

Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria

**Identificación de genogrupos de protoparvovirus y sus
variantes en leucocitos de gatos domésticos del Valle
Central de Costa Rica**

Modalidad: Tesis de grado

**Trabajo Final de Graduación para optar por el Grado
Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria**

Andrea Obando Corella

Campus Presbítero Benjamín Núñez

2022

TRIBUNAL EXAMINADOR

Laura Bouza Mora, M.Sc.

Vicedecana Facultad de Ciencias de la Salud

Julia Rodríguez Barahona, Ph.D.

Subdirectora de la Escuela de Medicina Veterinaria

Gaby Dolz Wiedner, Ph.D.

Tutora

Ántony Solórzano Morales, M.Sc.

Lector

Carolina Villalobos Zúñiga, Lic.

Lectora

Fecha:

DEDICATORIA

A mi Edu y a mi Luke.

“De todas las realidades que he tenido en la vida,
el hecho de que ya no estés conmigo es la que más me cuesta aceptar,
fuiste la mejor y la peor forma en la que el mundo me mostró que nada es eterno,
sin embargo, amo el tiempo que estuviste a mi lado”

-Friedrich Nietzsche

AGRADECIMIENTOS

A Julia Rojas de Catrux y a la Dr. Alexandra por ayudarme tanto y siempre llamarme cuando tenían campañas de castración, por darme la oportunidad de ayudarles de vez en cuando en su labor tan bonita y desinteresada.

Al Hospital de Especies Menores y Silvestres de la UNA, en especial al Dr. Mauricio Jiménez, por apoyarme con materiales y permitirme recolectar muestras en este espacio.

A la Dra. Perla Fallas y al Dr. Daniel Vargas, que incluso planearon toda una campaña para apoyarme.

A la Dra. Jackeline Rojas por abrirme las puertas de su veterinaria y por compartir su conocimiento sobre sujeción de gatos conmigo.

Al Dr. Julio Murillo y a la Dra. Gloriana Castillo por siempre tener la disposición de ayudarme a conseguir eritrocitos de cerdo.

A la Dra. Gaby Dolz por su tutoría, apoyo y presentarme el mundo de la investigación y laboratorio, que me encanta.

A mis lectores Antony Solórzano y Carolina Villalobos por todos sus consejos, correcciones y guía.

Al Dr. Juan José Romero por ayudarme con la estadística inicial de la investigación.

A Mari y Sergio que siempre estuvieron ahí para ayudarme con mis dudas.

A Adri, por acompañarme a recolectar muestras, siempre sacar tiempo para llevarme de un lado a otro para lograr realizar esta tesis, por interesarse y escucharme hablar y discutir sobre ella por todo este tiempo.

A Gabi y Estefanía que fueron las que me ayudaron con la recolección en las primeras campañas de castración y me apoyaron siempre a realizar esta tesis y a Andre Pérez por ayudarme en el laboratorio.

A Martita por enseñarme la importancia del orden de datos y procedimientos, así como llevar la documentación al día y a Nicole por su sabiduría, donde no importa si en esa oportunidad lo que encontramos es una manera de no hacerlo, lo importante es documentarlo y volverlo a intentar.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

TRIBUNAL EXAMINADOR	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación	4
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos.....	5
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
2.1. Tipo de estudio	6
2.2. Población estudiada	6

2.3. Toma de muestras de sangre y recopilación de información	6
2.4. Inhibición de la hemaglutinación	7
2.5. Análisis molecular	8
2.5.1. Extracción de ADN y PCR	8
2.5.2 Electroforesis.....	10
2.5.3 Secuenciación y análisis filogenéticos	10
2.6. Análisis estadístico	11
3. RESULTADOS.....	12
4. DISCUSIÓN.....	22
5. CONCLUSIONES	28
6. RECOMENDACIONES	29
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
8. ANEXOS.....	40
Anexo 1. Autorización de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica	40
Anexo 2. Consentimiento informado para responsables o propietarios de los felinos muestreados.....	41
Anexo 3. Ficha para recolección de datos de gatos muestreados de la gran área metropolitana.....	44
Anexo 4. Datos y características presentadas de la totalidad de los gatos muestreados en este estudio, priorizando muestras positivas para CVVP-1.	45

Anexo 5. Mapa nucleótidos y aminoácidos CPV-2c y FPV	51
Anexo 6. Alineamiento de aminoácidos de las 10 muestras secuenciadas en este estudio.....	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Características de los 155 gatos del Valle Central de Costa Rica que participaron en el estudio entre mayo y agosto de 2021.	13
Cuadro 2: Título de anticuerpos detectados contra CPPV-1 mediante IHA en sueros de 155 gatos del Valle Central de Costa Rica entre mayo a agosto de 2021.	14
Cuadro 3: Características generales de los 42 gatos del Valle Central de Costa Rica que resultaron positivos en la qPCR entre mayo y agosto de 2021.	16
Cuadro 4: Características de los 10 gatos en los que se logró determinar la presencia del genogrupo de CPPV-1.	18
Cuadro 5: Comparación de aminoácidos relevantes de la proteína parcial VP2 encontrada en la cápside de CPPV-1 en las muestras secuenciadas e identificación de genogrupos y sus variantes.	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución geográfica del origen de las muestras colectadas entre mayo y agosto 2012 de 155 gatos pertenecientes al valle central para el estudio.	12
Figura 2: Prueba del chi cuadrado para las variables títulos contra CPPV-1, edad, convivencia, estilo de vida y sexo, comparando los gatos positivos contra los negativos en la técnica de qPCR.	17
Figura 3: Cladograma de análisis filogenético de 10 secuencias de CPPV-1 aisladas de gatos de Costa Rica (M8, M20, M21, M46, M60, M79, M85, M88, M91, M153), y 7 secuencias de referencia (FPV-b (M38246), CPV-b (M38245), CPV-15 (M24003), CPV-39 (M74849), CPV-677 (AF306445), CPV-637 (AF306450), CPV-695 (AF401519)) por método de máxima verosimilitud.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

CPPV-1: *Protoparvovirus carnívoro 1*

CPV-2: Parvovirus canino 2

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

FPV: Virus de la panleucopenia felina

IHA: Inhibición de la hemaglutinación

Pb: Pares de bases

PBS: Buffer Fosfato Salino

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

SN: Seroneutralización

SRD: Sin raza definida

TBE: Solución tampón Tris-Borato-EDTA

UHA: Unidades hemaglutinantes

RESUMEN

El *protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1), incluye al parvovirus felino (o virus de la panleucopenia felina, FPV) y al parvovirus canino 2 (CPV-2). En la actualidad CPV-2 no se encuentra en la naturaleza, sino sus variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, que pueden infectar también al gato. El objetivo de esta investigación fue identificar genogrupos de CPPV-1 y sus variantes en sangre de felinos domésticos del Valle Central de Costa Rica. Se recolectaron muestras de sangre de 155 gatos, 20 presentados a clínicas veterinarias (12,9%), 120 a campañas de castración (77,4%) y 15 en hogares (9,7%), y se recopilaron los siguientes datos: fecha de recolecta, identificación del animal, sexo, edad, raza, información sobre vacunación, ambiente en el que vive el animal (urbano o rural), si convive con otros gatos, estado de salud, padecimiento de enfermedades crónicas, estilo de vida (gato de interior o exterior) y lugar de procedencia. Las muestras de sangre se analizaron mediante inhibición de la hemaglutinación (IHA) y técnicas moleculares (reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación). Mediante IHA se detectó anticuerpos contra CPPV-1 en todos los gatos, 112 gatos (72,3%) presentaron títulos protectivos ($\geq 1:80$). Solamente 17 animales se reportaron como vacunados. Mediante PCR en tiempo real se detectó la presencia de CPPV-1 en sangre de 42 (27,1%) gatos, ninguno presentó anemia, leucopenia o alguna enfermedad crónica, cinco (11,9%) se encontraban vacunados y tres (7,1%) presentaron una baja condición corporal, pero con apetito, y sin ningún otro síntoma o signo asociado al CPPV-1. El grupo de gatos qPCR positivo no mostró diferencias significativas con el grupo qPCR negativo con respecto a edad, sexo, estilo de vida, convivencia con otros gatos y título de anticuerpos. En diez gatos asintomáticos y saludables se logró detectar la

presencia de FPV (n=2) y CPV-2c (n=8) en sangre, con similitudes nucleotídicas de 100% (GenBank M38246) y 99,8%-100% (GenBank AF401519), respectivamente.

Palabras clave: Parvovirus canino, Virus de la panleucopenia felina, leucocitos, PCR, gato.

ABSTRACT

Carnivore protoparvovirus 1 (CPPV-1) includes feline parvovirus (or feline panleukopenia virus, FPV) and canine parvovirus 2 (CPV-2). Currently, CPV-2 is not found in nature anymore, but its variants CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c can be found infecting cats. The objective of this research was to identify genogroups of CPPV-1 and its variants in the blood of domestic cats from the Central Valley of Costa Rica. Blood samples were collected from 155 cats, 20 presented to veterinary clinics (12,9%), 120 to castration campaigns (77,4%) and 15 in homes (9,7%), and the following data were collected: date of collection, animal identification, sex, age, breed, vaccination information, the environment in which the animal lives (urban or rural), if it lives with other cats, state of health, suffering from chronic diseases, lifestyle (indoor or outdoor cat) and place of origin. Blood samples were analyzed by hemagglutination inhibition (HI) and molecular techniques (polymerase chain reaction (PCR) and sequencing). Antibodies against CPPV-1 were detected by HI in all cats, 112 cats (72,3%) had protective titers ($\geq 1:80$). Only 17 animals were reported as vaccinated. Using real-time PCR, the presence of CPPV-1 was detected in the blood of 42 (27,1%) cats, none of them presented anemia, leukopenia, or any chronic disease, five (11,9%) were vaccinated and three (7,1%) had low body condition, but with appetite, and without any other symptoms or signs associated with CPPV-1. The qPCR-positive group of cats did not show significant differences with the qPCR-negative group concerning age, sex, lifestyle, coexistence with other cats, and antibody titers. In ten asymptomatic and healthy cats, the presence of FPV (n=2) and

CPV-2c (n=8) in blood was detected, with nucleotide similarities of 100% (GenBank M38246) and 99,8%-100% (GenBank AF401519) respectively.

Keywords: Canine parvovirus, feline panleukopenia virus, leukocytes, PCR, cat.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Los virus de la familia *Parvoviridae* se caracterizan por ser pequeños (aprox. 25 nm), desnudos y sumamente resistentes en el medio ambiente. Poseen un genoma de ADN lineal de cadena sencilla y de 4 a 6 Kpb de tamaño (Parrish 1999, Haynes y Holloway 2012). Se dividen en dos subfamilias, *Parvovirinae* y *Densovirinae*, que se diferencian esencialmente por infectar vertebrados e invertebrados, respectivamente. Necesitan de la división activa de las células del huésped para poder replicarse ocasionando desde enfermedades subclínicas hasta letales (Zell et al. 2017).

El *protoparvovirus carnívoro 1* (CPPV-1) pertenece al orden Piccovirales, familia *Parvoviridae*, subfamilia *Parvovirinae*, género *Protoparvovirus*, e incluye al parvovirus felino (o virus de la panleucopenia felina, FPV) y al parvovirus canino 2 (CPV-2, junto a sus variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c). El CPV-2 emergió del FPV en 1978, mostrando una homología del 98 % con FPV y afectando a todos los perros (Battilani et al. 2006; Hoelzer et al. 2008). Actualmente se consideran como una sola entidad taxonómica (Tattersall 2006), y son patógenos importantes de gatos y perros domésticos, pero también de carnívoros de vida silvestre. En este grupo también se encuentran el virus de la enteritis del visón (MEV), el parvovirus del mapache (RPV), el parvovirus del perro mapache (RDPV) y el parvovirus del zorro azul (BFPV) (Steinel et al. 2000).

Actualmente el CPV-2 no se encuentra en la naturaleza, sino las variantes CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c, que pueden infectar también al gato; sin embargo, FPV parece ser la

principal especie de parvovirus infectando a los gatos domésticos (Decaro et al. 2008; Battilani et al. 2011; Balboni et al. 2018). El FPV ocasiona panleucopenia (disminución de todos los linajes de leucocitos circulantes en sangre) y enteritis (por replicación en enterocitos en las criptas intestinales) (Steinel et al. 2001; Stuetzer y Hartmann 2014) con los siguientes signos clínicos: anorexia, vómitos y diarrea. La infección en el tiempo del parto provoca hipoplasia cerebelar. Dependiendo de la gravedad de los signos clínicos, la mortalidad puede variar entre 25 y 100% (Stuetzer y Hartmann 2014). Aunque el FPV afecta sistémicamente a los felinos, también puede infectar a los caninos, pero en éstos solo se replica a un nivel bajo en tejidos linfoides, sin afectar el intestino y no se elimina en heces ni induce ningún signo clínico (Truyen y Parrish 1992).

El diagnóstico de FPV se realiza mediante técnicas indirectas (diagnóstico de anticuerpos) y técnicas directas (diagnóstico de antígeno o ADN). La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) mide el título de anticuerpos contra CPPV-1, proporcionando información sobre la protección de los animales con respecto al virus, pero no distingue entre anticuerpos vacunales o anticuerpos debidos a infección. Un título mayor o igual a 1:80 se considera protectorio (Truyen et al. 2009). Para el diagnóstico de antígeno en heces se pueden utilizar pruebas rápidas para el diagnóstico de CPV-2 en perros, ya que detectan tanto el FPV como CPV-2 en gatos, siendo las más sensibles y específicas Witness Parvo, Snap Parvo y Speed Parvo (Neuerer et al. 2008). Finalmente se han desarrollado técnicas moleculares (PCR punto final [PCR] y PCR en tiempo real [qPCR]) que detectan ADN en sangre entera o heces, y con los que es posible determinar el genogrupo infectante.

Los gatos infectados excretan el agente en grandes cantidades con las heces; sin embargo, desarrollan también anticuerpos, capaces de neutralizar el virus en estas y en sangre (Greene y Sykes 2011; Stuetzer y Hartmann 2014). Estudios han detectado la presencia de parvovirus en heces hasta seis semanas después de la recuperación mediante el uso de técnicas moleculares (Decaro y Buonavoglia 2017; Balboni et al. 2018). En un estudio realizado en Australia, se determinó mediante PCR la presencia de FPV y CPV-2 en médula ósea de ocho gatos adultos saludables (uno con FPV y siete con CPV-2) (Haynes y Holloway 2012). Asimismo, en el norte de Vietnam se determinó mediante cultivo celular la presencia de FPV en células mononucleares sanguíneas periféricas de 15 gatos, aún en presencia de anticuerpos neutralizantes (Ikeda et al. 2000). Estos hallazgos hacen concluir, que FPV y CPV-2 son capaces de mantenerse en los gatos después de la infección por períodos prolongados y de manera asintomática (Miyazawa et al. 1999; Ikeda et al. 2000; Balboni et al. 2018).

Otros estudios de seropositividad de FPV conducidos en poblaciones felinas en Estados Unidos, determinaron en Colorado un 68,5% (n=276) de gatos positivos, utilizando IHA (Lappin et al. 2002), y un 39,8% (n=347) en un refugio de Florida utilizando IHA y seroneutralización (SN) (DiGangi et al. 2012). En el sur de Alemania se estableció una seropositividad de 71% (n=350) usando una técnica inmunoenzimática (ELISA de bloqueo específico) (Mende et al. 2014), mientras que en el noroeste de Francia se estableció una positividad de 25% (n=469) utilizando IHA (Hellard et al. 2011). Finalmente, Vietnam y Taiwán reportan sobre todo la presencia de CPV-2 en gatos sin vacunar, tanto silvestres como domésticos (n=18, CPV-2a: 35,3%, CPV-2b: 29,4%, CPV-2c: 17,6%) determinado mediante IHA y secuenciación de ADN (Ikeda et al. 2000).

En un estudio realizado hace aproximadamente 13 años en Costa Rica, se determinó una seropositividad para FPV de 92,8 % (n= 96) en los gatos del Valle Central y un 100% (n=93) en gatos silvestres, usando IHA, concluyendo, que el alto número de seropositivos se debía probablemente a una alta contaminación ambiental debido a las altas tasas de infección o vacunación de perros (Blanco et al. 2009); sin embargo, no se determinó el o los protoparvovirus presentes en la población felina costarricense.

1.2 Justificación

Aunque ya se cuenta con un estudio de seropositividad de FPV en el país, hasta la fecha, no se han determinado las variantes de protoparvovirus presentes en gatos domésticos de Costa Rica. En el estudio de Blanco y colaboradores (2009) los resultados sugirieron una exposición natural y a temprana edad de los gatos al FPV, lo que podría deberse a la relativa estabilidad y resistencia del virus en el medio ambiente y a una alta presencia del agente en la población de gatos (92,8%), especialmente tomando en cuenta, que solo el 17,8% de los gatos seropositivos habían sido reportados como previamente vacunados. Otra posible razón que se discutió en ese trabajo fue la posibilidad, de que los gatos podrían estar teniendo contacto y exposición natural a CPV-2, una infección muy común en ese entonces en Costa Rica, y como este agente comparte varios antígenos con FPV, podrían estar ocurriendo reacciones cruzadas en las pruebas serológicas. Basados en las conclusiones de esa investigación es que el presente trabajo propuso actualizar los datos de CPPV-1 en felinos domésticos del Valle Central, establecer la presencia de protoparvovirus en células mononucleares de gatos seropositivos y caracterizar las variantes presentes en la sangre de los gatos, lo cual ayudaría a establecer el papel epidemiológico de los gatos en las infecciones con CPPV-

1. Además, aportaría a determinar si CPV-2 y sus variantes afectan de la misma manera que el FPV a los gatos, o si todas o algunas de sus variantes se presentan de manera asintomática en los gatos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar genogrupos de CPPV-1 y sus variantes en sangre de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica.

1.3.2 Objetivos específicos

1.3.2.1 Detectar la presencia de CPPV-1 en sangre de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica mediante IHA y PCR.

1.3.2.2 Identificar cuáles genogrupos y variantes se encuentran en los leucocitos de gatos seropositivos en el Valle Central de Costa Rica mediante técnicas moleculares.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y por conveniencia, con la finalidad de determinar la presencia e identificar el CPPV-1 (FPV, CPV-2 y sus variantes) en leucocitos de gatos del Valle Central de Costa Rica. Se contó con la autorización de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica (Anexo 1). A los propietarios de los gatos que participaron en el proyecto se les informó sobre la investigación y se les solicitó su consentimiento (Anexo 2).

2.2. Población estudiada

Entre mayo y agosto de 2021 se recolectaron muestras de sangre de un total de 155 gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica, este número se determinó con WinEpi para detectar la presencia de CPPV-1 en muestras de sangre, con un 95 % de confianza y una prevalencia mínima esperada del 2%, y se basó en la suposición, de que el número total de gatos en la gran área metropolitana de Costa Rica es proporcional al 5% de la población humana de esa zona.

2.3. Toma de muestras de sangre y recopilación de información

De cada gato se tomó una muestra sanguínea de la vena yugular, femoral o cefálica; 2mL se depositaron en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 1mL en un tubo sin anticoagulante. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su transporte al laboratorio de Medicina Poblacional y Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria

Universidad Nacional, donde se separó la capa leucocitaria de la muestra de sangre con EDTA y el suero de las muestras de sangre sin anticoagulante mediante centrifugación (3000g por diez minutos), seguidamente se congelaron a -20°C hasta ser sometidas a análisis molecular o serológico, respectivamente.

Durante la toma de la muestra sanguínea se recopilaban los siguientes datos de los animales mediante un cuestionario: fecha de recolecta de la muestra, identificación del animal, sexo, edad, raza, información sobre vacunación, ambiente en el que vive el animal (urbano o rural), si convive con otros gatos, estado de salud, padecimiento de enfermedades crónicas, estilo de vida (gato de interior o exterior) y lugar de procedencia (Anexo 3).

2.4. Inhibición de la hemaglutinación

El título de anticuerpos contra parvovirus se determinó en los sueros felinos utilizando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) descrita por Blanco y colaboradores (2009). Se utilizó como antígeno viral la vacuna contra parvovirus canino Vanguard®, luego de su inactivación a 56°C por 30 minutos. Los sueros igualmente se inactivaron a 56°C por 30 minutos en baño maría, se realizaron diluciones 1/10 de los mismos con PBS (500uL en total), y se absorbieron por cuatro horas a temperatura ambiente con 50uL eritrocitos de cerdo, (1% en PBS y suero fetal bovino). Seguidamente, con la ayuda de una micropipeta multicanal se colocaron 50uL de diluyente (PBS) en todos los pozos de una placa de microtítulo con fondo en V, menos en los pozos A1-F1. Se colocaron 100uL de cada suero (iniciando con la dilución 1:10) en los pocillos A1-F1. Con la pipeta multicanal se diluyeron los sueros en base de dos, pasando 50 uL al pocillo siguiente,

mezclando al menos en diez ocasiones y repitiendo el proceso sucesivamente hasta llegar a la posición 12 (dilución 1:20512). Luego se colocaron 50uL del antígeno viral (8 UHA) a todos los pozos con los sueros a analizar, y se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Seguidamente se tomó una suspensión de eritrocitos en PBS al 1% y se colocaron 50 uL en cada uno de los pocillos. En cada placa se incluyó un control de eritrocitos y un control de virus. Se procedió a agitar suavemente la placa para mezclar bien, se tapó e incubó nuevamente por 40-50 minutos a 4°C. Por último, se procedió a leer los resultados colocando la placa en un ángulo de inclinación de 45 grados, observando la formación de las “lengüetas” para las muestras con IHA y registrando los títulos de los sueros. El título se determinó hasta la dilución en la que se observaron las “lengüetas”.

2.5. Análisis molecular

2.5.1. Extracción de ADN y PCR

La extracción de ADN de la capa leucocitaria de las muestras de sangre completa se realizó con el kit DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania), como recomienda el fabricante. Luego se analizaron las muestras mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) siguiendo el protocolo de Balboni et al. (2018). Se utilizaron los iniciadores, A-for (5'-AGCTACTATTATGAGACC AGCTGAG-3') y B-rev (5'-CCTGCTGCAATAGGTGTTTTAA-3'), direccionados a amplificar un fragmento de 99 pb del gen VP2. El volumen de la reacción (20 µL) incluyó 10 µL de EvaGreen Super Mix 2X (Bio-Rad Laboratories), cada iniciador a una concentración final de 400 nM, 5 µL del extracto de ADN y 4 µL de agua grado molecular (Thermo Scientific). Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización

inicial de tres minutos a una temperatura de 95°C, seguido de 40 ciclos de desnaturalización de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C, y finalmente un ciclo de fusión, donde la temperatura se incrementó por 1°C de 65°C a 95°C. Como control positivo se utilizó el extracto de las vacunas Felocell® y Vanguard®, y como control negativo agua grado molecular. Todas las muestras amplificando el segmento esperado y con una curva de crecimiento superando el umbral (calculado automáticamente) entre los primeros 35 ciclos se consideraron positivas.

Las muestras que resultaron positivas en la qPCR se sometieron a una PCR anidada, según el protocolo descrito por Balboni et al. (2018) dirigido al gen de la proteína VP2 para diferenciar entre las variantes del CVVP-1, mediante los residuos de aminoácidos críticos 297, 300, 305, 323 y 426. En la primera ronda se utilizaron los iniciadores C-for (5'-CCATTTCTAAATTCTTTG-3'), D-rev (5'-TTTCTAGGTGCTAGTTG AG-3') y en la segunda ronda C-for (5'-CCATTTCTAAATTCTTTG-3'), E-rev (5'-AAG TCAGTATCAAATTCTT-3'), los cuales amplifican segmentos de 881 pb y 569 pb, respectivamente. Para ambas rondas el volumen de la reacción (12,5 µL) incluyó 2,5 µL de extracto de ADN, 6,25 µL DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (ThermoScientific, USA), 0,5 µL (10 µM) de cada iniciador y 2,75 µL de agua libre de nucleasas (ThermoScientific, USA). El protocolo del ciclo de temperatura de la primera amplificación consistió en desnaturalización inicial a 95°C durante cinco minutos, 40 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), alineación (48°C por 45 segundos) y extensión (72°C por un minuto), seguido de una extensión final (72°C por cinco minutos). En la segunda amplificación, la desnaturalización inicial radicó en 95°C por cinco minutos, 40 ciclos de desnaturalización (95°C por 30 segundos), alineación (49°C por 45 segundos), y

extensión (72°C por 45 segundos), seguido de una extensión final (72°C por cinco minutos).

2.5.2 Electroforesis

Se realizó la electroforesis de todos los productos de la PCR anidada, segunda ronda, en geles de agarosa al 1%, utilizando GelRed (Biotium®) para teñir 3 µL del producto de PCR y 1 µL del marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 100pb Plus DNA Ladder (Sm0321). Se corrió en una cámara de electroforesis a 100 voltios durante 40 minutos. Las muestras que presentaron bandas con el peso molecular esperado de 569 pb fueron consideradas positivas.

2.5.3 Secuenciación y análisis filogenéticos

Todas las muestras que resultaron positivas en la segunda ronda de la PCR anidada y con el peso molecular esperado se enviaron para ser purificadas y secuenciadas por la empresa Macrogen en Seoul, Corea del Sur. Las secuencias parciales obtenidas, se editaron y alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall 1999), y se compararon mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con las secuencias disponibles en la base de datos de GenBank. Posteriormente se importaron en MEGA 10 (Kumar et al. 2018), utilizando el algoritmo de Jukes y Cantor (1969) y el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei 1987) para el diseño del cladograma filogenético sobre el cálculo de diez mil réplicas (Felsenstein 1985). Las secuencias de cepas de referencia fueron incluidas en el análisis de filogenia.

2.6. Análisis estadístico

De la información recopilada de cada felino en el cuestionario se elaboró una base de datos, incluyendo los resultados de la IHA, el qPCR y PCR convencional. Se aplicó estadística descriptiva para caracterizar las muestras positivas, y prueba del chi cuadrado para establecer diferencias significativas entre grupo de gatos positivos y negativos en qPCR con respecto a las variables recopiladas (sexo, edad, raza, vacunación, ambiente en el que vive el animal, si convive con otros gatos, estado de salud, padecimiento de enfermedades crónicas, estilo de vida y lugar de procedencia).

3. RESULTADOS

Del total de 155 muestras analizadas, 130 (84%) provenían de San José, 19 (12%) de Cartago, tres (2%) de Alajuela y tres (2%) de Heredia (Figura 1).



Figura 1.

Distribución geográfica del origen de las muestras colectadas entre mayo y agosto 2021 de 155 gatos pertenecientes al valle central para el estudio.

Las muestras provinieron de gatos presentados en clínicas veterinarias (20), en campañas de castraciones (120) y de gatos viviendo en hogares (15), cuyos dueños desearon participar voluntariamente con la investigación. La mayoría de gatos analizados tenían edades entre uno a cinco años (68%), eran sin raza definida (97%), hembras (70%), no vacunados (89%), conviviendo con otros gatos (68%) de zonas urbanas (98%), y con posibilidad de salir de la casa (66%) (Cuadro 1).

Cuadro 1.

Características de los 155 gatos del Valle Central de Costa Rica que participaron en el estudio entre mayo y agosto de 2021.

Variable	Categoría	Gatos (n=155)	%
Edad	<6m	12	8
	6-11m	29	18
	1-5a	105	68
	>5a	9	6
Raza	Sin Raza Definida	151	97
	De Raza	4	3
Sexo	Macho	46	30
	Hembra	109	70
Vacunas	Vacunado	17	11
	No Vacunado	138	89
Castración	Castrado	151	97
	No Castrado	4	3
Enfermedades Crónicas	Presente	7	5
	No presente	148	95
Estilo de Vida	Interior	52	34
	Exterior	103	66
Estado	Saludable	129	83
	No Saludable	26	17
Ambiente	Urbano	152	98
	Rural	3	2
Convivencia	Solo	49	32
	Con otros gatos	106	68
Anemia	Presente	3	2
	No presente	152	98
Leucopenia	Presente	3	2
	No presente	152	98
Procedencia	San José	130	84
	Alajuela	3	2
	Cartago	19	12
	Heredia	3	2

En el Anexo 4 se muestran todas las características individuales de los gatos analizados.

Mediante IHA se detectaron anticuerpos contra CPPV-1 en todos los gatos, 112 gatos (72,3%) presentaron títulos $\geq 1:80$ (Cuadro 2).

Cuadro 2.

Título de anticuerpos detectados contra CPPV-1 mediante IHA en sueros de 155 gatos del Valle Central de Costa Rica entre mayo a agosto de 2021.

Título	Gatos (n=155)	%
<1:80	43	28
$\geq 1:80$ -1:320	93	60
>1:320 -1:640	16	10
>1:640 - 1: 2560	3	2
TOTAL	155	100

Del total de 43 gatos que presentaron títulos menores a 1:80, la mayoría no se encontraban vacunados (97,7%), contaban con buena salud (83,7%), y convivían con otros gatos (65,1%). De éstos, 20 (46,5%) no tenían acceso al exterior, pero 13 de estos (30,2%) convivían con otros gatos. Tres gatas (2,0%) presentaron altos títulos con respecto a los demás, una de ellas con 1:2560 y dos con 1:1280, mientras que en los gatos vacunados se determinó que 16/17 (94,1%) mostraron títulos $\geq 1:80$ (12 animales con títulos entre 1:80-1:320, dos con títulos $>1:320$ -1:640 y otros dos animales con títulos entre $>1:640$ -1:2560). Solamente un animal mostró título menor de 1:80 (Anexo 4).

Mediante qPCR se detectó la presencia de CPPV-1 en sangre de 42 (27,1%) gatos, 34 (81%) presentaron títulos de anticuerpos igual o mayores a 1:80, la mayoría viviendo en áreas urbanas (97,6%), conviviendo con otros gatos en su vida diaria (69,0%), con acceso al exterior de su casa (59,5%), y en el rango etario de uno a cinco años (64,3%).

Ninguno de los gatos positivos presentó enfermedad crónica, anemia o leucopenia, cinco (11,9%) se encontraban vacunados y tres (7,1%) presentaron una baja condición corporal, pero con apetito, y sin ningún otro síntoma o signo asociado al CPPV-1 (Cuadro 3).

Cuadro 3.

Características generales de los 42 gatos del Valle Central de Costa Rica que resultaron positivos en la qPCR entre mayo y agosto de 2021.

Variable	Categoría	N° Gatos positivos (n=42)	%
Edad	<6m	4	9,5
	6-11m	10	23,8
	1-5a	27	64,3
	>5a	1	2,4
Raza	Sin Raza Definida	41	97,6
	De Raza	1	2,4
Sexo	Macho	12	28,6
	Hembra	30	71,4
Vacunas	Vacunado	5	11,9
	No Vacunado	37	88,1
Castración	Castrado	42	100
	No Castrado	0	0
Enfermedades Crónicas	Presente	0	0
	No presente	42	100
Estilo de Vida	Interior	17	40,5
	Exterior	25	59,5
Estado	Saludable	39	92,9
	No Saludable	3	7,1
Ambiente	Urbano	41	97,6
	Rural	1	2,4
Convivencia	Solo	13	31
	Con otros gatos	29	69
Anemia	Presente	0	0
	No presente	42	100
Leucopenia	Presente	0	0
	No presente	42	100
Títulos de anticuerpos	<1:80	8	19
	≥1:80 -1:320	20	47,7
	>1:320 -1:640	11	26,2
	>1:640 - 1: 2560	3	7,1

En la Figura 2 se muestran los resultados de la prueba de chi cuadrado entre el grupo de gatos qPCR positivos y negativos.

Prueba Chi Cuadrado

Nivel de confianza % : 95%

Grados de libertad (gl) : 1

		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Títulos	menor 80	8	35	43
	mayor o igual 80	34	78	112
	Total	42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (X^2): 2.172

Significación (p) : **0.1405**

		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Estilo de vida	Interior	17	35	52
	Exterior	25	78	103
	Total	42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (X^2): 1.240

Significación (p) : **0.2654**

		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Edad	Adultos	28	86	114
	Cachorros	14	27	41
	Total	42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (X^2): 1.402

Significación (p) : **0.2363**

		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Sexo	Hembra	30	79	109
	Macho	12	34	46
	Total	42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (X^2): 0.034

Significación (p) : **0.8542**

		qPCR		
		Positivos	Negativos	Total
Convivencia	Solos	13	36	49
	Con otros gatos	29	77	106
	Total	42	113	155

Estadístico Chi-cuadrado (X^2): 0.012

Significación (p) : **0.9141**

Figura 2.

Prueba del chi cuadrado para las variables títulos de anticuerpos contra CPPV-1, edad, convivencia, estilo de vida y sexo, comparando los gatos positivos contra los negativos en la técnica de qPCR.

No se encontró diferencias significativas entre gatos qPCR positivos y gatos qPCR negativos con respecto a títulos de anticuerpos contra CPPV-1, edad, convivencia, estilo de vida y sexo.

Solamente diez (23,8%) del total de 42 muestras positivas en qPCR se lograron amplificar en PCR convencional, purificar y secuenciar. Los genogrupos determinados fueron FPV en dos casos, con una similitud nucleotídica de 100% (532pb/532pb) con la secuencia M38246 depositada en GenBank, y que fue aislada de un gato con sintomatología en Estados Unidos y CPV-2, variante 2c en ocho casos. Seis muestras mostraron similitud nucleotídica del 100% (532pb/532pb) con la secuencia AF401519 de CPV-2c, aislada de heces de un perro con sintomatología en Estados Unidos, mientras que dos muestras presentaron una similitud del 99,8%, mostrando un cambio de nucleótido, una guanina en la posición 393 en lugar de una adenina (muestra M46) y una adenina en vez de una guanina en la posición 408 (muestra M91). En el Cuadro 4 se presentan las características de estos animales, ninguno contaba con vacunas, la mayoría (80%) tenían acceso al exterior y convivían con otros gatos.

Cuadro 4. Características de los 10 gatos en los que se logró determinar la presencia del genogrupo de CPPV-1.

ID	Edad	Sexo	Acceso al exterior	Acceso a otros gatos	Vacunado	Título IHA	Genogrupo	Similitud nucleotídica (%)	Saludable
M8	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:320	CPV-2c	100	Sí
M20	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	100	Sí
M21	1-5a	M	Sí	Sí	No	1:320	CPV-2c	100	Sí
M46	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	99.8	Sí
M60	<6m	H	No	No	No	1:640	FPV	100	Sí
M79	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:160	CPV-2c	100	Sí
M85	1-5a	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	100	Sí
M88	6-11m	H	Sí	Sí	No	1:160	CPV-2c	100	Sí
M91	6-11m	H	Sí	Sí	No	1:640	CPV-2c	99.8	Sí
M153	<6m	H	No	No	No	1:640	FPV	100	Sí

NOTA H= Hembra, M= Macho

En el Cuadro 5 se muestran las posiciones más importantes en la identificación de genotipos del CPPV-1, comparando los aminoácidos que corresponden a las secuencias de referencia con los obtenidos de las muestras secuenciadas en esta investigación.

Cuadro 5.

Comparación de aminoácidos relevantes de la proteína parcial VP2 encontrada en la cápside de CPPV-1 en las muestras secuenciadas e identificación de genogrupos y sus variantes.

Muestra	297	300	305	323	375	426	Tipo
FPV ^a	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	
CPV-2 ^b	•	•	•	Asn	Asn	•	
CPV-2a ^c	•	Gly	Tyr	Asn	•	•	
CPV-2b ^d	•	Gly	Tyr	Asn	•	Asp	
CPV-2a ^e	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	•	
CPV-2b ^f	•	Gly	Tyr	Asn	•	Asp	
CPV-2c ^g	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	
M8	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M20	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M21	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M46	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M60	•	•	•	•	•	•	FPV
M79	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M85	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M88	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M91	Ala	Gly	Tyr	Asn	•	Glu	CPV-2c
M153	•	•	•	•	•	•	FPV

NOTA Los aminoácidos específicos del huésped que diferencian FPV y CPV están resaltados con gris. Las secuencias de aminoácidos deducidas del gen VP2 se obtuvieron de GenBank, específicamente: ^aPrototipo FPV: cepa FPV-b (M38246), ^bPrototipo CPV tipo 2: cepa CPV-b (M38245), ^cPrototipo CPV tipo 2a: cepa CPV-15 (M24003), ^dPrototipo CPV tipo 2b: cepa CPV-39 (M74849), ^eCepa de referencia CPV tipo 2a: CPV-677 (AF306445), ^fCepa de referencia CPV tipo 2b: CPV-637 (AF306450), ^gCepa de referencia CPV tipo 2c: CPV-695 (AF401519).

En el Anexo 5 se muestran los mapas de nucleótidos y aminoácidos tanto de FPV como de CPV-2c y en el Anexo 6 se presenta el alineamiento completo de los aminoácidos correspondientes a las diez diferentes muestras secuenciadas en este estudio.

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas de los diez gatos se muestra en la Figura 3.

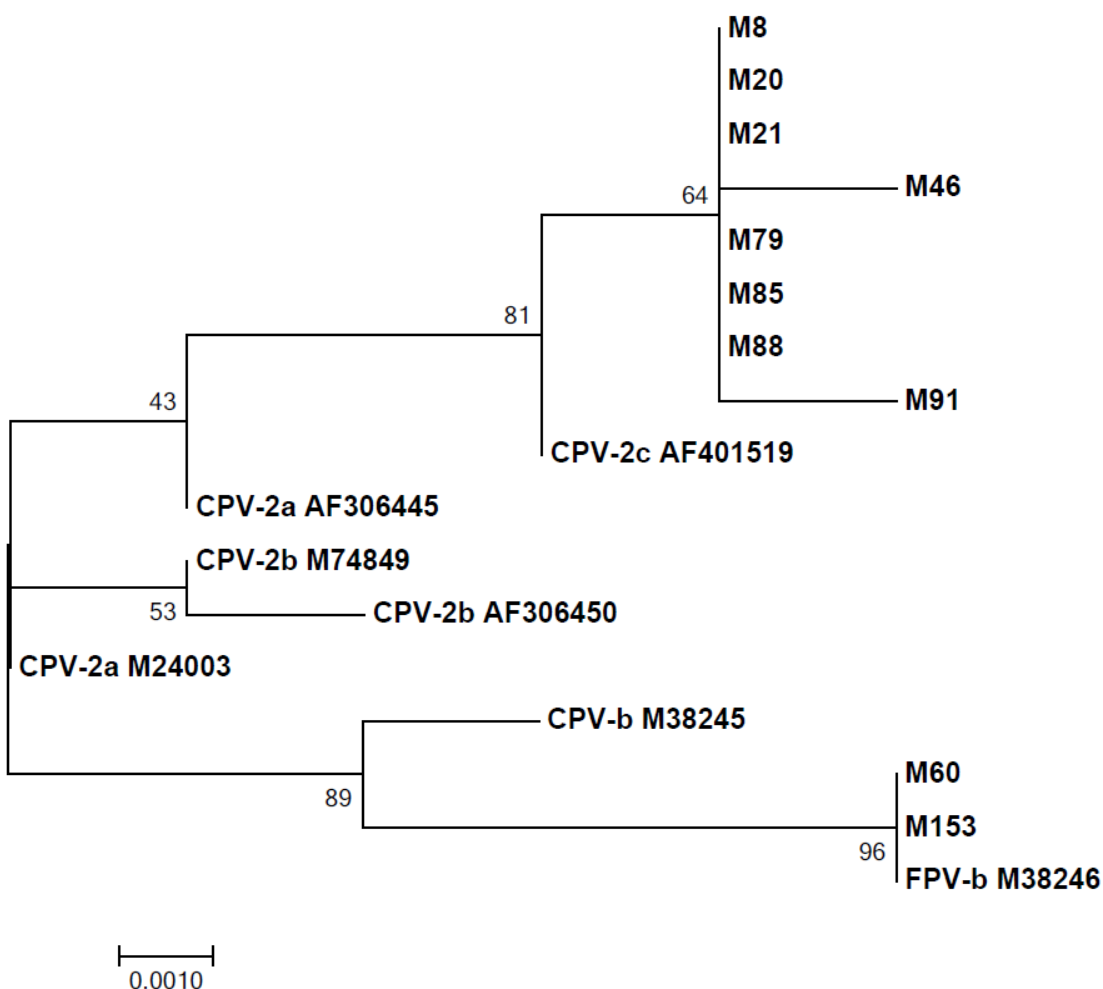


Figura 3.

Cladograma de análisis filogenético de 10 secuencias de CPPV-1 aisladas de gatos de Costa Rica (M8, M20, M21, M46, M60, M79, M85, M88, M91, M153), y 7 secuencias de referencia (FPV-b (M38246), CPV-b (M38245), CPV-15 (M24003), CPV-39 (M74849), CPV-677 (AF306445), CPV-637 (AF306450), CPV-695 (AF401519)) por método de máxima verosimilitud, se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes, finalmente se trabajó con 532 posiciones.

4. DISCUSIÓN

Todos los animales analizados presentaron anticuerpos contra CPPV-1, lo que concuerda con el estudio de Blanco y colaboradores (2009) que encontró una seroprevalencia de FPV de 92,8% en la población de gatos de la Gran Área Metropolitana del país, pero no con los resultados obtenidos en Colorado, Estados Unidos (68,5%) (Lappin et al. 2002) y el sur de Alemania (71%) (Mende et al. 2014). La alta presencia de CPPV-1 determinada en la población de gatos muestreada se puede deber a la alta resistencia del agente en el medio ambiente (hasta dos años) y en superficies, lo que ocasiona, que los animales se infecten en forma indirecta en algún momento de su vida (Poole 1972; Neuerer et al. 2008; Mauro 2015), así como también, que la mayoría de las muestras pertenecían a una población de recursos limitados, lo cual ya se ha correlacionado con la presencia del virus (Orozco et al. 2021).

La mayoría de los gatos analizados en el presente trabajo fueron animales adultos (74%) y mostraron un estilo de vida de exterior (66%), que se consideran factores de riesgo para la transmisión de enfermedades infecciosas en gatos (Blanco et al. 2009; Gleich et al. 2009; Murray et al. 2009; Hellard et al. 2011), así como Balboni y colaboradores (2018) detectaron CPPV-1 en el 67% de gatos que tenían acceso al exterior. Sin embargo, en el presente trabajo no se pudo encontrar una asociación significativa entre gatos positivos a qPCR y acceso al exterior.

La mayoría de los animales analizados fueron hembras (70%), esto puede haberse debido a que la mayoría de muestras se tomaron durante campañas de castración (77,4%) y posiblemente los propietarios suelen castrar más a la hembras que a los machos, simplemente por el hecho de ser las que se deben responsabilizar de las crías

o por la lamentable cultura que todavía reside en nuestro país de no afectar “la virilidad” de los animales machos. Con respecto a esto, es de suma importancia educar a los propietarios de gatos de castrar tanto a hembras como a machos, ya que es una medida eficaz y ética para controlar las poblaciones de gatos en las diferentes zonas y no fomentar el abandono de los animales una vez que nacen y no se cuenta con los recursos para darles calidad de vida (Navarro y Oliva 2010).

Solamente en un 72,3% de los animales se encontraron títulos protectivos, mientras que en el estudio de Blanco y colaboradores (2009) todos los gatos seropositivos mostraron títulos protectivos. Esto podría deberse al cambio y educación del propietario actual, que, aunque todavía refleja mucho que mejorar, ha ido entendiendo la importancia de mantener a los gatos dentro de sus propiedades y es más consciente, poco a poco la tenencia de mascotas va mejorando en nuestro país, en términos de responsabilidad, alimentación, cuidados veterinarios y buen ambiente (World Animal Protection 2016).

Del total de los 155 gatos analizados solamente 17 animales se encontraban vacunados, de los cuales 16 mostraron títulos protectivos (1:80-1:1280). Sin embargo, la gran mayoría de gatos en edad adulta (94,3%) no se encontraban vacunados, lo que es sumamente preocupante, sobre todo, porque la vacuna contra FPV se ofrece en el mercado como vacuna triple, incluyendo otros agentes de importancia para los felinos como Calicivirus felino y Herpesvirus felino, los cuales son agentes muy comunes y extremadamente contagiosos (Dawson et al. 2001). Tampoco estarían vacunando contra el virus de la leucemia felina, que llega a causar neoplasias, siendo considerada una de las infecciones de mayor impacto en la salud de los gatos domésticos (Restrepo et al. 2013) y finalmente el virus de la Rabia, una zoonosis de importancia que afecta el sistema

nervioso de manera invariablemente fatal (Castro et al. 2016). Solamente en un caso se determinó un título bajo en un gato vacunado de un año, esto podría haberse debido a una interferencia de los anticuerpos maternos con la vacuna (Truyen et al. 2009).

La detección de ADN de CPPV-1 en sangre de un 27% de gatos, confirma lo reportado por Balboni et al. (2018) e Ikeda et al. (2000), que también encontraron el agente en 16,7% y 66,7% de sus gatos muestreados de Italia y Vietnam-Taiwán respectivamente.

Se conoce que felinos infectados experimentalmente con FPV eliminan el virus en orina y heces hasta el día 41 o 42 después de la infección, el cual persiste en los pulmones y los riñones durante más de 50 semanas en los gatos que se han recuperado (Balboni et al. 2018). En el caso de las variantes de CVP-2, por los resultados obtenidos por Miyazawa et al. (1999), Ikeda et al. (2000), Balboni et al. (2018), donde se logró detectar la presencia de CPPV-1 en células mononucleares de gatos recuperados y sanos, aún en presencia de anticuerpos neutralizantes, sugiere que CPPV-1 podría ocasionar infecciones persistentes en los animales (Ikeda et al. 2002; Balboni et al. 2018). Los mecanismos que utiliza el agente para ocasionar estas infecciones persistentes se desconocen; sin embargo, se cree que las células mononucleares de la sangre periférica de gatos infectados persistentemente funcionan como reservorio del virus (Ikeda et al. 2002). Esto es importante tomar en cuenta, al momento de realizar transfusiones sanguíneas entre gatos, ya que los pacientes que requerirán la sangre podrían encontrarse con la salud y el sistema inmune comprometido (Pennisi et al. 2015). Sin embargo, se desconoce a la fecha, si el animal que recibirá células mononucleares infectadas se infectará y enfermará, lo que aún debe de investigarse.

El grupo de gatos qPCR positivo no mostró diferencias significativas con el grupo qPCR negativo con respecto a edad, sexo, estilo de vida, convivencia con otros gatos y título de anticuerpos, por lo que no podemos afirmar que estas variables cualitativas y su resultado en la qPCR estén significativamente asociados, concordando con estudios anteriores (Ikeda et al. 2002; Balboni et al. 2018); sin embargo, se requiere de más estudios con una población más amplia para poder establecer si existe o no asociación.

En ocho (19%) de los gatos que resultaron positivos en qPCR, se establecieron títulos de anticuerpos menores a 1:80, lo cual podría deberse a que los gatos se encontraban en una fase inicial (aguda) de la infección. Se ha determinado, que los anticuerpos generalmente aparecen entre la primera a segunda semana de la infección, sin embargo, se ha reportado la aparición de anticuerpos tan temprano como tres a cinco días post infección, (Haynes y Holloway 2012; Moredo et al. 2018). De los animales qPCR positivos, cinco (11,9%) tenían historial de vacunación; sin embargo, es imposible establecer, si el ADN encontrado en los gatos era de la vacuna, de una infección previa o después de la vacunación. Estudios han demostrado que el virus vacunal (CPPV-1) se replica en sangre y mucosa intestinal, y que los animales liberan el virus por algunos días en sus heces, sufriendo una infección leve o asintomática (Bergmann 2019), pero se desconoce hasta la fecha, si las vacunas producen persistencia o pueden evitar una infección persistente en los animales.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo también parecen indicar, que el título de anticuerpos del animal no se relaciona con la persistencia del virus en la sangre, ya que se determinaron gatos con títulos de anticuerpos tanto altos como bajos, infectados persistentemente con CPV y FPV, por lo que se recomienda analizar en futuros estudios

factores que pueden ocasionar la persistencia del virus en los gatos (Ikeda et al. 2002; Balboni et al. 2018).

Los resultados de nuestra revisión bibliográfica nos indican que esta podría ser la primera vez que se determina por secuenciación de ADN la presencia de FPV y CPV-2c en gatos domésticos en el país y en Centroamérica. Los dos gatos con FPV fueron hembras, con menos de seis meses de edad, saludables, y con un estilo de vida de interior, sin convivir con otros gatos, y presentaron títulos de anticuerpos protectivos. La infección de estos dos animales parece haber ocurrido a muy temprana edad, por transmisión de sus madres, antes de llegar a vivir con sus propietarios, o por contaminación de fómites que ingresaron al hogar (Truyen et al. 2009, Hellard et al. 2011), mientras que los ocho gatos CPV-2c positivos, en contraste, fueron adultos (entre seis meses a cinco años), con un estilo de vida de exterior, y que convivían con otros gatos. Se recomienda investigar con una población más amplia y representativa, factores que aumentan el riesgo de infección y propagación del virus (Blanco et al. 2009, Gleich et al. 2009, Murray et al. 2009, Hellard et al. 2011).

El CVP-2c, fue la variante predominante en el presente trabajo, sin embargo, por ser este un estudio no sistemático no se puede descartar la presencia de las otras variantes en la población de gatos de nuestro país. Los resultados, sin embargo, coinciden con los presentados por Orozco et al. (2021), en donde se reportó la CPV-2c como la cepa más prevalente en perros de Latinoamérica, seguidas por CPV2-a y CPV-2b.

No se pudo determinar en la presente investigación, si CVP-2c y FPV ocasionan enfermedad clínica en los gatos, debido a que los animales no mostraron signos clínicos, pero reafirma que CPPV-1 es capaz de mantenerse en los gatos de manera asintomática

(Miyazawa et al. 1999; Ikeda et al. 2000; Haynes y Holloway 2012; Balboni et al. 2018), apuntando a que éstos puedan jugar un papel como reservorios del virus para el mantenimiento de la infección, tanto en gatos como en perros (Clegg et al. 2012).

Las variaciones nucleotídicas encontradas en dos de las secuencias de CPV-2c, aunque se trataron de mutaciones sinónimas (que producen el mismo aminoácido), demuestran la gran capacidad de cambio del virus. Además, los felinos podrían infectarse tanto con FPV como con las tres variantes de CPV-2, y podrían ocurrir superinfecciones y coinfecciones con diversas cepas de parvovirus (Battilani et al. 2006; Battilani et al. 2011; Balboni et al. 2018), ocasionando oportunidades de recombinaciones y una heterogenicidad genética alta (Battilani et al. 2011). Es importante investigar esto para determinar el papel del gato en la propagación y patogenicidad de CPPV-1.

5. CONCLUSIONES

- Se detectó la presencia de CPPV-1 en un 27,1% de los gatos muestreados del Valle Central de Costa Rica, mientras que el 100% presentó anticuerpos contra el virus, solo un 72% de los gatos presentó títulos protectivos (mayor o igual a 1:80).
- Se identificó los genogrupos FPV y CVP-2c en leucocitos de gatos seropositivos del Valle Central de Costa Rica, el genogrupo FPV en dos gatos menores de seis meses y el genogrupo CPV-2c en ocho gatos adultos.
- Se reporta por primera vez la presencia de FPV y CPV-2c por secuenciación genética en gatos domésticos de Costa Rica y Centroamérica.

6. RECOMENDACIONES

- Incentivar a los investigadores y estudiantes a realizar estudios con una muestra más amplia de felinos para determinar factores que aumentan el riesgo de infección y propagación del virus.
- Incentivar a los investigadores y estudiantes a realizar estudios experimentales para determinar si la vacuna previene persistencia de CPPV-1 en gatos.
- Proponer a los investigadores y estudiantes, a realizar estudios con mayor cantidad de animales para determinar la presencia de otros genogrupos de CPPV-1 en gatos, perros y carnívoros silvestres de Costa Rica.
- Incentivar a los propietarios a vacunar a sus gatos, para protegerlos del virus de la Leucemia felina y virus de la Rabia, además de Herpesvirus felino, Calicivirus felino y CPPV-1, y educar sobre las repercusiones de no vacunar a sus mascotas.
- Informar a veterinarios y estudiantes sobre la persistencia de CPPV-1 para evitar la transferencia del virus a gatos receptores de transfusiones de sangre.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balboni A, Bassi F, De Arcangeli S, Zobba R, Dedola C, Alberti A, Battilani M. 2018. Molecular analysis of carnivore Protoparvovirus detected in white blood cells of naturally infected cats. BMC Vet Res [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 14(1): 41. Disponible en: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1356-9> doi: 10.1186/s12917-018-1356-9
- Battilani M, Bassani M, Forti D, Morganti L. 2006. Analysis of the evolution of feline parvovirus (FPV). Vet Res Commun [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 30(1): 223-226. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-006-0046-4> doi: 10.1007/s11259-006-0046-4
- Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prosperi S. 2006. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. J Virol [Internet]. [citado el 27 de mayo de 2022]; 352(1), 22-26. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.06.002>
- Battilani M, Balboni A, Ustulin M, Giunti M, Scagliarini A, Prosperi S. 2011. Genetic complexity and multiple infections with more Parvovirus species in naturally infected cats. Vet Res Commun [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 42(1): 43. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1186/1297-9716-42-43> doi: 10.1186/1297-9716-42-43
- Bergmann M, Schwertler S, Speck S, Truyen U, Reese S, Hartmann K. 2019. Faecal shedding of parvovirus deoxyribonucleic acid following modified live feline panleucopenia virus vaccination in healthy cats. Vet Rec [Internet]. [citado el 14

- de junio de 2022]; 185(3), 83-83. Disponible en:
<https://bvajournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1136/vr.104661>
- Blanco K, Prendas J, Cortes R, Jimenez C, Dolz G. 2009. Seroprevalence of viral infections in domestic cats in Costa Rica. J Vet Sci [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 71(5): 661-663. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19498296/> doi: 10.1292/jvms.71.661
- Castro FFC, Rodríguez MPM. 2016. Rabia en un gato doméstico (*Felis silvestris catus*) en el municipio de Yumbo, Valle del Cauca, Colombia. UDCA Actualidad & Divulgación Científica [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 19(1), 243-246. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262016000100028
- Clegg SR, Coyne KP, Dawson S, Spibey N, Gaskell RM, Radford AD. 2012. Canine parvovirus in asymptomatic feline carriers. Vet. Microbiol [Internet]. [citado el 27 de mayo de 2022]; 157(1-2), 78-85. Disponible en:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811351100664X> doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.024
- Dawson S, Willoughby K, Gaskell RM, Wood G, Chalmers WSK. 2001. A field trial to assess the effect of vaccination against feline herpesvirus, feline calicivirus and feline panleucopenia virus in 6-week-old kittens. J Feline Med Surg [Internet]. [citado el 14 de junio de 2022]; 3(1), 17-22. Disponible en:
<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1053/jfms.2000.0154>

Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza M, Buonavoglia C. 2008. Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis. *J Gen Virol* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 89(9): 2290-2298. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/vir.0.2008/001503-0> doi: 10.1099/vir.0.2008/001503-0

Decaro N, Buonavoglia C. 2017. Canine parvovirus post-vaccination shedding: interference with diagnostic assays and correlation with host immune status. *Vet J* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 221: 23. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7129782/> doi:10.1016/j.tvjl.2017.01.020

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 39: 783-791. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> doi: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

Greene C, Sykes J. 2011. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4 ed. Missouri: Elsevier. 120-121p.

Hall TA. 1999. BioEdit: to user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* [Internet]. [citado el 25 de enero de 2020]; 41: 95–98. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/29520866/1999hall1.pdf?1350426811=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DBioEdit_a_user_friendly_

biological_seque.pdf&Expires=1614881328&Signature=VSdgioUsuJSQwdZDY~
aKG6tAAICRMQbnMgg4xyxKrd25dDsGTsc6XtM11bWuecsEY1FwodH9F8145S
gWQ1hZ5E92JiH0DAuatcq8Kod3vqO8NJEPKZzxTiTtW4v4ojKS-c~k4P2N-
A9tQr3GoxdKbcCTLmZLHj2Zu74E2oOwfGzC7oonKfl9r4PmB3G~6qnY0mNR7d
TTrR9PERJAZvXuDfkFeAvxRI-WxzFiwOMZsViZBkxyWnYnltqekhpOVXvYsrutqv
968Hx08FtwvJ6OjRZTgKQAtgs9OnWvx1jHMfpEvjKH9wP~pqEGqfmESyDnCd1
Tm6srPmWXCHXZPPAG-Q__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Haynes SM, Holloway SA. 2012. Identification of parvovirus in the bone marrow of eight cats. *Aust Vet J* [Internet]. [citado el 7 de febrero de 2022]; 90(4): 136-139. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22443328/> doi: 10.1111/j.1751-0813.2012.00899.x

Hellard E, Fouchet D, Santin-Janin H, Tarin B, Badol V, Coupier C, Leblanc G, Poulet H, Pontier D. 2011. When cat's ways of life interact with their viruses: a study in 15 natural populations of owned and unowned cats (*Felis silvestris catus*). *Prev Vet. Med* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 101(3-4): 250-264. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21705099/> doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.020

Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR, Holmes, EC. 2008. Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 89(9): 2280. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2735869/> doi: 10.1099/vir.0.2008/002055-0

- Ikeda Y, Mochizuki M, Naito R, Nakamura K, Miyazawa T, Mikami T, Takahashi E. 2000. Predominance of canine parvovirus (CPV) in unvaccinated cat populations and emergence of new antigenic types of CPVs in cats. *Virology* [Internet]. [citado el 7 de febrero de 2022]; 278(1): 13-19. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11112475/> doi: 10.1006/viro.2000.0653
- Ikeda Y, Nakamura K, Miyazawa T, Tohya Y, Takahashi E, Mochizuki M. 2002. Feline host range of canine parvovirus: recent emergence of new antigenic types in cats. *Emerg Infect Dis* [Internet]. [citado el 14 de junio de 2022]; 8(4), 341. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2730235/> doi: 10.3201/eid0804.010228
- Jukes TH, Cantor CR. 1969. Evolution of protein molecules, In *Mammalian Protein Metabolism*, Ed. New York: Academic. 21-132p.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *MBE* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 35(6): 1547-1549. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lappin MR, Andrews J, Simpson D, Jensen WA. 2002. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus, and feline parvovirus infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 220(1): 38-42. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12680445/> doi: 10.2460/javma.2002.220.38

- Mauro LD. 2015. Claves para comprender a la Parvovirus canina producida por la variante CPV-2c. *Electron Vet* [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2022]; 16(2):1555–60. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020215/021501.pdf>
- Mende K, Stuetzer B, Sauter-Louis C, Homeier T, Truyen U, Hartmann K. 2014. Prevalence of antibodies against feline panleukopenia virus in client-owned cats in Southern Germany. *Vet J* [Internet]. [citado el 7 de febrero de 2022]; 199(3): 419-423. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023314000033> doi: 10.1016/j.tvjl.2013.12.023
- Miyazawa T, Ikeda Y, Nakamura K, Naito R, Mochizuki M, Tohya Y, Vu D, Mikami T, Takahashi E. 1999. Isolation of feline parvovirus from peripheral blood mononuclear cells of cats in northern Vietnam. *Microbiol Immunol* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 43(6): 609-612. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10480557/> doi: 10.1111/j.1348-0421.1999.tb02447.x
- Moredo F, Larsen AE, Stanchi NO. 2018. Patogenicidad microbiana en Medicina Veterinaria [Internet]. La plata (LP): Edulp; [citado el 14 de junio de 2022]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/139348/CONICET_Digital_Nro.0d96fd35-617f-42a2-82ec-532a50b0481a_V.pdf?sequence=5&isAllowed=y

- Navarro AXC, Oliva D. 2010. Construir juntos el cambio. Ext red [Internet]. [citado el 21 de junio de 2022] (1). Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5264832>
- Neuerer F, Horlacher FK, Truyen U, Hartmann, K. 2008. Comparison of different in-house test systems to detect parvovirus in faeces of cats. J Feline Med Surg [Internet]. [citado el 20 de mayo de 2022] 10(3), 247–251. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18243743/doi:10.1016/j.jfms.2007.12.00110.1016/j.jfms.2007.12.001>
- Orozco CV, Osorio ALB, López MFL, Morales AJR. 2021. Parvovirus canino en Latinoamérica. [Internet]. [citado el 30 de mayo de 2022]; Disponible en: <https://repositorio.utp.edu.co/server/api/core/bitstreams/666c0ec1-b373-4321-a2e9-7253f8e5cb9f/content>
- Parrish CR. 1999. Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. Vet Microbiol [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 69(1-2): 29-40. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037811359900084X> doi: 10.1016/S0378-1135(99)00084-X
- Pennisi MG, Hartmann K, Addie DD, Lutz H, Gruffydd-Jones T, Boucraut-Baralon C, European Advisory Board on Cat Diseases. 2015. Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. J Feline Med Surg [Internet]. [citado el 14 de junio de 2022]; 17(7), 588-593. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1098612X15588449>

- Poole GM.1972. Stability of a modified, live panleucopenia virus stored in liquid phase. Appl Microbiol [Internet]. [citado el 28 de diciembre de 2022]; 24(4), 663-664. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.24.4.663-664.1972>
- Restrepo JFC, González LF, Zapata LMM, Sáenz JR. 2013. Virus de la leucemia felina: un patógeno actual que requiere atención en Colombia. Vet y Zoo [Internet]. [citado el 14 de junio de 2022]; 7(2), 117-138. Disponible en: <http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/v7n2a09.pdf>
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 4: 406-425. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3447015/> doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Steinel A, Munson L, Van Vuuren M, Truyen U. 2000. Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores. J Gen Virol [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 81(2): 345-350. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Moritz-Van-Vuuren/publication/12669388_Genetic_characterization_of_feline_parvovirus_sequences_from_various_carnivores/links/572cc8a508ae7441518e649f/Genetic-characterization-of-feline-parvovirus-sequences-from-various-carnivores.pdf doi: 10.1099/0022-1317-81-2-345
- Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. 2001. Parvovirus infections in wild carnivores. J Wildl Dis [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 37(3): 594-

607. Disponible en: <https://meridian.allenpress.com/jwd/article/37/3/594/123050>
doi: 10.7589/0090-3558-37.3.594
- Stuetzer B, Hartmann K. 2014. Feline parvovirus infection and associated diseases. *Vet J*, [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021]; 201(2): 150-155. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S109002331400224X> doi: 10.1016/j.tvjl.2014.05.027
- Tattersall P. 2006. The evolution of parvovirus taxonomy. London: Hodder Arnold. 5-14 p.
- Truyen U, Parrish CR, 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J. Virol.* [Internet]. [citado el 20 de mayo de 2022]; 66(9), 5399–5408. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1323703/> doi: 10.1128/JVI.66.9.5399-5408.1992.
- Truyen U, Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Horzinek MC. 2009. Feline panleukopenia. ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg* [Internet]. [citado el 26 de mayo de 2022]; 11(7), 538-546. Disponible en: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1016/j.jfms.2009.05.002>
- Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, et al. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J Gen Virol* [Internet]. [citado el 5 de diciembre de 2021];

98(10): 2421-2422. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28884666/>
doi: 10.1099/jgv.0.000911

World Animal Protection. 2016. Estudio Nacional sobre tenencia de perros en Costa Rica
2016. San José, Costa Rica: WAP. 50p

8. ANEXOS

Anexo 1. Autorización de la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica



Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria
Comisión de Bioética y Bienestar Animal
 Tel. 2562-4565 / 2562-4569

25 de marzo de 2021
UNA-EMV-CBBA-ACUE-002-2021



Dr. Enrique Cappella Molina
Director
 Escuela de Medicina Veterinaria

Estimado señor:

Para su información y efectos consiguientes, me permito transcribir el acuerdo tomado por la Comisión de Bioética y Bienestar Animal, en la Sesión Ordinaria N°001-2021, celebrada el 25 de marzo de 2021, que dice:

Considerando

1. Que una vez revisado y analizado el proyecto titulado "Seroprevalencia y presencia de protoparvovirus en leucocitos de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica".
2. Que el mismo está a cargo de la Dra. Gaby Dolz Wiedner.
3. Que, en el proyecto arriba enumerado, todos los participantes se comprometen a guardar el bienestar animal de todos los animales objeto del estudio.
4. Asimismo, el proyecto cumple los requisitos que se emanan de la Ley 7451 "Bienestar de los Animales".

POR LO TANTO, SE ACUERDA:

1. AVALAR EL PROYECTO TITULADA: "SEROPREVALENCIA Y PRESENCIA DE PROTOPARVOVIRUS EN LEUCOCITOS DE GATOS DOMÉSTICOS DEL VALLE CENTRAL DE COSTA RICA", PRESENTADO POR LA DRA. GABY DOLZ WIEDNER.

ACUERDO FIRME

Atentamente,
 VERA ALEXANDRA
 ESTRADA KONIG
 (FIRMA)

Firmado digitalmente por
 VERA ALEXANDRA
 ESTRADA KONIG (FIRMA)
 FEEL:101.01.21 15:17:11
 +0600

Dra. Sandra Estrada König
 Coordinadora
 Comité de Bioética y Bienestar Animal
 Escuela de Medicina Veterinaria

C: Dra. Gaby Dolz Wiedner
 Dr. Mario Baldi Salas
 Dr. Mauricio Jiménez Soto
 Dr. Julio César Rojas Ocampo

Tel. (506) 2277-3000
 Apartado 88-3000
 Heredia
 Costa Rica
 www.una.ac.cr



Anexo 2. Consentimiento informado para responsables o propietarios de los felinos muestreados

UNIVERSIDAD NACIONAL
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
LABORATORIO DE MEDICINA POBLACIONAL Y ZOONOSIS
PROGRAMA DE MEDICINA POBLACIONAL Y ECOSISTÉMICA
 Teléfonos:(506) 2562-4508 / 2562- 4553

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Seroprevalencia y presencia de protoparvovirus en leucocitos de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica

Nombre del Investigador Principal: Andrea Obando Corella
 Correo electrónico: aobandocorella@gmail.com

Nombre del propietario/encargado del gato(s): _____

Número de muestras/gatos: _____

A. PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Este trabajo final de graduación en modalidad tesis de grado para licenciatura es realizado por la estudiante de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Andrea Obando Corella, bajo tutoría de la Dra. Gaby Dolz, profesora e investigadora de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Participan como lectores de esta tesis: Dra. Carolina Villalobos Zúñiga y el Lic. Antony Solórzano Morales.

El objetivo general de este estudio es Determinar la seroprevalencia de CPP-1 y su presencia en sangre de gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica.

Los objetivos específicos son: Determinar la seroprevalencia de CPP-1 en gatos domésticos del Valle Central de Costa Rica mediante IHA y detectar, así como también confirmar la presencia de FPV y variantes de CPV-2 presentes en leucocitos de gatos seropositivos en Costa Rica mediante técnicas moleculares.

B. ¿QUÉ SE HARÁ?:

1. Primeramente, se obtendrá información general de los animales: identificación, sexo, edad, raza, información sobre vacunación, fecha de recolecta de muestra, ambiente en el que vive (urbano o rural), si convive con otros gatos, estado de salud, enfermedades crónicas padecidas, estilo de vida (gato de interior o exterior).
2. Seguidamente, se realizará una sujeción física adecuada a los animales (se seguirán los procedimientos de sujeción y toma de la muestra aprobadas por la Comisión de

Bienestar Animal) y se procederá a tomar la muestra de sangre, previa desinfección, y con la supervisión de un médico veterinario, mediante punción ya sea de la vena yugular, safena o cefálica, se recolectarán 2ml en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y 1 ml en tubos sin anticoagulante, con una aguja calibre 22 a 25 pulgadas acoplada a una jeringa, ambos instrumentos estériles y desechables.

3. Los tubos se identificarán con el código de identificación de cada animal y se transportarán a 4°C en una hielera, hasta el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional en donde se congelarán a -20°C hasta su procesamiento.
4. Se utilizarán las muestras sanguíneas para realizar los respectivos análisis laboratoriales: extracción de ADN mediante el kit Dneasy® Blood and Tissue (QIAGEN), posteriormente se someterá el ADN extraído a diferentes protocolos moleculares (PCR convencionales y PCR en tiempo real) y a la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) para la detección de protoparvovirus.
5. Una vez concluida la investigación, las fichas clínicas, los resultados de laboratorio y los consentimientos informados se digitalizarán con el fin de contar con un expediente para cada felino muestreado

C. RIESGOS DEL PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS:

- El animal puede experimentar leve dolor o ardor en el sitio de inserción de la aguja, que ceden cuando esta se retira.
- Molestia general de la punción para obtener la muestra de sangre
- Es posible que el animal se mueva, y la aguja salga de la vena, ocasionando un hematoma pequeño en el lugar de la punción que mejorarán espontáneamente y/o con medidas locales como hielo.
- Algún grado de incomodidad por la sujeción física de sujeción física.
- En algunos animales luego del retiro de la aguja se podría dar sangrado más prolongado de lo esperado, para controlarlo se debe de hacer suave presión en el sitio de la punción con algodón por unos 2 minutos.
- En casos particulares los cuales son infrecuentes se podrían trombosis de la vena, que es un coágulo de sangre adherido a la pared de la vena que obstruye el flujo de sangre, ocurre porque el endotelio vascular resulta dañado por repetidas venopunciones. Otra complicación menos frecuente es infección en el sitio de la punción generando trombosis séptica.
- Se usará **equipo estéril y desechable** para evitar infecciones y no poner en riesgo la salud de los gatos. Si durante el procedimiento usted considera que algún gato está siendo sujeto de algún modo que suponga algún grado de sufrimiento más allá de lo que usted considera permisible, puede detener el procedimiento.

D. BENEFICIOS:

Como resultado de la participación de su gato en este estudio se determinará si se encuentra infectado con protoparvovirus.

Además, recibirá información sobre el mismo, lo que implica, así como contribuir a conocer más sobre su comportamiento en nuestra población felina doméstica nacional.

- E. Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con alguno de los investigadores de este estudio y deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas.
 - F. Si requiere más información o en caso de alguna emergencia se podrá comunicar con la doctora Gaby Dolz al teléfono 8860-7865.
 - G. En caso de presentarse alguna complicación en la salud de los animales debido a la toma de las muestras sanguíneas, los investigadores se harán cargo de atender a los animales de manera gratuita.
-
- H. Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.
 - I. Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a discontinuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención que requiere.
 - J. Los datos y resultados obtenidos en este estudio se manejarán en forma confidencial por los investigadores. Se guardarán en una base de datos en el Laboratorio de Zoonosis bajo la responsabilidad de la Dra. Dolz. Los resultados de los exámenes se reportarán al propietario de los animales. Los investigadores analizarán los datos y los resultados, los cuales podrían ser publicados, con permiso escrito del propietario de los animales.
 - K. No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a que mi gato participe como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, cédula y firma del propietario

Fecha_____

Nombre, cédula y firma del testigo

Fecha_____

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

Fecha_____

Anexo 3. Ficha para recolección de datos de gatos muestreados de la gran área metropolitana.

Nombre:			
Sexo:	M ☐	H ☐	Castrado: si ☐ no ☐
Fecha:			
Raza:	SRD ☐		
Edad:	<6m ☐	6-11m ☐	1-5a ☐ >5a ☐
Vacunas:	si ☐	no ☐	
Enfermedades crónicas:			
Estilo de vida:	Interior ☐	Exterior ☐	
Ambiente:	Rural ☐	Urbano ☐	
Estado:	Saludable ☐	No saludable ☐	
Convivencia:	Solo ☐	Con otros gatos ☐	
Presenta:	Anemia ☐	Leucopenia ☐	
Provincia, cantón:			

Anexo 4. Datos y características presentadas de la totalidad de los gatos muestreados en este estudio, priorizando muestras positivas para CVVP-1.

Muestra	Fecha de toma de muestra	Sexo	Castrado	Raza	Edad	Vacunas	Enfer. Crónicas	Estilo de vida	Ambiente	Estado de salud	Convivencia	Anemia	Leucopenia	Provincia	Cantón	IHA	qPCR	PCR
8	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	320	Positivo	Positivo
12	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	320	Positivo	
20	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	640	Positivo	Positivo
21	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	320	Positivo	Positivo
25	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80	Positivo	
31	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	40	Positivo	
41	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	160	Positivo	
44	22/5/2021	Hembra	Si	Siamés	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	160	Positivo	
46	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	640	Positivo	Positivo
52	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	20	Positivo	
54	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	160	Positivo	
56	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	80	Positivo	
58	25/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	160	Positivo	
60	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	San José	640	Positivo	Positivo
61	28/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Desamparados	320	Positivo	
63	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	2560	Positivo	
64	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	40	Positivo	
67	28/5/2021	Macho	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Desamparados	80	Positivo	
71	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	80	Positivo	
79	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	160	Positivo	Positivo
83	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40	Positivo	
84	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	160	Positivo	
85	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	640	Positivo	Positivo
86	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80	Positivo	
88	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	160	Positivo	Positivo
90	11/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	80	Positivo	
91	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	640	Positivo	Positivo

96	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	80	Positivo	
100	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Tibás	160	Positivo	
101	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Santa Ana	80	Positivo	
106	13/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No	Interior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	Alajuela	Alajuela	160	Positivo	
108	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	San José	Aserri	40	Positivo	
111	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserri	640	Positivo	
112	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserri	80	Positivo	
113	26/6/2021	Macho	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Rural	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserri	20	Positivo	
115	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserri	80	Positivo	
116	26/6/2021	Macho	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserri	40	Positivo	
134	29/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	Si	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	40	Positivo	
135	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	Si	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	Cartago	El Guarco	1280	Positivo	
138	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	Si	No	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	Cartago	El Guarco	1280	Positivo	
139	29/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	Si	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	160	Positivo	
153	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Desamparados	640	Positivo	Positivo
1	20/5/2021	Hembra	No	Persa Himalaya	<6m	Si	No	Exterior	Rural	No saludable	Solo	No	No	Cartago	Turrialba	320		
2	20/5/2021	Macho	No		1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	Heredia	Heredia	40		
3	20/5/2021	Macho	Si	SRD	>5a	Si	No	Interior	Urbano	No saludable	Solo	No	Si	Heredia	Heredia	160		
4	20/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	Si	No	Alajuela	Alajuela	40		
5	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserri	20		
6	21/5/2021	Macho	No		1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	Si	Si	San José	Aserri	40		
7	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	San José	40		
9	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	San José	80		
10	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80		
11	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	Cartago	La Unión	40		
13	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	80		
14	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	80		
15	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	320		
16	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	80		
17	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	320		
18	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	160		
19	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	320		

22	21/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	Si	Insuficiencia Renal	Interior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	Heredia	Heredia	80
23	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	80
24	22/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40
26	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	20
27	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
28	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	40
29	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80
30	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80
32	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Tibás	320
33	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	80
34	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
35	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	40
36	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
37	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	640
38	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	160
39	21/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	160
40	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	80
42	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	320
43	25/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	320
45	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	320
47	22/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	40
48	25/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	160
49	22/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
50	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
51	22/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	40
53	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40
55	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	320
57	25/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	40
59	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Desamparados	80
62	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Goicoechea	80
65	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	40
66	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	40

68	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	40
69	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
70	28/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	40
72	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
73	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	40
74	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	40
75	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	40
76	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	20
77	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	80
78	28/5/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	Cartago	La Unión	20
80	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	160
81	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40
82	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40
87	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	40
89	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	40
92	28/5/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	320
93	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	40
94	10/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Montes de Oca	80
95	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	320
97	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	80
98	11/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Montes de Oca	80
99	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Escazú	160
102	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	San José	320
103	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	Si	No	Exterior	Rural	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Goicoechea	160
104	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Vásquez de Coronado	320
105	11/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	San José	Goicoechea	160
107	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	No	Si	San José	Aserrí	160
109	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
110	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	20
114	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
117	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	640
118	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	40

119	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Alajuelita	40
120	26/6/2021	Macho	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	640
121	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	80
122	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Desamparados	320
123	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
124	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
125	26/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Aserrí	160
126	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	80
127	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Santa Ana	160
128	26/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Aserrí	160
129	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	320
130	29/6/2021	Macho	Si	SRD	>5a	Si	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	640
131	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	320
132	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	160
133	29/6/2021	Hembra	No	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	40
136	29/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	Cartago	El Guarco	80
137	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	Cartago	640
140	29/6/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	Si	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	160
141	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No Sedimentación vejiga, Obesidad	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	No	No	Alajuela	Orotina	640
142	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	No Sedimentación vejiga, Obesidad	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	Cartago	320
143	29/6/2021	Hembra	Si	SRD	>5a	Si	Obesidad	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	Cartago	160
144	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	El Guarco	640
145	3/7/2021	Macho	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	Cartago	Cartago	640
146	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	No saludable	Solo	Si	No	San José	Uruca	160
147	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Coronado	320
148	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	<6m	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	San Pedro	320
149	3/7/2021	Hembra	Si	Bengalí	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Con otros gatos	No	No	San José	Curridabat	320
150	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Montes de Oca	640
151	3/7/2021	Hembra	Si	SRD	6-11m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	San José	40
152	3/7/2021	Macho	Si	SRD	<6m	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Escazú	40
154	3/7/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Interior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	20

155	3/7/2021	Macho	Si	SRD	1-5a	No	No	Exterior	Urbano	Saludable	Solo	No	No	San José	Curridabat	320
-----	----------	-------	----	-----	------	----	----	----------	--------	-----------	------	----	----	----------	------------	-----

Anexo 5. Mapa nucleótidos y aminoácidos CPV-2c y FPV

CPV-2c aminoácidos 295-471

	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	
1	CCT	CAA	GCT	GAA	GGA	GGT	ACT	AAC	TTT	GGT	TAT	ATA	GGA	GTT	CAA	45
1	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Gly	Tyr	Ile	Gly	Val	Gln	15 (309)
46	CAA	GAT	AAA	AGA	CGT	GGT	GTA	ACT	CAA	ATG	GGA	AAT	ACA	AAC	TAT	90
16	Gln	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Met	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	30 (324)
91	ATT	ACT	GAA	GCT	ACT	ATT	ATG	AGA	CCA	GCT	GAG	GTT	GGT	TAT	AGT	135
31	Ile	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Arg	Pro	Ala	Glu	Val	Gly	Tyr	Ser	45 (339)
136	GCA	CCA	TAT	TAT	TCT	TTT	GAG	GCG	TCT	ACA	CAA	GGG	CCA	TTT	AAA	180
46	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Glu	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Pro	Phe	Lys	60 (354)
181	ACA	CCT	ATT	GCA	GCA	GGA	CGG	GGG	GGA	GCA	CAA	ACA	GAT	GAA	AAT	225
61	Thr	Pro	Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Glu	Asn	75 (369)
226	CAA	GCA	GCA	GAT	GGT	GAT	CCA	AGA	TAT	GCA	TTT	GGT	AGA	CAA	CAT	270
76	Gln	Ala	Ala	Asp	Gly	Asp	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Gly	Arg	Gln	His	90 (384)
271	GGT	CAA	AAA	ACT	ACC	ACA	ACA	GGA	GAA	ACA	CCT	GAG	AGA	TTT	ACA	315
91	Gly	Gln	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Glu	Arg	Phe	Thr	105 (399)
316	TAT	ATA	GCA	CAT	CAA	GAT	ACA	GGA	AGA	TAT	CCA	GAA	GGA	GAT	TGG	360
106	Tyr	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Gly	Asp	Trp	120 (414)
361	ATT	CAA	AAT	ATT	AAC	TTT	AAC	CTT	CCT	GTA	ACA	GAA	GAT	AAT	GTA	405
121	Ile	Gln	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Leu	Pro	Val	Thr	Glu	Asp	Asn	Val	135 (429)
406	TTG	CTA	CCA	ACA	GAT	CCA	ATT	GGA	GGT	AAA	ACA	GGA	ATT	AAC	TAT	450
136	Leu	Leu	Pro	Thr	Asp	Pro	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Asn	Tyr	150 (444)
451	ACT	AAT	ATA	TTT	AAT	ACT	TAT	GGT	CCT	TTA	ACT	GCA	TTA	AAT	AAT	495
151	Thr	Asn	Ile	Phe	Asn	Thr	Tyr	Gly	Pro	Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	Asn	165 (459)
496	GTA	CCA	CCA	GTT	TAT	CCA	AAT	GGT	cAA	ATT	TGG	GAT	A--			534
166	Val	Pro	Pro	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Asp	XXX			177 (471)

FPV aminoácidos 295-471

	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	
1	CCT	CAA	TCT	GAA	GGA	GCT	ACT	AAC	TTT	GGT	GAT	ATA	GGA	GTT	CAA	45
1	Pro	Gln	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Gly	Asp	Ile	Gly	Val	Gln	15 (309)
46	CAA	GAT	AAA	AGA	CGT	GGT	GTA	ACT	CAA	ATG	GGA	AAT	ACA	GAC	TAT	90
16	Gln	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Val	Thr	Gln	Met	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	30 (324)
91	ATT	ACT	GAA	GCT	ACT	ATT	ATG	AGA	CCA	GCT	GAG	GTT	GGT	TAT	AGT	135
31	Ile	Thr	Glu	Ala	Thr	Ile	Met	Arg	Pro	Ala	Glu	Val	Gly	Tyr	Ser	45 (339)
136	GCA	CCA	TAT	TAT	TCT	TTT	GAA	GCG	TCT	ACA	CAA	GGG	CCA	TTT	AAA	180
46	Ala	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Glu	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Pro	Phe	Lys	60 (354)
181	ACA	CCT	ATT	GCA	GCA	GGA	CGG	GGG	GGA	GCG	CAA	ACA	GAT	GAA	AAT	225
61	Thr	Pro	Ile	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Glu	Asn	75 (369)
226	CAA	GCA	GCA	GAT	GGT	GAT	CCA	AGA	TAT	GCA	TTT	GGT	AGA	CAA	CAT	270
76	Gln	Ala	Ala	Asp	Gly	Asp	Pro	Arg	Tyr	Ala	Phe	Gly	Arg	Gln	His	90 (384)
271	GGT	CAA	AAA	ACT	ACT	ACA	ACA	GGA	GAA	ACA	CCT	GAG	AGA	TTT	ACA	315
91	Gly	Gln	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Gly	Glu	Thr	Pro	Glu	Arg	Phe	Thr	105 (399)
316	TAT	ATA	GCA	CAT	CAA	GAT	ACA	GGA	AGA	TAT	CCA	GAA	GGA	GAT	TGG	360
106	Tyr	Ile	Ala	His	Gln	Asp	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Gly	Asp	Trp	120 (414)
											426					
361	ATT	CAA	AAT	ATT	AAC	TTT	AAC	CTT	CCT	GTA	ACA	AAT	GAT	AAT	GTA	405
121	Ile	Gln	Asn	Ile	Asn	Phe	Asn	Leu	Pro	Val	Thr	Asn	Asp	Asn	Val	135 (429)
406	TTG	CTA	CCA	ACA	GAT	CCA	ATT	GGA	GGT	AAA	ACA	GGA	ATT	AAC	TAT	450
136	Leu	Leu	Pro	Thr	Asp	Pro	Ile	Gly	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Asn	Tyr	150 (444)
451	ACT	AAT	ATA	TTT	AAT	ACT	TAT	GGT	CCT	TTA	ACT	GCA	TTA	AAT	AAT	495
151	Thr	Asn	Ile	Phe	Asn	Thr	Tyr	Gly	Pro	Leu	Thr	Ala	Leu	Asn	Asn	165 (459)
496	GTA	CCA	CCA	GTT	TAT	CCA	AAT	GGT	CAA	ATT	TGG	GAT				534
166	Val	Pro	Pro	Val	Tyr	Pro	Asn	Gly	Gln	Ile	Trp	Asp				177 (471)

Anexo 6. Alineamiento de aminoácidos de las 10 muestras secuenciadas en este estudio

						
	5	15	25	35	45	55
M8	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M20	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M21	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M46	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M60	PQSEGATNFG	DIGVQQDKRR	GVTQMGNTDY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M79	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M85	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M88	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M91	PQAEGGTNFG	YIGVQQDKRR	GVTQMGNTNY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
M153	PQSEGATNFG	DIGVQQDKRR	GVTQMGNTDY	ITEATIMRPA	EVGYSAPYYS	FEASTQGPFK
						
	65	75	85	95	105	115
M8	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M20	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M21	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M46	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M60	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M79	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M85	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M88	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M91	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
M153	TPIAAGRGGGA	QTDENQAADG	DPRYAFGRQH	GQKTTTTGET	PERFTYIAHQ	DTGRYPEGDW
						
	125	135	145	155	165	175
M8	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M20	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M21	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M46	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M60	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M79	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M85	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M88	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD
M91	IQNINFNLPV	TEDNVLLPTD	PIGGKTGINY	TNIFNTYGPL	TALNNVPPVY	PNGQIWD