicada en GenBank. Se observa alta similitud entre la cepa de referencia y las 3 muestras de campo seleccionadas.

6.4 Cuantificación viral por ddPCR (droplet digital PCR) de las alícuotas tratadas con ozono

Previo a la realización de la técnica se realizó una PCR tiempo final del gen constitutivo codificante para la enzima GADPH para evaluar la extracción de ADN. Posteriormente se realizó una PCR convencional a tiempo final frente a CPV comprobando la presencia del genoma viral blanco en las muestras, previo a la realización de la PCR cuantitativa. Los resultados de la técnica cuantitativa fueron ajustados según el factor de dilución aplicado en cada una de las muestras. En las 3 alícuotas se detectó una carga viral cuantificable. La alícuota control presentó 303.500 copias/μl, la alícuota A presentó 84.400 copias/μl y la alícuota B presentó una carga de 8.165 (Cuadro II).

Cuadro II: Resultados de la ddPCR sobre las alícuotas virales tratadas con ozono de forma *in-vitro*. Se muestran los resultados de la técnica en la alícuota control viral (sin ozono) y ambas alícuotas tratadas con diferentes concentraciones de ozono.

Muestra	Copias/μl
Alícuota control viral	303.500
Alícuota A, 17 μg/ml	84.400
Alícuota B, 55 μg/ml	8.165

6.5 Viabilidad celular observada mediante la técnica de reducción del MTT

Al someter el cultivo celular de la línea CRFK a diferentes condiciones, algunas propicias y otras deletéreas, se observó una variación en la media de las absorbancias de cada una de las condiciones, marcándose una diferencia estadística significativa entre el control celular y las células sin suero fetal bovino (SFB), así como entre el control celular y las células cultivadas con diferentes concentraciones de DMSO. Por otro lado, no se observó diferencia estadística significativa entre el control celular con 10% de SFB y las células cultivadas con diferentes concentraciones de SFB (Cuadro III). Cada condición se sembró por octuplicado.

En el ensayo de la técnica de reducción del MTT en los cultivos celulares inoculados, se realizó un análisis comparativo entre los cultivos inoculados con el virus control y los cultivos inoculados con las alícuotas ozono A y ozono B. Debido a que se partió de un título viral de aproximadamente $10^3_{\text{TCID}_{50}}$, se compararon tanto los controles celulares como las diluciones virus puro, 10^{-3} y 10^{-7} . Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivos inoculados con la alícuota viral pura y las alícuotas virales ozono A y ozono B. Asimismo no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los otros 3 ensayos analizados (Cuadro IV).

Cuadro III: Absorbancia de células CRFK en diferentes condiciones de cultivo. Se observa diferencia estadística significativa entre el control celular con 10% de SFB y las células cultivadas sin SFB, y entre el control celular y las células cultivadas con diferentes concentraciones de DMSO.

Condiciones de cultivo	Media de absorbancia	Desvío estándar	valor <i>p</i> (en contraste con control celular- CC)
CC 10% SFB	0,522	0,075	-----
sin SFB	0,352	0,064	0,0005
5% SFB	0,479	0,062	0,26
20% SFB	0,552	0,069	0,35
3% DMSO (10% SFB)	0,435	0,054	0,02
10% DMSO (10% SFB)	0,209	0,048	0,0000006

Cuadro IV: Absorbancia en células CRFK inoculadas con las alícuotas virales control, ozono A y ozono B. Se realizó el análisis comparativo de los cultivos celulares inoculados con el virus control y con los virus ozono A y ozono B en los controles celulares y en tres diluciones, los virus puros en la dilución 10^{-3} y 10^{-7} . Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivos inoculados con la alícuota viral pura y las alícuotas virales ozono A y ozono B. Asimismo no se observó una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los otros 3 ensayos analizados.

control celular			
	Media	ds	valor <i>p</i> (en contraste con control celular- CC)
Control	0,27	0,069	-----
Ozono A	0,305	0,032	0,23705
Ozono B	0,24	0,029	0,98947
virus puro			
	Media	ds	valor <i>p</i> (en contraste con control celular- CC)
Control	0,349	0,043	-----
Ozono A	0,25	0,025	0,00205
Ozono B	0,198	0,029	0,00018
dilución $^{-3}$			
	Media	ds	valor <i>p</i> (en contraste con control celular- CC)
Control	0,293	0,03	-----
Ozono A	0,314	0,04	0,37980
Ozono B	0,271	0,035	0,32434
dilución $^{-7}$			
	Media	ds	valor <i>p</i> (en contraste con control celular- CC)
Control	0,287	0,021	-----
Ozono A	0,308	0,035	0,27001
Ozono B	0,256	0,037	0,14910

6.6 Evolución clínica de los animales infectados con CPPV-1 y tratados con ozono

La evolución clínica se monitoreó completando cuadros que otorgan un valor numérico a las diferentes situaciones posibles para cada parámetro evaluado y se analizaron mediante una estadística descriptiva. Con el objetivo de abarcar todos los caninos, para la realización del análisis descriptivo de frecuencia se tomaron en cuenta los primeros 3 días de internación, ya que en los días posteriores varios de los caninos que formaron parte del ensayo fallecieron como consecuencia de la infección por CPPV-1.

Con respecto al parámetro consistencia de las heces, siendo 3 el valor adoptado para describir la mayor gravedad, es decir heces líquidas, se evidencia que a medida que avanzan los días va disminuyendo la frecuencia de este valor (Figura 8).

En cuanto a la presencia de sangre en heces, se vio que en el correr de los días un mayor número de caninos comienzan a evidenciar la presencia de sangre en heces (Figura 9).

Si se analiza la frecuencia de episodios de vómitos, se observa que a medida que avanzan los días la frecuencia disminuye (Figura 10).

Tomando en consideración la respuesta frente al estímulo verbal, siendo el número cero la mejor respuesta, es decir un animal capaz de responder, se ve que a medida que avanzan los días los caninos muestran una mejor respuesta a la estimulación verbal (Figura 11).

En todos los gráficos el grupo A corresponde a los animales que recibieron el tratamiento convencional, el grupo B corresponde a los caninos que recibieron el tratamiento convencional más ozonoterapia concomitante.

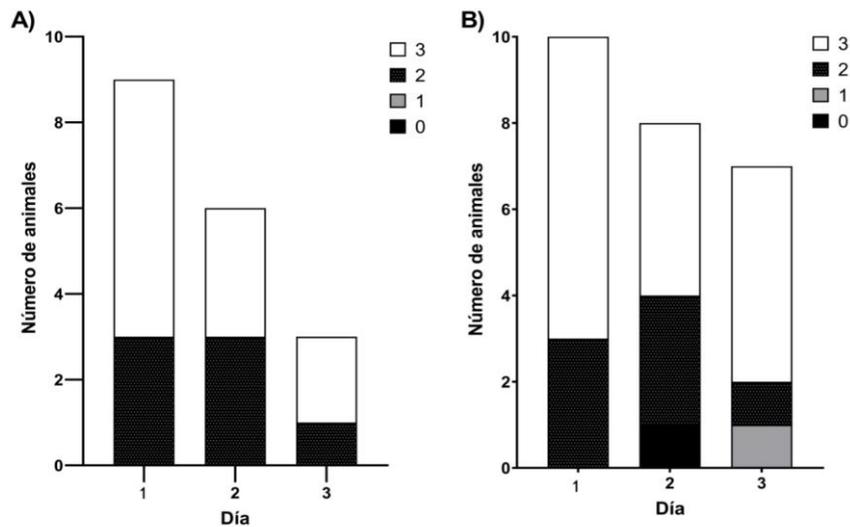


Figura 8: Frecuencia de las posibles consistencias de las heces. Estadística descriptiva de la consistencia de las heces en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a no defeca, 1 corresponde a heces sólidas, 2 corresponde a heces pastosas y 3 corresponde a heces líquidas. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.

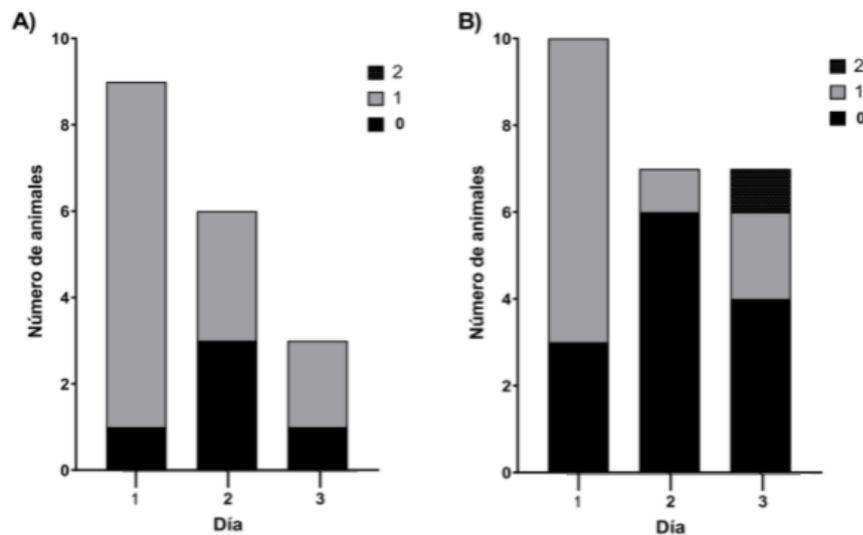


Figura 9: Presencia o ausencia de sangre en heces. Estadística descriptiva de la presencia de sangre en heces en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a no defeca, 1 corresponde a ausencia de sangre, y 2 corresponde a presencia de sangre. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.

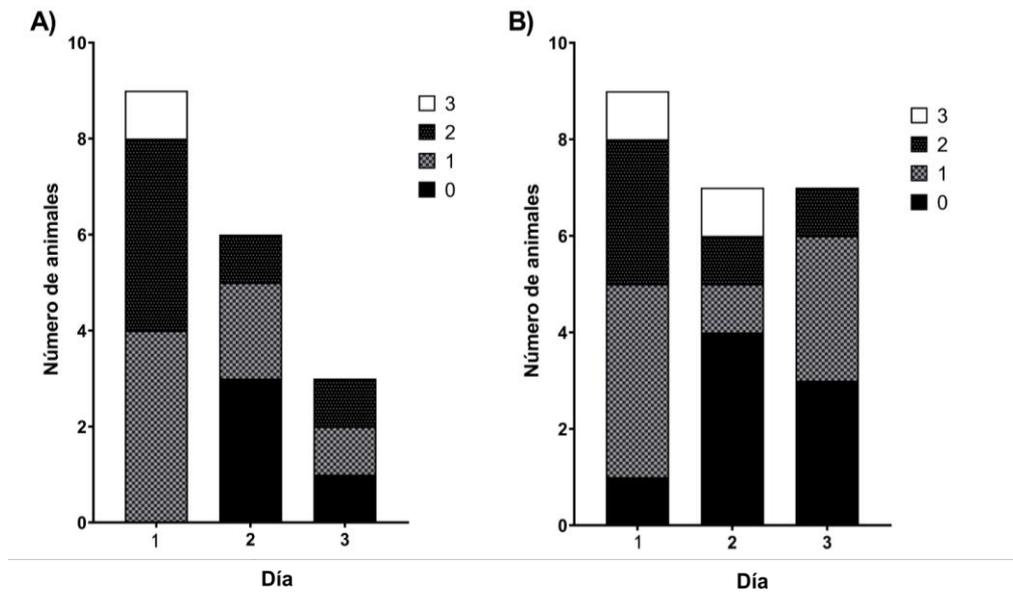


Figura 10: Frecuencia de episodios eméticos. Estadística descriptiva de la frecuencia de vómitos en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0 corresponde a ausencia de vómitos, 1 corresponde a presencia de hasta 3 episodios de vómito, 2 corresponde a presencia de hasta 5 episodios de vómito y 3 corresponde a presencia de más de 6 episodios de vómito. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.

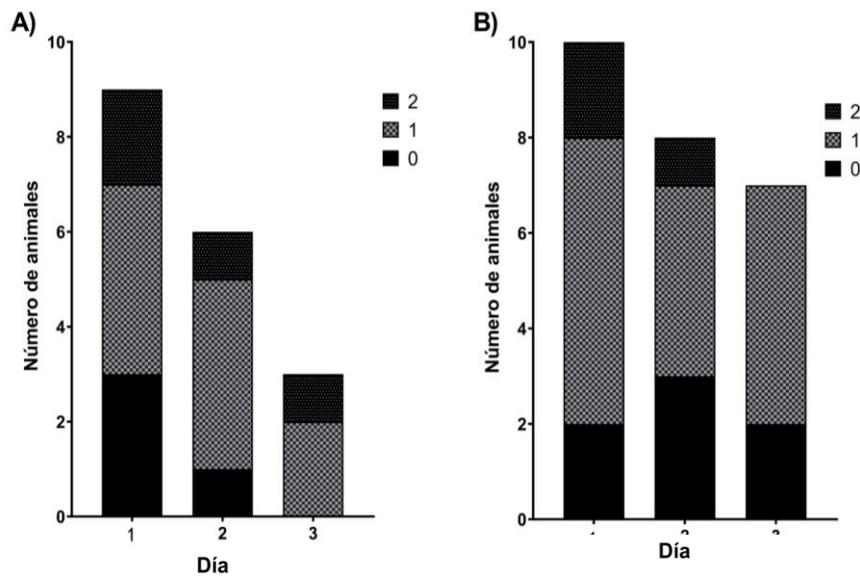


Figura 11: Respuesta frente al estímulo verbal. Estadística descriptiva de la respuesta al estímulo verbal en los primeros 3 días de internación de los caninos. 0-en pie caminando, 1- permanece en decúbito lateral/esternal pero se pone de pie con estimulación verbal, 2-decúbito esternal aun siendo estimulado, 3-decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza sin estímulo, 4-decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza solamente con estimulación verbal y 5-decúbito lateral, no mueve o levanta la cabeza aun siendo estimulado verbalmente. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia.

En el grupo control, correspondiente al grupo A, sobrevivieron un 55.6% de los animales que ingresaron al ensayo y en el grupo que recibió tratamiento con ozono concomitante, correspondiente al grupo B, sobrevivieron un 80% de los caninos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la probabilidad de sobrevivencia a la infección entre ambos grupos (Figura 12).

Los datos de días de internación en el Hospital Veterinario Escuela presentaron una distribución normal, por tanto, se les aplicó un análisis de test no pareados. La media para los caninos del grupo A fue 4.8 días y la de caninos del grupo B fue 3.7 (Figura 13). Por otro lado, los datos de los animales que sobrevivieron a la infección no presentan distribución normal, por tanto, se les aplicó un test no paramétrico. La mediana para los caninos del grupo A fue de 3 días y la de los caninos del grupo B fue 4 (Figura 14). En ninguno de estos 2 parámetros se observó diferencia estadística significativa.

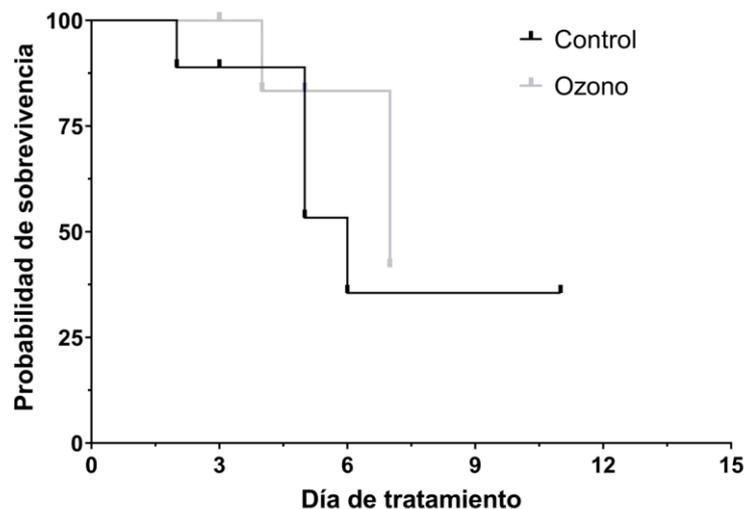


Figura 12: Curva de supervivencia a la infección por CPPV-1. El gráfico A corresponde al grupo control y el gráfico B corresponde al grupo que recibió ozonoterapia. No se observó diferencia estadística significativa entre ambos grupos.

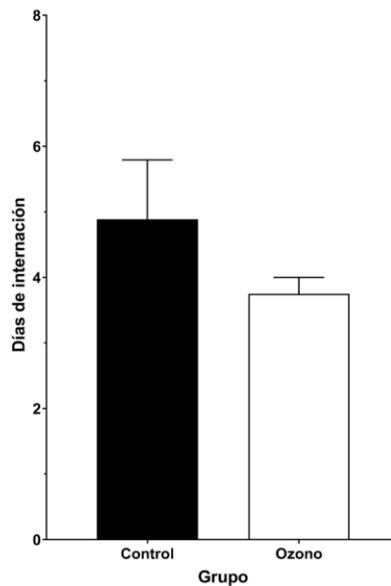


Figura 13: Días de internación en el Hospital veterinario del total de caninos incluidos en cada uno de los grupos de estudio. No se observa diferencia significativa entre ambos grupos.

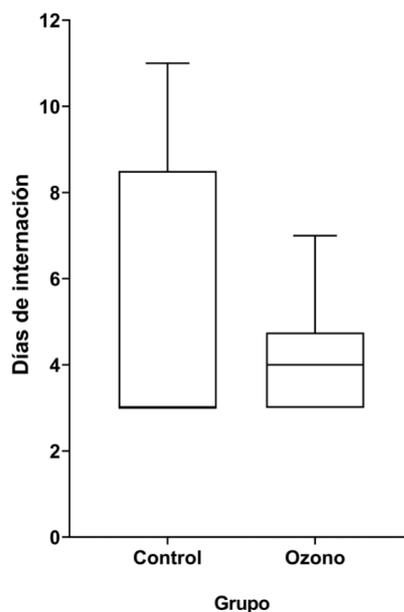


Figura 14: Días de internación en el Hospital Veterinario de los caninos que sobrevivieron a la infección por CPPV-1. No se observa diferencia significativa entre ambos grupos.

6.7 Evolución del hemograma de los caninos infectados con CPPV-1 tratados o no con ozonoterapia

Para la evolución de los parámetros hemáticos (número de eritrocitos en $10^6/\mu\text{l}$, hematocrito y número de leucocitos en $10^3/\mu\text{l}$), se utilizó el análisis de medidas repetidas en el tiempo. Para la realización del análisis se tomaron

en cuenta las primeras 3 muestras de sangre tomadas cada 48 horas. En relación a los resultados de los 3 parámetros analizados, al comparar las medias de cada grupo en los diferentes momentos de muestreo, no se demostró diferencias significativas entre ambos grupos en ningún momento. Por otro lado, si comparamos dentro de un mismo grupo, se observa diferencia significativa en el número de leucocitos entre el día 1 y el 5 del grupo control (Figura 15).

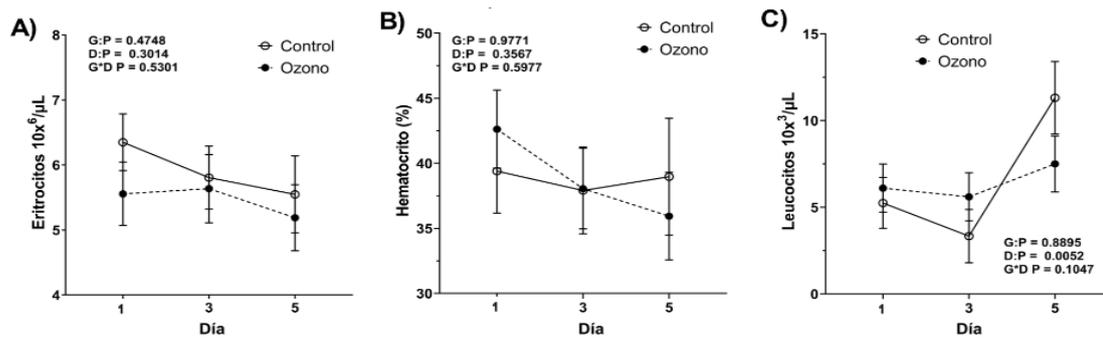


Figura 15: Evolución de los parámetros hemáticos de los caninos. El gráfico A corresponde a número de eritrocitos/ μL , el gráfico B corresponde a hematocrito y el gráfico C corresponde a número de leucocitos/ μL . Si se comparan ambos grupos no se observa diferencia estadística significativa entre las medias de cada grupo en cada uno de los días analizados.

6.8 Excreción viral de caninos infectados con CPPV-1 tratados o no con ozonoterapia

Para determinar la dilución de las muestras en los diferentes momentos de muestreo, en primer lugar, se escogió al azar uno de los caninos incluidos en el ensayo y se realizó la técnica con diluciones seriadas de cada una de las muestras tomadas al mismo. Se determinó que sería utilizada la dilución que evidenciara una correcta separación de las gotas y que no presentara saturación de la técnica en las diluciones inmediatamente próximas. Por tanto, para el día 0 se llevaron las muestras a la dilución 10^{-4} , en el día 15 se utilizó la dilución 10^{-1} , y en el día 30 se utilizó la muestra sin diluir.

Los valores muestran que la excreción viral cuantificada por *ddPCR* del grupo control, partiendo de una media de aproximadamente un millón de copias por μL , a los 30 días del ingreso al hospital la media de excreción viral fue de aproximadamente 100 copias/ μL . En cambio, en el grupo que recibió el tratamiento con ozono concomitante, el día de su ingreso al hospital partimos de una media de aproximadamente 1.5 millones de copias/ μL y a los 30 días se detectó una excreción viral de aproximadamente 40 copias/ μL (Cuadro V). Sin embargo, los datos no presentaron una distribución normal, y se utilizó un análisis no paramétrico para comparar ambos grupos. Cuando se

compararon los grupos para cada momento del muestreo no se observó una diferencia significativa en ninguno de los momentos analizados (Figura 16).

Cuadro V: Medias y desvío estándar para cada momento del muestreo para la excreción viral. El grupo A corresponde al grupo control y el grupo B corresponde al grupo que recibió tratamiento con ozono concomitantemente.

		Número de copias/ μ l		
		Día 1	Día 15	Día 30
Grupo A	Media	964.938	360,60	112,40
	sd	1.079.392	643,80	128,10
Grupo B	Media	1.534.900	276,30	38,88
	sd	2.341.986	362,30	88,19

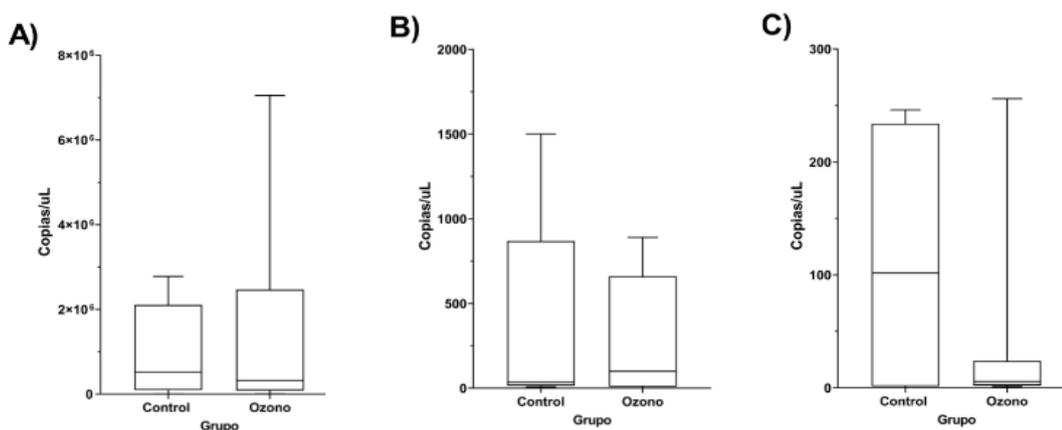


Figura 16: Comparación en la excreción viral entre ambos grupos. La figura A corresponde al día 1, la figura B corresponde al día 15 y la figura C corresponde al día 30. No se observan diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en ninguno de los momentos de muestreo.

6.9 Inhibición de la hemaglutinación

Al comenzar el muestreo el grupo A incluía 9 animales y el B 10 animales. En el segundo y tercer momento del muestreo, debido al fallecimiento de algunos de los caninos incluidos en el ensayo, para el grupo A se tomaron muestras de 5 caninos y para el grupo B de 8 animales. El día de su ingreso al Hospital Veterinario, la media del título de anticuerpos del grupo A fue de 30 UIHA, y

la del grupo B fue de 130 UIHA (Cuadro VI). Pero los datos obtenidos no presentaron una distribución normal, y por tanto se analizaron mediante un análisis no paramétrico y se comparó ambos grupos, no observándose una diferencia significativa entre ambos grupos en ninguno de los momentos analizados (Figura 17).

Cuadro VI: Medias y desvío estándar para cada momento del muestreo para el título de anticuerpos por IHA. El grupo A corresponde al grupo control y el grupo B corresponde al grupo que recibió tratamiento con ozono concomitantemente.

		Unidades de IHA		
		Día 1	Día 15	Día 30
Grupo A	Media	30,2	293,8	416,0
	sd	42,7	409,1	409,8
Grupo B	Media	129,6	216,0	352,0
	sd	203,6	193,3	296,3

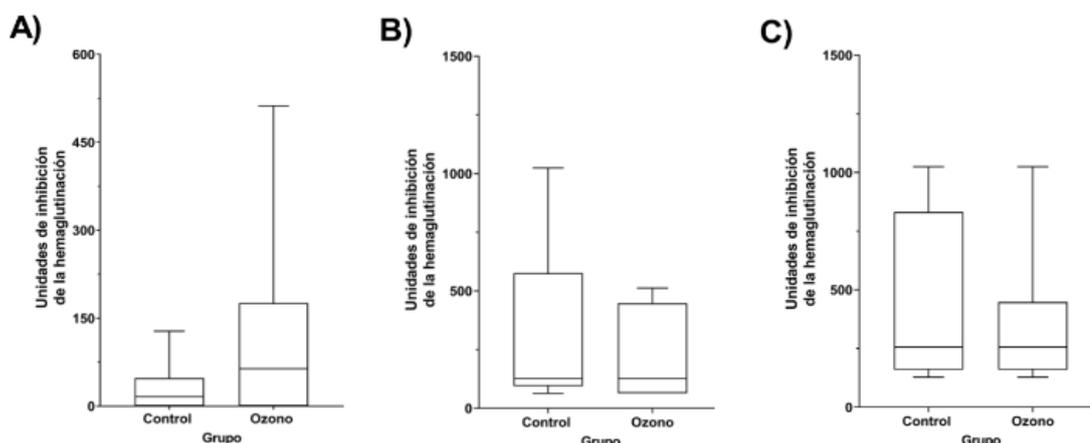


Figura 17: Comparación del título de anticuerpos entre ambos grupos. La figura A corresponde al día 1, la figura B corresponde al día 15 y la figura C corresponde al día 30. No se observan diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos en ninguno de los momentos de muestreo.

6.10 Correlación entre las variantes título de anticuerpos por IHA y excreción viral

Tanto en el grupo A (control) como en el grupo B (tratamiento con ozono concomitante) se observa una correlación negativa media significativa entre el título de anticuerpos y la excreción viral. En el grupo A por cada unidad de anticuerpos que aumenta, se observa una disminución de 666.3 unidades de excreción viral, lo cual corresponde a un 0,023% de disminución tomando como 100% el canino con mayor carga de excreción viral en el día 0. En el grupo B esa disminución es de 3083, lo cual corresponde a un 0,044% tomando como 100% el canino con mayor carga de excreción viral en el día 0 (Figura 18).

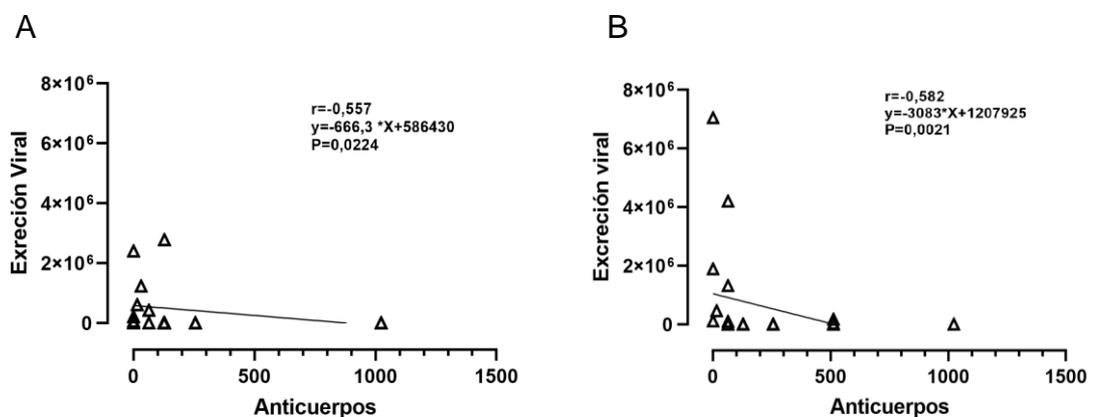


Figura 18: Correlación entre el título de anticuerpos y la excreción viral. La figura A corresponde al grupo control y la figura B al grupo que recibió tratamiento con ozono. En ambos grupos se observa una correlación negativa media y significativa.

7. DISCUSIÓN

La parvovirus canina es una de las principales virosis en afectar a los caninos, siendo endémica a nivel mundial. Cursa con un cuadro de profusa diarrea hemorrágica y leucopenia, presentando una mortalidad de hasta 90% en animales no tratados. Hasta la fecha no se han descrito protocolos específicos para tratar esta enfermedad, estando el tratamiento clínico enfocado en controlar los síntomas consecuentes asociados a esta infección (Gerlach et al., 2020). En ese sentido, es necesario buscar alternativas terapéuticas para coadyuvar en el tratamiento de esta patología. Entre las terapias complementarias que pueden lograr ese propósito se encuentra la ozonoterapia, la misma ha sido utilizada para tratar una amplia gama de patologías de diversa etiología tanto en medicina veterinaria como humana. A dicha terapia se le describen efectos analgésico, biocida e inmunoestimulante (Díaz Luis et al., 2013; Sciorsci et al., 2020). Por tanto, fue el objetivo de este trabajo analizar el efecto de la ozonoterapia sobre el *Protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1) tanto *in-vitro* como la respuesta en animales naturalmente infectados.

Al comparar los resultados de la técnica de hemaglutinación, se demostró que el tratamiento con ozono a las alícuotas virales disminuyó considerablemente la capacidad hemaglutinante en la alícuota A (17 µg/ml), mientras que en la alícuota B (55 µg/ml) no se observó hemaglutinación. La capacidad hemaglutinante del parvovirus está dada por la conformación espacial de la cápside, ya que el sitio de unión al ácido siálico se encuentra en las depresiones formadas en el eje de simetría doble (Kerr et al., 2006). El principal componente de la cápside viral es la proteína VP2, constituyendo un 90% de la misma (Flores, 2007). La capacidad de reducir la infectividad viral del ozono en este caso sería a través de la peroxidación de estas proteínas. Este mecanismo se define como las modificaciones covalentes de las proteínas directamente por su interacción con especies reactivas del oxígeno, o indirectamente por su interacción con productos secundarios del estrés oxidativo (Murray et al., 2008). El daño oxidativo de las proteínas se debe entre otras cosas a las variaciones del peso molecular debido a la ruptura del esqueleto peptídico (Roche y Romero, 1994). En este ensayo se observó una marcada disminución en la capacidad hemaglutinante de la cepa viral de referencia luego de ser expuesta a concentraciones de ozono, siendo por lo tanto que, a mayor concentración de exposición, existió una menor capacidad hemaglutinante. Consecuentemente, podemos decir que dicha exposición alteró las proteínas, y por consiguiente el sitio de unión a los eritrocitos, ya que esta interacción se da debido a la conformación espacial de la cápside. Podríamos entonces inferir que la exposición al ozono, al disminuir su capacidad hemaglutinante, modificó la cápside viral alterando sus propiedades biológicas. La hipótesis formulada con respecto a cierta alteración provocada en la cápside viral, debe aún ser demostrada en futuros ensayos. La cápside de CPPV-1 está conformada en un 90% por la proteína

VP2, por tanto, se sospecha que la alteración mencionada sea en esta proteína. Para evidenciar los cambios provocados en la VP2 al exponer el virus al ozono son necesarios futuros ensayos dilucidando si la conformación tridimensional de VP2 sufrió alteraciones al ser expuesta al ozono, permitiendo explicar los cambios en la capacidad hemaglutinante del virus. Con el fin de comprobar dicha hipótesis y analizar la estructura de la proteína de cápside VP2, se pueden aplicar diversas técnicas basadas en trabajos previamente publicados sobre dicha proteína, como ser la criomicroscopía electrónica (Hafenstein et al., 2007; Pittman et al., 2017), y la difracción de rayos X o cristalografía (Hernando et al., 2000). Por otro lado, Predmore et al. (2015) evaluaron el daño que la exposición al ozono provocaba en las proteínas virales del *Norovirus murino* y *Tulane virus* mediante la técnica SDS-PAGE.

Con respecto a la visualización de las alícuotas virales en el M.E.T., a pesar de que se logró observar partículas virales de tamaño y forma similar a CPPV-1 con daño morfológico en su cápside, los resultados fueron inconclusos. La limitante para lograr una buena visualización en el M.E.T es partir de muestras que contengan una alta concentración viral (Schelotto, 2004), lo cual permitiría comparar las alícuotas control y las tratadas con ozono. Para aumentar el título viral en los cultivos celulares se probaron diferentes metodologías, pero los esfuerzos realizados no lograron el objetivo de aumentar el título viral previo a someter a las alícuotas al tratamiento con ozono. El título alcanzado al orden 10^3 TCID₅₀. Asimismo, se intentó lograr una mayor concentración de las partículas virales mediante un proceso de doble centrifugado a una fuerza de 50.000g. Los inconvenientes enfrentados limitan los resultados obtenidos al visualizar las alícuotas virales en el M.E.T. de alta resolución, pero a pesar del bajo número de partículas observadas se pudo evidenciar el daño morfológico provocado por el tratamiento con ozono, en ambas concentraciones utilizadas, en las partículas del tamaño esperado visualizadas.

Para estudiar el efecto, tanto de la aplicación de ozono a las alícuotas virales como la influencia de la ozonoterapia en la excreción viral de los animales incluidos en el ensayo, se puso a punto la técnica de *ddPCR*. Hasta la fecha no existen reportes de la aplicación de esta técnica para la detección de patógenos virales en la especie canina, siendo este trabajo el primero en reportar la puesta a punto de la técnica para el uso en CPPV-1. Esta técnica molecular cuantitativa ofrece ventajas sobre su predecesora, entre las principales se destacan su sensibilidad y su puesta a punto menos laboriosa, en comparación con la *qPCR*. A diferencia de la cuantificación relativa mediante la elaboración de curvas de calibración que se logra con la *qPCR*, la *ddPCR* cuantifica de manera absoluta. Esto implica una mayor sensibilidad y precisión en el diagnóstico (Cao et al., 2016). La principal ventaja de esta técnica es su sensibilidad. En este trabajo la *ddPCR* fue capaz de detectar hasta 2 copias/ μ l, hasta la fecha se describe la *qPCR*, como la técnica de mayor sensibilidad con una capacidad de detección de 10^2 copias del genoma

blanco (Decaro et al., 2005a). Los resultados obtenidos corresponden con los reportes en la bibliografía que indican a la *ddPCR* como la técnica de elección para la detección de patógenos con bajas cargas virales (Li et al., 2018; Falzone et al., 2020). Por tanto, esta técnica podría ser utilizada en lugares de circulación canina para detectar animales subclínicos, que pueden ser una fuente de infección. No obstante, entre las principales desventajas de esta técnica para su utilización en el diagnóstico, son los costos económicos, ya que estos son muy superiores a los costos para realizar una PCR, convencional, la cual a pesar de tener una sensibilidad claramente más baja a la *ddPCR* continúa siendo la de elección para el servicio diagnóstico de esta patología. Por tanto, en base a los resultados presentados en este trabajo, podemos inferir que para la detección de CPPV-1 en materia fecal, la *ddPCR* presenta mayor sensibilidad que la *qPCR*. Sin embargo, es preciso mencionar, que en un próximo paso es necesario realizar nuevos ensayos y comparar los resultados obtenidos mediante esta técnica con la *qPCR*, ya que esta última es una técnica validada para la cuantificación de CPPV-1.

Al cuantificar la carga viral de las 3 alícuotas mediante *ddPCR*, se demostró que el tratamiento con ozono produjo un daño en el fragmento amplificado de ADN, ya que las alícuotas tratadas presentaron una carga viral considerablemente más baja al compararlas con la alícuota control. Se observó que a mayor concentración de exposición al ozono menor carga viral fue cuantificada, estos resultados coinciden con lo reportado por Tseng y Li (2008), aun teniendo en cuenta las diferencias en las metodologías de exposición utilizadas en los ensayos. Dichos autores demostraron que a mayor dosis de exposición al ozono de cuatro bacteriófagos utilizados como indicadores de virus patógenos (entre ellos de enterovirus), menor era la carga viral infectiva detectada en superficies. En el presente trabajo las alícuotas virales fueron expuestas al ozono mediante burbujeo del gas en la solución viral, en cambio, los bacteriófagos fueron expuestos al ozono en forma de gas mantenidos en una cámara cerrada. Sin embargo, cabe destacar que el ozono es 10 veces más soluble en agua que el oxígeno (Sagai y Bocci, 2011), por tanto, al entrar en contacto la interfase líquido-gas, el ozono rápidamente se solubiliza en el líquido alcanzando los bacteriófagos incluidos en el mismo. Por otro lado, difieren de los resultados presentados por Predmore et al. (2015), quienes reportan que luego de exponer al tratamiento con ozono a *Norovirus murino* y *Tulane virus*, afirman que a pesar de visualizar una disminución en la intensidad de las bandas observadas a medida que aumenta la concentración de exposición, el genoma viral permanece intacto para ambos virus luego del tratamiento. El ensayo mencionado evaluó el efecto del ozono en dichos virus en superficies. Para dicho propósito colocaron una carga viral determinada en superficies metálicas y de vidrio, luego secaron esas superficies al aire en cabinas de bioseguridad, y posteriormente las mismas fueron expuestas a ozono en forma de gas en una cámara cerrada. Como se mencionó previamente el ozono es altamente soluble en agua, lo cual le permite difundirse

rápidamente, además es un gas inestable que rápidamente se descompone en oxígeno biatómico. Por tanto, la metodología empleada en este ensayo posiblemente no permitió la total difusión del ozono en las superficies limitando el contacto del mismo con las partículas virales. Asimismo, Tizaoui et al. (2022) demostraron que el flujo de ozono a una superficie líquida es 100 veces mayor que a una superficie seca, lo que sugiere que la rehidratación del medio de virus seco mejora la exposición del virus al ozono, por lo tanto, su inactivación. Además, los autores analizan el efecto del ozono en el genoma viral en base a una técnica molecular cualitativa como lo es la rt-PCR, por tanto, no se podría afirmar que no hubo cambio en el número de genomas virales. En cambio, en este trabajo se evaluó el efecto de la exposición al ozono mediante una técnica molecular cuantitativa altamente sensible y específica, quedando demostrado que además del daño causado a la cápside viral el ozono tuvo un efecto dañino en el fragmento de ADN amplificado. En consecuencia, se desprende la hipótesis de que el ozono produjo un daño significativo en el genoma viral, sin embargo, esto debe ser aún demostrado en futuras investigaciones en las cuales luego de exponer el CPPV-1 al ozono se realice secuenciación del genoma completo.

Para evaluar el efecto de la aplicación de ozono en la infectividad viral, luego de la exposición del virus al ozono se debería inocular el mismo en cultivos celulares y calcular la TCID₅₀ (*Tissue Culture Infectious Dose 50%*), ya que los cultivos celulares representan el mejor indicador de infecciosidad (Jefferson et al., 2021). Sin embargo, lamentablemente no se lograron resultados claros con esta estrategia, ya que CPPV-1 resultó muy difícil de titular, en concordancia con Heldt et al. (2006). En este trabajo se hicieron varios intentos probando diferentes estrategias para titular el virus, así como para aumentar el título del mismo. Se utilizaron las líneas celulares MDCK y CRFK sensibles y permisivas a la infección por CPPV-1. Para la titulación viral en un primer momento se sembraron cien mil células por pocillo en una placa de 96 pocillos, se incubaron en estufa a 37° y con una atmósfera de 5% de CO₂ overnight y posteriormente fueron inoculadas por quintuplicado con 100µl de las diluciones en base 10 de la suspensión viral, se incubaron a 37° durante 1 hora, se retiró el inóculo viral y se colocó medio de cultivo con 10% de SFB, se observó cada 24 horas en búsqueda de efecto citopático durante 5 días. Siguiendo este procedimiento no se logró resultados. El mismo procedimiento se repitió, pero con la variación que en un primer momento las células se incubaron 4 horas previo a ser inoculadas con las diluciones de las suspensiones virales. Esta variación mostró avances ya que se pudo identificar efecto citopático, pero aún la titulación viral no era clara. En una nueva variación de procedimiento, se sembraron veinte mil células por pocillo, lo cual no demostró avances en la titulación viral. Con el fin de aumentar el título viral previo a la titulación, se realizaron varias inoculaciones consecutivas, no obteniendo resultados favorables. Finalmente, se utilizó la estrategia de sembrar e inocular simultáneamente los cultivos celulares. Con esta estrategia, se logró un título viral en el orden de 10³TCID₅₀. Sin embargo,

a pesar de observarse un aumento en el orden del título viral, no se logró una clara titulación viral. Al observar diariamente los cultivos no se pudo identificar claramente el comienzo del efecto citopático, ya que la monocapa celular no mostraba claras alteraciones y a la próxima visualización en 24 horas, dicha monocapa estaba destruida impidiendo una clara determinación del título viral. Al comparar la visualización en ambas líneas y sumado a la facilidad en el manejo de las mismas, se decidió continuar el resto del trabajo con la línea CRFK.

Teniendo presente los inconvenientes afrontados, se buscó la alternativa de medir la viabilidad celular de los cultivos infectados con las alícuotas virales ozonizadas mediante la técnica de reducción del MTT. Esta técnica mide la actividad de una deshidrogenasa mitocondrial mediante su acción sobre el sustrato MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5- difenil-tetrazolio), el cual es oxidado originando un producto cristalino azul que puede solubilizarse en medio ácido y cuya absorbancia se mide a 540 nm (Pauwels et al., 1988). Existen varios reportes en la bibliografía que documentan el uso la técnica MTT para evaluar la actividad viral de los parvovirus (Heldt et al., 2006; Tafur et al., 2013; Zhang et al., 2013), así como de otras familias virales (Savi et al., 2006; Ordaz-Trinidad et al., 2018). Para la puesta a punto de la técnica sometimos a la línea celular CRFK a diferentes condiciones de cultivo, algunas beneficiosas (diferentes proporciones de SFB en el medio de cultivo) y otras nocivas (diferentes proporciones de DMSO en el medio de cultivo). En este ensayo piloto obtuvimos resultados que nos permitieron avanzar para tratar de evaluar la infectividad de los cultivos celulares infectados, ya que se comprobó el efecto deletéreo del DMSO al 10%, en concordancia con Picoli et al. (2015). La metodología empleada para ozonizar las alícuotas virales (burbujeo directo de la mezcla de oxígeno-ozono en las mismas), produjo una probable oxidación de los componentes orgánicos del medio de cultivo, observada mediante la decoloración total del medio de cultivo celular de las alícuotas ozonizadas. Por tanto, dicha metodología impidió el análisis previo de las concentraciones de ozono utilizadas en este ensayo en la línea CRFK. Sin embargo, existe bibliografía respaldando un efecto positivo del ozono en varios cultivos celulares (Carpendale y Freeberg, 1991; Petry et al., 2014; Yang et al., 2021), por lo cual se procedió a la inoculación de las alícuotas virales ozonizadas en la línea celular CRFK. Consecuentemente, los cultivos celulares fueron inoculados con las alícuotas virales ozonizadas y la viabilidad celular analizada mediante la técnica de MTT. Sin embargo, a pesar de la repetición del ensayo, tampoco fue posible llegar a resultados concluyentes con esta técnica. Se intentó adaptar el protocolo descrito por Heldt et al. (2006) en el cual logran titular el CPV-2 (hoy reclasificado como CPPV-1) con dicha técnica en la línea celular A-72, pero cambiando por la línea celular CRFK disponible en el Laboratorio de Microbiología (Fvet-UdelaR). Heldt et al. (2006) inocularon e incubaron los cultivos de A-72 durante seis días, durante los cuales fueron observados en busca de efecto citopático. La línea CRFK utilizada en el presente trabajo, no pudo ser incubada por más de tres

días post-inoculación, ya que la monocapa demostraba daños severos en ese lapso de tiempo. Se consideran necesarios más estudios para confirmar si el fracaso obtenido en la titulación viral de CPPV-1 en el presente trabajo, es debido a las diferentes líneas celulares utilizadas. Cabe destacar que Heldt et al. (2006) también reportan como la principal dificultad enfrentada fue obtener un alto título viral en CPV-2.

Lo previamente presentado permite afirmar que en este trabajo se demostró la capacidad del ozono de producir un efecto deletéreo en el CPPV-1. Esto concuerda con la bibliografía que describe que agentes oxidantes lo inactivan, a pesar de ser que es un virus sumamente estable en el ambiente pudiendo mantenerse infectivo hasta por un año. En este sentido los fómites cumplen un rol fundamental en la transmisión de esta enfermedad, así como la contaminación ambiental ya que estas constituyen una vía indirecta de transmisión mediante la exposición por la vía oronasal actuando como difusores de la misma (Kerr et al., 2006; Mylonakis et al., 2016; Segev et al., 2022). Por tanto, se propone el tratamiento con ozono como sanitizante de consultorios veterinarios, así como en la desinfección de instrumental veterinario, jaulas y vehículos de transporte. Este es el primer reporte del ozono como posible desinfectante frente al CPPV-1, sin embargo, existe amplia bibliografía respaldando la acción del ozono en la eliminación viral de superficies (Tseng y Li, 2008; Petry et al., 2014; Predmore et al., 2015; Yeargin et al., 2016; Tizaoui et al., 2022).

Cuando se analizó el efecto de la terapia con ozono en los animales infectados naturalmente con CPPV-1, se evaluaron distintos parámetros como son la permanencia en el centro de internación, sobrevivencia de los animales, parámetros hematológicos, excreción viral y respuesta de anticuerpos generada. En cuanto a la curva de sobrevivencia entre ambos grupos, no mostró una diferencia estadística significativa. Sin embargo, en la gráfica se observa una diferencia a favor del grupo que recibió tratamiento con ozono, lo cual tiene cierta implicancia biológica. A pesar de no haber podido demostrar una mayor probabilidad estadística, esa diferencia puede significar la vida para el canino que reciba el tratamiento, lo cual relativiza los resultados estadísticos absolutos.

Si se analiza los días de permanencia en el Hospital Veterinario Escuela, no se observó una diferencia estadística significativa entre ambos grupos de estudio. El promedio de días que permanecieron los animales del grupo control que recibieron el tratamiento convencional fue de 4.8 días, el de los animales que recibieron ozonoterapia concomitante fue de 3.7 días. Teniendo en cuenta que el tratamiento adecuado para esta patología es costoso, ya sea por los medicamentos empleados y/o el costo de las internaciones y asistencia profesional (Iris et al., 2010), y a pesar de no haber diferencia significativa entre ambos grupos, esa mínima diferencia representaría un menor costo económico significativo para el tutor del animal en los importes de hospitalización, así como una recuperación más pronta para el canino que sobrevive a la infección por CPPV-1. Es necesario, por tanto, comprobar

estadísticamente una disminución en los días de internación de los animales que reciben un tratamiento complementario, siendo determinante para lograr dicha comprobación un mayor número de animales. Por otro lado, si evaluamos los días de internación de los animales que sobrevivieron a la infección, al comparar ambos grupos se debió utilizar otro método estadístico de análisis ya que los datos no presentaron una distribución normal, el cual tampoco demostró una diferencia estadística significativa entre ambos grupos. Al comparar las medianas de ambos grupos, la del grupo control es de 3 días, el de los animales que recibieron ozonoterapia concomitante es de 4 días. Para analizar estos datos debemos tener en cuenta que en el grupo B (ozono), hubo un mayor número de animales que sobrevivieron a la infección (8 de 10) que en el grupo control (5 de 9). Por tanto, un mayor número de variables afectó esta medida desplazando hacia la derecha al grupo que recibió el tratamiento con ozono.

Si observamos los gráficos de evolución clínica, vemos como es esperable en los animales que sobrevivieron que a medida que avanzan los días, la gravedad de los síntomas analizados va disminuyendo. Si tomamos en cuenta la variable de consistencia de las heces, a lo largo del tiempo en la mayoría de los animales se mantienen en el valor 3 (heces líquidas) o tiende a mejorar disminuyendo la gravedad. Este resultado coincide con lo esperado para esta enfermedad, ya que produce una diarrea por malabsorción que va cediendo a medida que la mucosa intestinal se recompone (el recambio celular normal de las vellosidades se produce entre 1 y 3 días), quedando los animales generalmente sin secuelas (Hoelzer y Parrish, 2010; Decaro y Buonavoglia, 2012). En cuanto a la variable de presencia de sangre en heces, en todos los animales que sobrevivieron la presencia de sangre en heces fue desapareciendo a medida que evolucionaba el cuadro. En el caso de los caninos que fallecieron este síntoma se fue agravando o no presentó mejoría. Si tenemos en cuenta la frecuencia de episodios eméticos, observamos que todos los caninos del ensayo respondieron a los antieméticos y este síntoma se mantuvo estable o mejoró. Ninguno de los animales presentó vómitos incontrolables, manteniéndose todos en el nivel de hasta 3 episodios de vómitos diarios. Todos los animales presentaron niveles de consciencia capaces de responder e interactuar con su entorno. Por tanto, en ambos grupos la evolución de la enfermedad se comportó de acuerdo al cuadro clínico característico de esta enfermedad.

Como se describe previamente, varios parámetros analizados en este trabajo no demostraron resultados concluyentes, para lograr los mismos sería necesario un mayor número de animales por grupo de estudio, lo cual permitiría sacar conclusiones más firmes. La principal limitante para el número de animales que formaron parte del trabajo fue el tiempo destinado para su realización. El ensayo clínico se realizó en el Hospital Veterinario Escuela contándose con un tiempo limitado para ingresar los animales al ensayo. Asimismo, se consideró que las condiciones bajo las que se realizó el ensayo clínico no eran reproducibles en otro Hospital Veterinario, motivo

por el cual no se aumentó el número de animales en el ensayo con casos clínicos. Por otro lado, resultó muy complejo lograr una homogeneidad entre los distintos estadios clínicos de la enfermedad en ambos de estudio. Para ser ingresados al estudio el único criterio de inclusión utilizado fue un resultado positivo a la prueba de qPCR, distribuyéndose los animales según el programa informático Research Randomizer, no teniéndose en cuenta la evolución clínica de los animales. Además de lo descrito previamente, se debe destacar las características individuales de cada animal tienen un rol fundamental en el desarrollo de la infección, uno de los factores más influyentes es la cantidad y calidad de inmunidad materna que cada cachorro recibió. Este aspecto, aunque no pudo ser cuantificado, se observó en el trabajo en 2 camadas de hermanos que ingresaron al ensayo, los cuales en teoría comenzaron a transitar la infección paralelamente, pero la evolución en el tiempo presentó matices entre los cachorros de una misma camada. Una camada de 3 cachorros Husky de 45 días de edad, cuya madre presentaba plan de vacunación al día según su tutora, murieron a los 2, 4 y 7 días respectivamente. Los cachorros que sobrevivieron 4 y 7 días formaban parte del grupo B (grupo ozono). Por otro lado, una camada de 4 cachorros Dachshund de 90 días, fueron dados de alta a los tres días de internación, a pesar de verse diferencias clínicas claras, pero no cuantificables entre los hermanos. Por tanto, se entiende que es necesario profundizar y continuar con el ensayo clínico aumentando el número de animales y formando grupos más homogéneos.

Por otro lado, al analizar los componentes hemáticos, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre ambos grupos en ninguno de los parámetros analizados (hematocrito, número de eritrocitos millones/ μ l y de leucocitos miles/ μ l). Al analizar cada grupo y comparando la evolución de los diferentes parámetros en el tiempo, se observó únicamente un aumento con diferencia estadística significativa en el número de leucocitos entre el día 1 y el día 5 y el día 3 y el 5 en el grupo control. Este hallazgo tiene una significancia biológica relevante ya que al observar el número de leucocitos de todos los animales que participaron en el estudio, los que murieron fueron los animales que no lograron mantener o aumentar este parámetro. Al analizar detalladamente los datos obtenidos en el presente trabajo, se observa que teniendo en cuenta la totalidad de animales incluidos en el trabajo, los que no sobrevivieron presentaban menos de 1×10^3 leucocitos/ μ l, siendo el valor de referencia entre 6 y 17×10^3 / μ l. Estos resultados complementan lo reportado por Mazzaferro (2020), quien describe que un recuento total de leucocitos superior a 4500/ μ l y un recuento de linfocitos superior a 1000/ μ l en el momento de la admisión y durante 48 horas de hospitalización predicen fuertemente la supervivencia. Por otro lado, el parámetro número de leucocitos, en las condiciones del presente ensayo, no mostró diferencias significativas al comparar los grupos A y B para cada momento del muestreo. La leucopenia es un hallazgo frecuente, se debe a la citólisis causada en las células precursoras de la médula ósea por la replicación viral (Hoelzer y

Parrish, 2010; Mylonakis et al., 2016). En el presente ensayo se encontró que un 58% de los caninos presentaron leucopenia al momento de ingresar al Hospital Veterinario Escuela, en discordancia con lo descrito por Iris et al. (2010), quien describe que aproximadamente un tercio de los animales que analizaron presentaron leucopenia. Asimismo, se describe que en algunos animales se puede observar una neutrofilia y monocitosis (Iris et al., 2010). Sin embargo, esta neutrofilia y monocitosis se podría explicar por las infecciones bacterianas secundarias que acompañan la infección con CPPV-1 (Decaro y Buonavoglia, 2012). Si bien, no se hizo un recuento diferencial de leucocitos, se evidenció que en el grupo con ozono la pendiente de disminución de las células totales es levemente más pronunciada que en el grupo, lo que permitiría asumir que o no hubo, o fue menos importante, la neutrofilia causada por las infecciones bacterianas secundarias en el grupo tratado con ozono. Podemos teorizar que esto se debe a la capacidad del ozono de reducir la multiplicación y liberación de endotoxinas de las enterobacterias (Shinozuka et al., 2008). Los parámetros de hematocrito y número de eritrocitos/ μl se mantuvieron en valores normales en todos los animales que formaron parte de este ensayo clínico, a pesar de la evidencia clínica de sangre en las heces.

Por otro lado, y en relación a la respuesta inmune humoral, los animales que sobrevivieron a la enfermedad presentaron una seroconversión detectable a los 15 días luego de su ingreso al Hospital Veterinario Escuela. Por otra parte, el título de anticuerpos se mantuvo en 5 de los animales a los 30 días y en 7 animales se observó un aumento del título entre el día 15 y el 30, en uno de los animales no se pudo obtener la muestra del día 30. Al considerar ambos grupos, a los 15 días en todos los animales menos en uno (12/13) se observó un título de anticuerpos hemaglutinantes mayor al reportado como protector ($\geq 1/80$) (Pratelli et al., 2001). Esto coincide con lo reportado por Decaro et al. (2005a), quienes describen que caninos infectados naturalmente a los 14 días también presentaron títulos protectores por IHA, los cuales se mantuvieron estables durante su tiempo de muestreo que fue de 28 días. En cambio, en el presente ensayo se observó que un 58% de los animales presentó un aumento del título de anticuerpos entre el día 15 y 30. Cabe destacar que los títulos reportados por Decaro et al. (2005a) son como mínimo 2 diluciones superiores a los observados en el presente trabajo. La diferencia en el título alcanzado entre ambos ensayos puede deberse a varios factores. Entre ellos la cepa viral actuante, en el trabajo reportado por los investigadores italianos los caninos fueron infectados por la cepa CPV-2c, en este estudio no se identificó la cepa actuante. También es preciso señalar que los seis cachorros incluidos en el ensayo de Decaro et al. (2005a) vivían juntos en una misma instalación junto a otros 12 animales adultos vacunados. Se puede hipotetizar que dichos animales a pesar de no presentar sintomatología clínica, podrían ser una fuente de excreción viral manteniendo una estimulación en el tiempo, provocando un aumento en la respuesta humoral de esos cachorros. A diferencia de los animales incluidos en este ensayo que pertenecían a

domicilios aleatorios y la mayoría no tenía contacto con otros animales. Por otro lado, los títulos de anticuerpos por IHA menores a 1/20 dejan a los caninos susceptibles a la enfermedad y la infección por parvovirus canino (Cavalli et al., 2021). En el presente trabajo se encontró que 5 de los 6 caninos que no sobrevivieron la infección, en el muestreo del día 0 no presentaron títulos de anticuerpos detectables, el canino restante presentó un título de 1/32 UIHA. Sin embargo, de los 13 caninos que sobrevivieron a la infección solo 4 presentaron ausencia o títulos de anticuerpos menores a 1/20. Posiblemente la capacidad de montar una respuesta de anticuerpos al momento de exposición al virus por parte de los caninos infectados, haya sido determinante para el desenlace de la patología ya que la respuesta de anticuerpos es fundamental para la protección de los animales (Hoelzer y Parrish 2010). Finalmente, en este trabajo no se encontraron diferencias estadísticas significativas en los niveles de anticuerpos entre ambos grupos en ninguno de los momentos de muestreo para este parámetro. Un dato relevante que debe ser considerado en este punto es que, a pesar de que los grupos se generaron de manera aleatoria utilizando el programa Research Randomizer, el promedio de título de anticuerpos el día 0 (al ingreso del animal a la internación), fue mayor en el grupo que recibió el tratamiento con ozono. Cabe mencionar que la toma de muestra de sangre de los animales fue realizada previo al comienzo del tratamiento concomitante con ozono. Por tal motivo, no se pudo asociar esta variable (título de anticuerpos) y el tratamiento con ozono. En este sentido, se ha demostrado que un elevado título de anticuerpos presenta una incidencia positiva en la sobrevivencia a la infección. Los anticuerpos son determinantes para la protección de los caninos frente a CPPV-1 (Hoelzer y Parrish, 2010) y por tal razón es esperable que este hecho pueda haber alterado la expectativa del efecto del ozono en este ensayo.

El resultado con respecto a la excreción viral también se comportó como era esperable, ya que la misma fue disminuyendo en los consecuentes muestreos. No se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos en ninguno de los momentos de muestreo realizados. Para el análisis estadístico fueron utilizados métodos no paramétricos ya que en ambos grupos en los tres momentos muestreados se observó un desvío estándar superior a la media. Esto evidencia la disparidad de los datos en cada uno de los grupos, posiblemente debido a la diferencia en los estadíos clínicos de los animales incluidos, ya que animales que hayan desarrollado una forma más grave de la enfermedad posiblemente muestren diferencias en el título viral excretado. En el presente trabajo no fue posible confirmar o desestimar este supuesto. Por un lado, se ha comprobado que el ozono estimula la regeneración tisular (Sagai y Bocci, 2011), por tanto, se presume que la aplicación intrarrectal ayudaría a la regeneración de la mucosa colorrectal. Por otro lado, el ozono mejora la respuesta inmune celular, la cual es fundamental para la recuperación de la infección por este virus (Hoelzer y Parrish 2010). Teniendo en cuenta ambas evidencias, se esperaba que el

grupo tratado con ozono evidenciara una menor excreción viral a lo largo del tiempo, constituyendo una menor fuente de contagio para otros animales susceptibles. Se considera que el número limitado de animales incluidos en el ensayo, no permite descartar completamente esta hipótesis, siendo necesario profundizar el estudio aumentando el número de caninos incluidos, lográndose resultados estadísticos más robustos. La eliminación persistente o periódica de CPPV-1 en las heces se ha observado sólo en raras ocasiones, por tanto, se creía que la excreción viral cesaba con la recuperación clínica del animal, ya que animales convalecientes no son fuente de contagio luego aproximadamente 20 días desde la infección. Con la aplicación de técnicas más sensibles se demostró que la misma puede mantenerse hasta aproximadamente 50 días (Decaro et al., 2005a). En ese sentido, los resultados obtenidos coinciden con los presentados por Decaro et al. (2005a), ya que en la totalidad de los animales se detectó la presencia del virus en hisopados rectales a los 30 días de su ingreso al centro hospitalario. La carga viral detectada en el muestreo a los 30 días fue mínima, en un rango de 0 a 254 copias/ μ l, con una mediana de 6.7 copias/ μ l, en donde en un 60% de las muestras se detectó una carga viral menor a una decena de copias/ μ l. Probablemente el nivel de excreción viral de esos animales no constituya un riesgo mayor para otros animales susceptibles, ya que la gran sensibilidad de la *dd*PCR permitió detectar una carga viral tan baja. Por un lado, la detección del genoma viral en las heces no implica que esas partículas virales sean infectivas. Por otro lado, teniendo en cuenta que entre las causas de los resultados falsos negativos de algunas técnicas diagnósticas que implican la interacción del virus con las células (AV, HA), se supone es debido a la opsonización de los viriones por los anticuerpos, posiblemente esas partículas virales no sean infectivas para nuevas células. Sin embargo, esto no ha sido comprobado, por tanto, los animales en recuperación se consideran contaminantes ambientales para este virus. Por tanto, detección de animales subclínicos y la monitorización de animales en recuperación mediante una técnica de gran sensibilidad, como la descrita en este trabajo, puede ser una estrategia a aplicarse para evitar la contaminación ambiental y el contagio a otros animales susceptibles, sobre todo en ambientes donde hay concentración de animales, como los refugios, criaderos, y parques caninos.

Si consideramos la correlación entre el título de anticuerpos y la carga viral excretada, existe una correlación negativa media y significativa en ambos grupos. Este resultado también se comportó como era lo esperado en el desarrollo normal de esta enfermedad infecciosa, es decir a medida que pasa el tiempo el sistema inmune es capaz de controlar la infección, lo que produce un aumento en el título de anticuerpos y una disminución en la excreción viral (Decaro et al., 2005). Se pudo observar que esta correlación fue mayor en el grupo que recibió el tratamiento concomitante con ozono (0,044% copias/ μ l por cada unidad de IHA) que en el grupo control (0,023% copias/ μ l por cada unidad de IHA). Esto quiere decir, que los animales tratados con ozono, por

cada unidad que aumentó su título de anticuerpo, tuvieron mayor disminución en la excreción viral con respecto a los animales que no recibieron ozonoterapia.

Mientras que para la protección de la infección la inmunidad humoral es determinante, para la recuperación de la infección la inmunidad celular es fundamental (Hoelzer y Parrish 2010). Díaz et al. (2013) relatan una serie de beneficios inmunomoduladores local y sistémico al recibir ozonoterapia por la vía intrarectal, al favorecer la absorción de muramildipéptido (MDP) y lipopolisacáridos (LPS), derivados de las bacterias de la flora intestinal. Estas sustancias presentan actividad inmunoadyuvante y son potentes inductoras de citocinas facilitando la activación de los linfocitos intrahepáticos y las células de Kupffer. Existen evidencias científicas que respaldan que la ozonoterapia estimula la producción de diferentes citoquinas entre ellas la IL-2, la IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interferón gamma (INF- γ) (Travagli et al., 2007), las cuales presentan una acción estimulante de la rama celular de la respuesta inmune al estimular a las células NK, linfocitos T y B. Asimismo se describe que el ozono puede equilibrar la flora bacteriana y permitir la inmunoactividad normal (Díaz et al., 2013). Es interesante observar que en el grupo tratado con ozono la correlación entre la excreción viral y la respuesta de anticuerpos es más marcada que en el grupo control, ya que presenta un valor *p* menor. Teniendo en cuenta lo mencionado previamente, se puede hipotetizar que el ozono, al estimular la respuesta celular de los animales, colabora con la eliminación de la infección más rápidamente, ya que como se mencionó previamente la respuesta inmune celular es fundamental para la recuperación de la infección (Hoelzer y Parrish 2010).

En este experimento no se pudo demostrar una diferencia estadística significativa en el tratamiento concomitante con ozono en caninos naturalmente infectados con CPPV-1. En ese sentido, varios factores podrían explicar estos resultados, destacándose en primer lugar el bajo número de animales que componían cada uno de los grupos de estudio. Esta es una limitante siempre que se realizan ensayos con infecciones naturales, donde el número de animales es generalmente escaso y muchas veces la significancia estadística puede estar limitada. En los resultados estadísticos analizados, no sólo no se pudo hallar una diferencia, sino que tampoco se observó una tendencia hacia una mejora o agravamiento del cuadro clínico cuando se aplicaba la terapia concomitante. Por otra parte, otro factor que pudo haber influenciado en los resultados, es el modo de acción del ozono aplicado como terapia. Como se mencionó previamente, el ozono medicinal provoca un estrés oxidativo transitorio, el cual genera una activación del sistema antioxidante endógeno. Sin embargo, la línea entre la efectividad y la toxicidad del ozono es dependiente del nivel de estrés oxidativo (Sagai y Bocci, 2011). El ensayo realizado por Panda et al. (2008) monitoreó el estrés oxidativo presente en animales con gastroenteritis hemorrágica producida por el Parvovirus canino, demostrando que los caninos infectados presentaban niveles elevados de peróxidos lipídicos y alteración de las enzimas

antioxidantes, lo que indica un estado de estrés oxidativo. Se observó, además, un estado de sobre-regulación en la actividad y síntesis de enzimas antioxidantes en los animales clasificados como moderadamente afectados, pero en los caninos gravemente afectados se observó un estado de daño oxidativo no compensatorio. En el presente ensayo no se realizó una división en afección clínica leve, moderada o severa de los caninos que fueron incluidos, pero posiblemente esta diferencia en los cuadros clínicos tuvo relación con el resultado ya que varios animales llegaron al centro Hospital Veterinario Escuela con una afección grave y posiblemente se encontraban en un estado de estrés oxidativo no compensatorio, es decir su sistema antioxidante endógeno se encontraba sobrepasado y era incapaz de contrarrestar el daño producido por la infección. Por otro lado, la capacidad virucida del ozono está influenciada entre otros factores por la presencia de materia orgánica, posiblemente debido a la competencia con la gran cantidad de proteínas presente en la misma, disminuyendo esta por tanto su efectividad (Murray et al., 2008). En la mucosa colorrectal, el ozono se disuelve inmediatamente en el agua que recubre el epitelio y reacciona con las moléculas presentes en dicha película líquida, generando así peróxido de hidrógeno y LOPs. Los LOPs, se absorben a través de los vasos linfáticos y capilares e ingresan a la circulación general (Bocci et al., 2000). Por tanto, se plantean dos hipótesis. La primera es que la cantidad excesiva de materia orgánica en el intestino produzca un efecto de dilución en el ozono administrado por vía intrarrectal, sumado al tránsito intestinal aumentado debido a la propia patología infecciosa, lo cual impediría la correcta absorción de la dosis aplicada a los animales del ensayo, no logrando el efecto buscado en los mismos. La segunda hipótesis, es que el ozono al reaccionar con la gran cantidad de materia orgánica presente en la luz intestinal, se formen LOPs en cantidades excesivas. Estos generan un estado de estrés oxidativo transitorio, pero al ser absorbidos por la mucosa colorrectal de un animal que ya se encuentra en estrés oxidativo debido a la infección por CPPV-1, posiblemente agraven el cuadro clínico. En consecuencia, para una patología tan aguda y grave como es la producida por el parvovirus canino, posiblemente otra vía de administración de la ozonoterapia, como puede ser la administración de soluciones ozonizadas intravenosas, produzca mejores resultados. Con el fin de comprobar este supuesto, es necesario profundizar mediante más estudios clínicos.

8. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el primero en estudiar el efecto de la ozonoterapia en el CPPV-1 *in-vivo* e *in-vitro*.

De manera *in-vitro* se comprobó el efecto deletéreo del ozono en el CPPV-1, provocando una disminución tanto en la capacidad hemaglutinante de la cápside viral como en el número de copias virales detectadas, aunque no pudo ser evaluado el efecto en su capacidad infectiva. Dichos efectos se demostraron en dosis bajas utilizadas para la terapia de los animales, pronunciándose aún más su efecto al aumentar la dosis al doble, evidenciando su utilidad como un posible desinfectante ambiental.

En el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Veterinaria - UdelaR se diseñó y puso a punto la técnica de *ddPCR* para detectar este patógeno. Este ensayo es el primer trabajo reportando el uso de la tecnología *ddPCR* para la cuantificación viral de CPPV-1.

En la aplicación *in-vivo* no se observaron diferencias significativas ni en la evolución clínica, los parámetros hematológicos, la respuesta humoral o la carga viral excretada en los animales que recibieron ozonoterapia sistémica concomitante en comparación con los caninos que solo recibieron la terapia convencional indicada para su tratamiento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Appel, M.J.G.; Scott, F.W.; Carmichael, L.E. (1979). Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet. Rec.* 105:156-159.

Arvia, R.; Sollai, M.; Pierucci, F.; Urso, C.; Massi, D.; Zakrzewska, K. (2017). Droplet digital PCR (ddPCR) vs quantitative real-time PCR (qPCR) approach for detection and quantification of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) DNA in formalin fixed paraffin embedded (FFPE) cutaneous biopsies. *Journal of Virological Methods*, 246, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.003>

Baylis, S. A.; Miskey, C.; Blümel, J.; Kaiser, M.; Kapusinszky, B.; Delwart, E. (2020). Identification of a novel bovine copiparvovirus in pooled fetal bovine serum. *Virus Genes* 56:522–526

Bocci V, Borrelli E, Corradeschi F, Valacchi G. (2000). Systemic effects after colorectal insufflation of oxygen-ozone in rabbits. *Int J Med Biol Environ*, 28:109-113

Bocci, V., Zanardi, I., Michaeli, D., & Travagli, V. (2009). Mechanisms of Action and Chemical-Biological Interactions Between Ozone and Body Compartments: A Critical Appraisal of the Different Administration Routes. In *Current Drug Therapy* (Vol. 4, Issue 3, pp. 159–173).

Bruice, P.Y. (2001). *Organic Chemistry*, 3rd edition. Prentice Hall, New Jersey.

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

Cao, L.; Cui, X.; Hu, J.; Li, Z.; Choi, J.; Yang, Q.; Lin, M.; Ying Hui, L.; Xu, F. (2016). Advances in digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) and its Emerging Biomedical Applications. *Biosensors and Bioelectronic*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.09.082>.

Carmichael, L.E., Joubert, J.C., Pollock, R.V., (1980). Hemagglutination by canine parvovirus: Serologic studies and diagnostic applications. *American Journal of Veterinary Research* 41, 784–791.

Carpendale, M. T.F.; Freeberg, J.K. (1991). Ozone inactivates HIV at noncytotoxic concentrations. *Antiviral Research*, vol16 (3), 281-292. doi: 10.1016/0166-3542(91)90007-E.

Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Lanave G, Barrs VR, Decaro N, Buonavoglia C. (2021). Modified haemagglutination inhibition assay for the

detection of canine parvovirus type 2 antibodies in dog sera. *Vet J.* 274:105709. doi: 10.1016/j.tvjl.2021.105709. Epub 2021 Jun 19. PMID: 34157378.

Cespedes-Suarez, J., Martin-Serrano, Y., Carballosa-Peña, M. R., & Dager-Carballosa, D. R. (2018). The immune response behavior in HIV-AIDS patients treated with Ozone therapy for two years. In *Journal of Ozone Therapy* (Vol. 2, Issue 3).

Decaro, N.; Desario, C.; Campolo, M.; Elia, G.; Martella, V.; Ricci, C.; Lorusso, E.; Buonavoglia, C. (2005a). 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, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. (2005b). A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol.* 105(1):19-28. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.09.018.

Decaro, N.; Buonavoglia, C. (2012). Canine parvovirus—A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology* 155: 1–12.

Decaro N, Desario C, Billi M, Lorusso E, Colaianni ML, Colao V, Elia G, Ventrella G, Kusi I, Bo S, Buonavoglia C. (2013). Evaluation of an in-clinic assay for the diagnosis of canine parvovirus. *Vet J.*198(2):504-7. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.08.032.

Decaro, N.; Buonavoglia, C.; Barrs V.R. (2020). Canine parvovirus vaccination and immunisation failures: Are we far from disease eradication? *Veterinary Microbiology* 247 108760

Degli Agosti, I.; Ginelli, E.; Mazzacane, B.; Peroni, G.; Bianco, S.; Guerriero, F.; Ricevuti, G.; Perna, S.; Rondanelli, M. (2016). Effectiveness of a Short-Term Treatment of Oxygen-Ozone Therapy into Healing in a Posttraumatic Wound. *Case Reports in Medicine* Volume 2016, Article ID 9528572.

Desario, C.; Decaro, N.; Campolo, M.; Cavalli, A.; Cirone, F.; Elia, G.; Martella, V.; Lorusso, E.; Camero, M.; Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus?. *J Virol Methods.* Jun;126(1-2):179-85.

Díaz Luis, J., Macías Abraham, C.; Menéndez Cepero, S. (2013). Efecto modulador de la ozonoterapia sobre la actividad del sistema inmune. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 29(2), 143-153.

Duricic, D.; Valpotic, H.; Zura Zaja, I.; Samardzija, M. (2016). Comparison of Intrauterine Antibiotics versus Ozone Medical Use in Sheep with Retained

Placenta and Following Obstetric Assistance. *Reprod Dom Anim* doi: 10.1111/rda.12715

Escarpanter Buliés JC. (2005). Oxígeno-ozonoterapia como coadyuvante en el tratamiento de las infecciones óseas. *Rev Cubana Ortop Traumatol* 19(1):4-9.

Falzone, L.; Musso, N.; Gattuso, G.; Bongiorno, D.; Palermo C. L.; Scalia, G.; Libra, M.; Stefani, S. (2020). Sensitivity assessment of droplet digital PCR for SARS-CoV-2 detection. *International journal of molecular medicine* 46: 957-964.

Flores, E.F. (2007). *Virologia Veterinária*. Capítulo 14. Santa Maria: Ed. da UFSM, 888 p.

Gerlach, M.; Proksch, A. L.; Dörfelt, R.; Unterer, S.; Hartmann, K. (2020). Therapy of canine parvovirus infection – review and current insights. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*; 48: 26–37.

Greene, C.E. (2012). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edn. St Louis, Saunders Elsevier. p1376.

Hafenstein, S.; Palermo, L.M.; Kostyuchenko, V.A.; Xiao, C.; Morais, M.C.; Nelson, C.D.; Bowman, V.D.; Battisti, A.J.; Chipman, P.R.; Parrish, C.R.; Rossmann, M.G. (2007). Asymmetric binding of transferrin receptor to parvovirus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17;104(16):6585-9. doi: 10.1073/pnas.0701574104. Epub 2007 Apr 9. PMID: 17420467; PMCID: PMC1871829.

Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, Abdul-Ali D, Shi L, Pounds S, Caliendo AM. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol*.;51(2):540-6. doi: 10.1128/JCM.02620-12.

Heldt, C. L.; Hernandez, R.; Mudiganti, U.; Gurgel, P. V.; Brown, D.T.; Carbonell, R. G. (2006). A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *Journal of Virological Methods* 135, 56–65

Hernández Avilés, M.; Malpica Rojo, A. Alcalde González, R. (2016). La Ozonoterapia como tratamiento coadyuvante en oncología veterinaria. Casos clínicos. *Revista Española de Ozonoterapia*, vol. 6, nº 1, pp. 223-229

Hernando, E.; Llamas-Saiz, A.L.; Foces-Foces, C.; McKenna, R.; Portman, I.; Agbandje-McKenna, M.; Almendra, I J.M. (2000). Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles. *Virology*. 2000 Feb 15;267(2):299-309. doi: 10.1006/viro.1999.0123. PMID: 10662625.

Hoelzer, K.; Parrish, C.R. (2010). The emergence of parvovirus of carnivores. *Vet. Res.* 41:39.

<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

<https://www.random.org/lists/>

Hudson J.B.; Sharma, M.; Petric, M. (2007). Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *J Hosp Infect*, doi:10.1016/j.jhin.2006.12.021

Iris ,K.; Leontides L. S.; Mylonakis M.E. (2010). Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Res Vet Sci.* 2010;89:174-178.

Jefferson, T.; Spencer, E.A.; Brassey, J.; Heneghan, C. (2021). Viral Cultures for Coronavirus Disease 2019 Infectivity Assessment: A Systematic Review. *Clin Infect* 73(11):e3884-e3899. doi: 10.1093/cid/ciaa1764. PMID: 33270107; PMCID: PMC7799320.

Kerr, J.; Cotmore, S.F.; Bloom, M.E.; Linden, R.M.; Parrish, C.R. (2006). *Parvoviruses* 1st edition. Ed. Edward Arnold. Great Britain.

Khan, S., Smith, N., Wilson, A., Gandhi, J., & Vatsia, S. (2017). Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. In *Medical Gas Research* (Vol. 7, Issue 3, p. 212).

Kim YK, Lim SI, Choi S, Cho IS, Park EH, An DJ. (2015). A novel assay for detecting canine parvovirus using a quartz crystal microbalance biosensor. *J Virol Methods.* 219:23-27. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.03.015.

Knipe, D.M. y Howley P. M. (2013). *Fields Virology*. Capítulo 57. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA. 2456p.

Kumar, M., Nandi, S. & Chidri, S. (2010). Development of a polyclonal antibody-based AC-ELISA and its comparison with PCR for diagnosis of canine parvovirus infection. *Virol. Sin.* 25, 352–360. <https://doi.org/10.1007/s12250-010-3132-x>

Langlais, B.; Reckhow, D. A.; Brink, D.R. (1991) *Ozone in Water Treatment: Application and Engineering*. Chelsea, MI: Lewis Publisher Inc. 218p.

Li, H.; Bai, R.; Zhao, Z.; Tao, L.; Ma, M.; Ji, Z.; Jian, M.; Ding, Z.; Dai, X.; Bao, F.; Liu, A. (2018). Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience Reports* 38 BSR20181170.

Lillsunde Larsson, G. y Helenius, G. (2017). Digital droplet PCR (ddPCR) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 - a short report. *Cell Oncol.* 40:521–527

- Liu C, Shi Q, Peng M, Lu R, Li H, Cai Y, Chen J, Xu J, Shen B. (2020). Evaluation of droplet digital PCR for quantification of SARS-CoV-2 Virus in discharged COVID-19 patients. *Aging (Albany NY)*. 1;12(21):20997-21003. doi: 10.18632/aging.104020.
- MacLachlan, N.; Dubovi, E.J.; Barthold,S.; Swayne, D.; Winton, R. (2017). *Fenner's Veterinary Virology*, 5th edition Capítulo 12. Ed. Elsevier London. United Kingdom, 581p.
- Mazzaferro, E: L. (2020) Update on Canine Parvoviral Enteritis. *Vet Clin Small Anim* 50 1307–1325. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2020.07.008>
- Mech LD, Almberg ES, Smith D, Goyal S, Singer RS.(2012). Use of real-time PCR to detect canine parvovirus in feces of free-ranging wolves. *J Wildl Dis*. 48(2):473-6. doi: 10.7589/0090-3558-48.2.473.
- Mietzsch, M.; Péntzes, J.J.; Agbandje-McKenna, M. (2019) Twenty-Five Years of Structural Parvovirology. *Viruses*.11(4):362. doi: 10.3390/v11040362. PMID: 31010002; PMCID: PMC6521121.
- Miranda, C.; Thompson,G. (2016). Canine parvovirus in vaccinated dogs: a field study. *Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.103508.
- Mohammadi, Z.; Shalavi, S.; Soltani, M.; Asgary, S. (2013). A Review of the Properties and Applications of Ozone in Endodontics: An Update. *Iranian Endodontic Journal*, 8(2):40-43
- Mukhopadhyay HK, Amsaveni S, Matta SL, Antony PX, Thanislass J, Pillai RM. (2012) Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus DNA directly in faecal specimens. *Lett Appl Microbiol*. 55(3):202-9. doi: 10.1111/j.1472-765X.2012.03284.x.
- Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. (2010). *Inmunobiología de Janeway*. 7ma edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana de México
- Murray, B.K.; Ohmine, S.; Tomer, D.P.; Jensen, K.J.; Johnson, F.B.; Kirsi, J.J.; Robisona, R.A.; O'Neill, K.L. (2008). Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of Virological Methods* 153, 74–77.
- Mylonakis, M.; Kalli, I.; Rallis, T. (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports*:7 91–100.
- Ogata, A.; Nagahata, H. (2000). Intramammary application of ozone therapy to acute clinical mastitis in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci* 62, 7 681-686
- Ordaz-Trinidad, N.; Dorantes-Álvarez, L.; Salas-Benito, J.; Barrón-Romero, B.L.; Salas-Benito, M.; De Nova-Ocampo, M. (2018). Citotoxicidad y

actividad antiviral de extractos de chiles (*Capsicum* spp). *Polibotanica* 46: 273-285.

Ortega, R y Pérez, R.(1989). Aplicación de la ozonoterapia en la gastroenteritis hemorrágica del perro. *Cenic Ciencias Biológicas*, 20, 1-2-3.

Panda, D.; Patra, R.C.; Nandi, S.; Swarup, D. (2009). Oxidative stress indices in gastroenteritis in dogs with canine parvoviral infection. *Research in Veterinary Science* 86, 36–42.

Park C, Lee J, Hassan ZU, Ku KB, Kim SJ, Kim HG, Park EC, Park GS, Park D, Baek SH, Park D, Lee J, Jeon S, Kim S, Lee CS, Yoo HM, Kim S. (2021). Comparison of Digital PCR and Quantitative PCR with Various SARS-CoV-2 Primer-Probe Sets. *J Microbiol Biotechnol.* 31(3):358-367. doi: 10.4014/jmb.2009.09006.

Parrish, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., (1991). Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J.Virol.* 65: 6544–6552.

Parrish. C.R. (2010). Structures and functions of parvovirus capsids and the process of cell infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 343:149-76. doi: 10.1007/82_2010_33. PMID: 20397069.

Parthiban M, Divya KC, Kumanan K, Bargavi DS. (2012) A rapid and highly reliable field-based LAMP assay of canine parvovirus. *Acta Virol.* 56(1):71-4. doi: 10.4149/av_2012_01_71.

Pauwels R., J. Balzarini, M. Baba, R. Snoeck, D. Schols, P. Herdewijn, J. Desmyter y E. De Clerq. (1988). Rapid and automated tetrazolium-based colorimetric assay for the detection of anti-HIV compounds. *J. Virol. Methods.* 20: 309-321.

Petry, G.; Grazziotin Rossato,L.; Nespolo, J.; Kreutz, L.C.; Dallazem Bertol1, C. (2014). In Vitro Inactivation of Herpes Virus by Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 36: 249 doi:10.1080/01919512.2013.862165

Petry, G.; Grazziotin Rossato,L.; Nespolo, J.; Kreutz, L.C.; Dallazem Bertol1, C. (2014). In Vitro Inactivation of Herpes Virus by Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 36: 249–252. DOI: 10.1080/01919512.2013.862165

Picoli, T.; Barbosa, J.; Vargas, G.; Hübner, S.; Fischer, G. (2015). Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (dmsO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (MDBK). *Science And Animal Health.* 3. 159. 10.15210/sah.v3i2.6585.

Pinheiro-de-Oliveira T.F.; Fonseca-Júnior A.A.; Camargos M.F.; Laguardia-Nascimento M.; Giannattasio-Ferraz S.; Cottorello A.C.P.; de Oliveira A.M.; Góes-Neto A.; Barbosa-Stancioli E.F. (2019) Reverse transcriptase droplet

digital PCR to identify the emerging vesicular virus Senecavirus A in biological samples. *Transbound Emerg Dis.*;66(3):1360-1369. doi: 10.1111/tbed.13168.

Pittman, N.; Misseldine, A.; Geilen, L.; Halder, S.; Smith, J.; Kurian, J.; Agbandje-McKenna, M. (2017). Atomic Resolution Structure of the Oncolytic Parvovirus L1 by Electron Microscopy and 3D Image Reconstruction. *Viruses*, 9(11), 321. doi:10.3390/v9110321

Pratelli, A.; Cavalli, A.; Martella, V.; Tempesta, M.; Decaro, N.; Carmichael, L. E.; 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(3): 612–615.

Predmore, A.; Sanglay, G.; Li, J.; Lee, K. (2015). Control of human norovirus surrogates in fresh foods by gaseous ozone and a proposed mechanism of inactivation. *Food Microbiology* 50 118e125

Quan, P.; Sauzade, M.; Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18, 1271

Roche, C.E. y Romero, A.D.(1994). Estrés oxidativo y degradación de proteínas, *Medicina clínica*. 103(5), 189-196

Sagai, M.; Bocci, V. (2011). Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? In *Medical Gas Research* (Vol. 1, Issue 1, p. 29).

Savi, L. A.; Barardi, C.; SIMOES, C. (2006). Evaluation of Antiherpetic Activity and Genotoxic Effects of Tea Catechin Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 54, 2552-2557

Schwartz, A.; Martínez-Sánchez, G.; Sabah, F. (2015). Declaración de Madrid sobre ozonoterapia ISCO3, 2da edición. Madrid, España.

Schelotto, F. (2004). Temas de bacteriología y virología médica. Capítulo 5. Montevideo, Uruguay: Oficina del Libro. Fundación de Ediciones de la Facultad de Medicina de la UDELAR. ISBN 9974-31-194-2

Sciorsci, R. L.; Lillo, E.; Occhiogrosso, L.; Rizzo, A. (2020). Ozone therapy in veterinary medicine: A review. *Research in Veterinary Science*, 130, 240–246.

Scutari, R.; Piermatteo, L.; Manuelli, M.; Iannetta, M.; Salpini, R.; Bertoli, A.; Alteri, C.; Saccomandi, P.; Bellocchi, M.; Malagnino, V.; Teti, E.; Sforza, D.; Siragusa, L.; Grande, M.; Sarmati, L.; Svicher, V.; Andreoni, M.; Ceccherini-Silberstein, F. (2020). Long-Term SARS-CoV-2 Infection associated with viral dissemination in different body fluids including bile in two patients with acute cholecystitis. *Life*, 10, 302

- Segev, G.; Yaaran, T.; Maurice, S.; Baneth, G. (2022). Effect of sampling site on the diagnosis of canine parvovirus infection in dogs using polymerase chain reaction. *J Vet Intern Med.* doi: 10.1111/jvim.16373.
- Shinozuka, Y.; Uematsu, K.; Takagi, M.; Taura, Y. (2008). Comparison of the amounts of endotoxin released from *Escherichia coli* after exposure to antibiotics and ozone: an in vitro evaluation. *J. Vet. Med. Sci.* 70(4): 419–422.
- Streck, F.; Rüster, D.; Truyen, U.; Homeier, T. (2013). An updated TaqMan real-time PCR for canine and feline parvoviruses. *A Journal of Virological Methods* 193, 6– 8.
- Tafur, M. F.; Saagar Vijayaragavan, K.; Heldt, C. L. (2013) Reduction of porcine parvovirus infectivity in the presence of protecting osmolytes. *Antiviral Research* 99, 27–33
- Taylor, S.; Carbonneaub, j.; Sheltonc, D.; Boivin, G. (2015). Optimization of Droplet Digital PCR from RNA and DNA extracts with direct comparison to RT-qPCR: Clinical implications for quantification of Oseltamivir-resistant subpopulations. *Journal of Virological Methods* 224 58–66
- Thurston-Enriqueza, J.A.; Haasb, C. N.; Jacangeloc, J.; Gerba, C. P. (2005). Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone. *Water Research* 39, 3650–3656
- Tizaoui C, Stanton R, Statkute E, Rubina A, Lester-Card E, Lewis A, Holliman P, Worsley D. (2022). Ozone for SARS-CoV-2 inactivation on surfaces and in liquid cell culture media. *J Hazard Mater.* 428:128251. doi: 10.1016/j.jhazmat.128251.
- Travagli, V.; Zanardi, I.; Silviotti, A.; Bocci, V. (2007). A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol.* 41: 504-11.
- Truyen, U. (2006). Evolution of canine parvovirus—A need for new vaccines? *Veterinary Microbiology* 117 (2006) 9–13.
- Tseng, C.; Li, C. (2008). Inactivation of Surface Viruses by Gaseous Ozone. *Journal of Environmental Health*, vol 70, number 10.
- Viebahn-Hänsler, R.; León Fernández, O.S.; Fahmy, Z. (2012): Ozone in Medicine: The Low- Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 34:6, 408-424.
- Yang Y, Zhang H, Komasa S, Morimoto Y, Sekino T, Kawazoe T, Okazaki J. (2021) UV/ozone irradiation manipulates immune response for antibacterial activity and bone regeneration on titanium. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*

129:112377. doi: 10.1016/j.msec.2021.112377. Epub 2021 Aug 14. PMID: 34579896.

Yeargin T, Buckley D, Fraser A, Jiang X. (2016). The survival and inactivation of enteric viruses on soft surfaces: A systematic review of the literature. *Am J Infect Control.* 1;44(11):1365-1373. doi: 10.1016/j.ajic.2016.03.018. Epub 2016 May 6. PMID: 27160982.

Yip Hye, Peaston A, Woolford L, Khuu SJ, Wallace G, Kumar RS, Patel K, Ahani Azari A, Akbarzadeh M, Sharifian M, Amanollahi R, Jafari Jozani R, Khabiri A, Hemmatzadeh F. (2020). Diagnostic Challenges in Canine Parvovirus 2c in Vaccine Failure Cases. *Viruses.* 12(9):980. doi: 10.3390/v12090980.

Zhang, Q.; Wang, Y.; Ji, Q.; Gu, J.; Liu, S.; Feng, X.; Sun, C.; Li, Y.; Lei, L. (2013). Selection of Antiviral Peptides Against Mink Enteritis Virus Using a Phage Display Peptide Library. *Curr Microbiol* 66:379–384.

Zobel, R.; Tkalcic, S.; Stokovic, S.; Pipal, I.; Buic, V. (2012). Efficacy of Ozone as a Novel Treatment Option for Urovagina in Dairy Cows. *Reprod Dom Anim* 47, 293–298; doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01857

ANEXO I

Tablas de ponderación numérica para monitorear la evolución clínica.

Parámetro	Ponderación numérica	Significado
Consistencia de las heces	0	No defeca
	1	Heces sólidas
	2	Heces pastosas
	3	Heces líquidas
Presencia de sangre en heces	0	No defeca
	1	Ausencia de sangre
	2	Presencia de sangre
Presencia y frecuencia de vómitos	0	Ausencia de vómitos
	1	Presencia de hasta 3 vómitos
	2	Presencia de hasta 5 vómitos
	3	Presencia de más de 6 vómitos
Respuesta al estímulo verbal	0	En pie, caminando
	1	Permanece en decúbito lateral/esternal, pero se pone en pie con estimulación verbal
	2	Decúbito esternal, aun siendo estimulado
	3	Decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza sin estímulo
	4	Decúbito lateral, mueve o levanta la cabeza solamente con estimulación verbal
	5	Decúbito lateral, no mueve o levanta la cabeza aun siendo estimulado verbalmente

ANEXO II

Datos del ensayo clínico sin procesar.

Evolución de los parámetros sanguíneos

Animal			Glóbulos Rojos	Hematocrito	Leucocito	Vivió o Murió
1A	Día	1	4,56	30	5,3	M
		3	4,23	27	0,26	
2A	Día	1	7,66	~	3,2	V
		3	~	~	6,9	
		5	6,83	43	14,2	
3A	Día	1	7,05	~	8,9	V
		3	~	38	6,9	
		5	6,72	42	11,3	
4A	Día	1	7,45	50	4,3	M
		3	6,18	53	2,2	
5A	Día	1	5,18	31	6,8	M
		4	4,77	31	0,2	
6A	Día	1	4,69	33	14	V
		3	5,15	31	10,7	
7A	Día	1	8,05	53	0,70	V
		3	6,78	46	1,1	
		5	5,57	39	10	
		7	5,95	41	19,21	
		9	~	~	35,5	
		11	~	~	32,8	
8A	Día	1	6,16	37	3,7	V
		3	~	~	0,6	
		5	~	~	10,7	
9A	Día	1		40	0,3	M
1B	Día	1	5,52	37	1,1	V
		3	4,49	29	9,4	
		5	3,92	24	10,6	

2B	Día	1	6,34	~	6,3	V
		3	~	36	6	
		5	6,61	42	14,8	
3B	Día	1	6,17	~	7,1	V
		3	~	37	8,9	
		5	6,84	44	14,9	
4B	Día	1	5,02	35	6,47	V
		3	4,54	30	3,6	
5B	Día	1	6,2	41	3,6	V
		3	7,24	49	0,4	
		5	5,17	35	3,1	
		7	4,18	29	7,8	
6B	Día	1	3,9	29	6,9	V
		3	3,98	30	3,4	
7B	Día	1	~	52	4,75	V
		3	~	~	4,6	
		5	~	~	5	
8B	Día	1	~	60	18,1	M
		3	~	~	13,4	
		5	5,49	35	0,6	
9B	Día	1	~	36	5,2	M
		3	~	~	0,7	
10B	Día	1	~	53	1,5	V
		3	~	46	5,6	
		5	~	45	7,5	

Título de anticuerpos por IHA y título de excreción viral por ddPCR

Animal		IHA en UIHA	ddPCR copias/ul
1A	día 0	0	2400000
2A	día 0	128	2780000
	día 15	128	36
	día 30	256	5,4
3A	día 0	64	424000
	día 15	125	1500
	día 30	256	198
4A	día 0	0	59000
5A	día 0	0	210000
6A	día 0	0	3500
	día 15	1024	237
	día 30	1024	246
7A	día 0	16	613000
	día 15	128	7
	día 30	128	0
8A	día 0	32	1230000
	día 15	64	23
	día 30	no sacamos	no sacamos
9A	día 0	32	se perdio
1B	día 0	512	175000
	día 15	512	17
	día 30	1024	10
2B	día 0	64	100000
	día 15	64	10
	día 30	256	2,9
3B	día 0	64	6000
	día 15	64	8
	día 30	128	2,7
4B	día 0	64	4200000
	día 15	256	770
	día 30	256	256

5B	día 0	16	460000
	día 15	64	890
	día 30	256	1,9
6B	día 0	0	7050000
	día 15	128	183
	día 30	256	28,5
7B	día 0	64	1320000
	día 15	128	332
	día 30	128	8
8B	día 0	0	113000
9B	día 0	0	1890000
10B	día 0	512	35000
	día 15	512	3.9
	día 30	512	0.4

Evolución clínica en base a tablas de ponderación numérica (Anexo I)

Animal										
1A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5					
CH	2	2	3		B					
P/ASH	2	2	2		B					
P/AV	1	2	2		B					
PFEV	1	1	1--2		B					
2A	Día 1	Día 2	Día 3							
CH	3	2	A							
P/ASH	2	1	A							
P/AV	3	0	A							
PFEV	1--2	1	A							
3A	Día 1	Día 2	Día 3							
CH	2	2	A							
P/ASH	1	1	A							
P/AV	2	0	A							
PFEV	0	0	A							
4A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6				
CH	3	3	2		3	B				
P/ASH	2	1	1		2	B				
P/AV	1	1	1		0	B				
PFEV	1	1	1		1	B				
5A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5					
CH	2	3		2	B					
P/ASH	1--2	2		1	B					
P/AV	1	1	1		B					
PFEV	1	1	1	1	B					
6A	Día 1	Día 2	Día 3							
CH	3		A							
P/ASH	2		A							
P/AV	o NS cu		A							
PFEV	0	0	A							
7A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 9	Día 10	Día 11
CH	3	3	3	3	3	3	3	3	3--2	2--A
P/ASH	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1--A
P/AV	2	0	0	1	2	0	0	1	0	0--A
PFEV	2	2	1	1	1	1	1	1	0--1	0--1--A

8A	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	
CH	3			2	3	A	
P/ASH	2			1	1	A	
P/AV	1--2	0		0	0	A	
PFEV	0	1		1	1	0--1--A	
9A	Día 1	Día 2					
CH	3	3--B					
P/ASH	2	B					
P/AV	2	B					
PFEV	1	1--B					
1B	Día 1	Día 2	Día 3				
CH	2		A				
P/ASH	2		A				
P/AV	1		A				
PFEV	1		A				
2B	Día 1	Día 2	Día 3				
CH	3	2	2--A				
P/ASH	2	1	1--A				
P/AV	3	0	0--A				
PFEV	1--2	1	0--A				
3B	Día 1	Día 2	Día 3				
CH	2	2	A				
P/ASH	1	1	A				
P/AV	1	0	A				
PFEV	0	0	A				
4B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4			
CH	3	0	1	A			
P/ASH	2		1	A			
P/AV		2--3	2	A			
PFEV	1	0	0	A			
5B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
CH	3	3	3	3	3	3	2--A
P/ASH	2	1	3	1	2	1	1--A
P/AV	0	0	0	1	2	0	0--A
PFEV	2	1	1	1	1	0--1	0--A

6B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4				
CH	3	2	3	1--A				
P/ASH	1	1	2	A				
P/AV	1	0	1	0--A				
PFEV	1	1	1	0--A				
7B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4				
CH	3		2	A				
P/ASH	2		1	A				
P/AV	1		1	A				
PFEV	1	0	0	A				
8B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	
CH	2	3	3	3	3	3	B	
P/ASH	1	1	1	2	2	2	B	
P/AV	2		1	2	0	2	B	
PFEV	1	2	0--1	1	5	2	B	
9B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4				
CH	3	3	3	3--B				
P/ASH	2	1	1	2--B				
P/AV	2	1	0	3--B				
PFEV	1	1	0--1	2--B				
10B	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5			
CH	3	3	3	3	A			
P/ASH	2	2	2	2	A			
P/AV	2	2	0	2	2--A			
PFEV	0	0	0--1	1	A			

Días de internación y sobrevivencia de los animales incluidos en el ensayo

MUERE		VIVE	
Animal	Días de internación	Animal	Días de internación
1A	5	2A	3
4A	6	3A	3
5A	5	6A	3
9A	2	7A	11
		8A	6
8B	4	1B	3
9B	7	2B	3
		3B	3
		4B	4
		5B	7
		6B	4
		7B	4
		10B	5