

Facultad de Ciencias
PEDECIBA Biología

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

ASPECTOS MOLECULARES Y ANTIGÉNICOS DEL PARVOVIRUS CANINO.

MSc. Andrea Blanc Pintos

DIRECTOR

Prof. Dr. Juan Arbiza

CO-DIRECTOR

Dra. Mabel Berois

Marzo-2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Mabel Berois y Juan Arbiza. A Juan por abrirme las puertas en el laboratorio hace muchos años...allá por el 2001... y confiar en mí para las diversas investigaciones. A Mabe por su apoyo constante y por su dedicación! Gracias a ambos por el estímulo y sus enseñanzas! Gracias por la paciencia que me tuvieron! Gracias de corazón!

A Ruben Pérez, Juan Cristina y Rodney Colina por aceptar ser parte del tribunal.

A PEDECIBA y ANII, por su financiación.

A las brujas del labo que supimos compartir muchos momentos, Adri, Sandra, Anita, Nati R, Nati O, Vir, Vivi, Lore. También a Santi, y a Darío con quien hicimos varios ensayos para ambas tesis.

A Ceci Negro y Eduardo Reolón con quienes empezamos con todas estas ideas.

A los colegas de INTA: Dr. Oscar Taboga por su gran ayuda en la purificación de las VLPs y algunos ensayos mas. A la Dra. Andrea Peralta por proveerme las células para la titulación de VLPs.

A todos los que de alguna forma estuve molestando en el laboratorio, en Bioquímica de Ciencias, en Pasteur: en el laboratorio de Mariella Bollati y en el Laboratorio de Otto Pritsch.

A Norberto Harrison que hoy ya no está pero fue una de mis "mulas", al igual que Tony Coira que además me consiguió la cepa para la seroneutralización.

A Rodrigo Otavio Silva por las cepas de caninos y animales silvestres de Brasil. A Colin Parrish por el plásmido y anticuerpos.

A mi familia y amigos, que siempre están con sus palabras de aliento para seguir adelante y brindando el apoyo incondicional.

Se la dedico muy especialmente a Gonza, Delfi y Juanma. Gonza ha sido el mayor impulsor para que yo termine esta tesis. Gracias por el aguante y el estímulo! Porque además lo torturé con la sacada de sangre de cerdos para los ensayos finales! A Delfi y Juanma, por bancarse mi ausencia, por los días y horas sin prestarles atención!

LOS AMO!!!

RESUMEN

El Parvovirus Canino es uno de los principales agentes causante de diarreas en caninos en todo el mundo. Es un virus altamente contagioso, que causa alta morbi-mortalidad. Se originó como una variante de rango de huésped del virus de la panleucopenia felina (FPV) que a través de mutaciones en la proteína VP2 ganó la habilidad de infectar perros. Luego de su descubrimiento en los años 70', se han detectado tres nuevas variantes antigénicas (CVP-2a, CPV-2b y CPV-2c) que se identifican por las diferencias en 1 aminoácido y en 5 aminoácidos respecto a la cepa original (CPV-2). Como consecuencia de la rápida dispersión del CPV, estas variantes se han reportado circulando en el mundo entero.

Uno de los objetivos de esta tesis fue investigar posibles nuevas mutaciones dentro de los genomas a partir de cepas de CPV circulantes en caninos y animales silvestres de Uruguay y Brasil. Al disponer de estos datos fue posible además, evaluar la relación filogenética de las cepas detectadas con cepas de referencia ya reportadas. Todas las muestras de caninos de Uruguay presentaron el aminoácido Glutamato en la posición 426 de la proteína VP2 correspondiente a la variante CPV-2c. Una de las muestras fue aislada en cultivos celulares siendo el primer reporte de aislamiento de dicha variante en nuestro país. Luego de 30 subcultivos, dicha muestra presentó cambios en dos residuos de la proteína VP2 respecto de la muestra original (Pro352Ser y Asp375Asn), no representando ninguno de ellos relevancia a nivel funcional.

La región codificante de la cepa CPV-2c original se comparó con secuencias CPV-2c disponibles en la base de datos mundial, donde las mutaciones detectadas ya fueron reportadas anteriormente. Por otra parte, la secuencia de la región codificante de VP2 de la cepa Cornell atenuada, presente en una vacuna nacional y la cepa Cornell salvaje reveló cuatro cambios aminoacídicos entre ambas, tres de los cuales están documentados en cepas adaptadas al cultivo celular.

Además, se analizaron muestras de materia fecal de caninos y de animales silvestres de Brasil detectando la variante CPV-2b, siendo el primer reporte de ese país en la especie *Chrysocyon brachyurus*, más conocido como aguará guazú. Todas las muestras compartieron las mutaciones menos frecuentes Ser297Asn y Tyr324Leu ya reportadas anteriormente por otros autores.

Para abordar el estudio de las propiedades biológicas del CPV se intentó la construcción de un clon infeccioso y se generaron partículas similares a virus (VLPs) utilizando el sistema de expresión Baculovirus a partir del gen que codifica para la proteína VP2 de una cepa vacunal CPV-2 y de la variante de campo CPV-2c. Las VLPs generadas (VLPs CPV/VP2-2 y VLPs CPV/VP2-2c) demostraron ser similares a la partícula de CPV del virus original desde el punto de vista

estructural y antigénico. Además, demostraron mantener intacto el sitio de unión al receptor por su actividad hemoaglutinante. En los ensayos de respuesta inmune dichas VLPs demostraron que producen un elevado título de anticuerpos seroneutralizantes, siendo mayores los niveles de respuesta contra la variante homóloga CPV-2.

La alta variabilidad encontrada en las cepas estudiadas, indica que a pesar de que el CPV es un virus ADN, se encuentra en continua evolución genética. Es imperioso profundizar en los nuevos cambios que surgen de modo de poder identificar y adelantarse a posibles nuevas mutaciones que puedan tener importancia a nivel de funcionamiento y patogenicidad del virus.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	13
1.2 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.....	14
1.2.1. El virión	14
1.2.2. Genoma	17
1.2.3. Proteínas.....	18
1.2.4. Ciclo replicativo	20
1.3. ORIGEN Y EMERGENCIA VIRAL.....	23
1.3.1. Emergencia de las variantes antigénicas de CPV-2.	26
1.3.2. Distribución mundial de las variantes antigénicas	27
1.4. RANGO DE HUESPED	29
1.5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD	32
1.6. CONTROL Y PREVENCIÓN.....	34
1.6.1. Inmunización	35
1.6.2. Falla de las vacunas.	37
1.6.3. Nuevas vacunas- VLPs.	39
2. HIPÓTESIS	43
3. OBJETIVOS	44
OBJETIVO GENERAL.....	44
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y GENÓMICA DE CPV.	45
4.1 MATERIALES Y MÉTODOS	45
4.1.1 Muestras.....	45
4.1.2 Extracción de ADN viral.	46
4.1.3 Diseño de cebadores	47
4.1.4 Amplificación por PCR.	48
4.1.4.3 Amplificación de los extremos	49

4.1.5	Análisis del polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP).....	51
4.1.6.	Evaluación de productos de PCR, purificación y secuenciación.....	51
4.1.7	Análisis de secuencias y filogenia.	52
4.1.8	Aislamiento en cultivo celular	53
4.1.9	Identificación de CPV mediante inmunofluorescencia.	53
4.2	RESULTADOS	54
4.2.1	Detección y análisis de variantes de campo CPV-2c.....	54
4.2.2	Aislamiento de la variante CPV-2c en cultivos celulares.....	55
4.2.3	Análisis genómico de la cepa de campo CPV-2c-294MF, CPV-2c 294 p30 y de las cepas CPV-2 Cornell atenuada y salvaje.....	57
4.3	DISCUSIÓN	66
4.4	CONCLUSIONES.....	73
5.	CAPÍTULO II: RESPUESTA INMUNE GENERADA POR VARIANTES DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE VP2.	74
5.1	MATERIALES Y MÉTODOS - CLON INFECTIVO DE CPV	74
5.1.1	Obtención de plásmido pBI265.	74
5.1.2.	Clonaje de la cepa de campo CPV-2c en el plásmido pBI265	75
5.1.3.	Transfección del plásmido pBI265-2c en células CRFK.....	78
5.1.4	Amplificación del posible clon infeccioso CPV-2c en células CRFK.	79
5.2	RESULTADOS- CLON INFECTIVO.....	80
5.2.1.	Obtención de clon infeccioso conteniendo el genoma de CPV-2c.....	80
5.2.2.	Amplificación de los clones infecciosos.....	81
5.3	DISCUSIÓN-CLON INFECTIVO.	82
5.4.	MATERIALES Y MÉTODOS- PARTÍCULAS NO REPLICATIVAS, VLPs DE CPV.	83
5.4.1.	Construcción de los plásmidos pFastBac recombinantes conteniendo el gen VP2.	84
5.4.2	Construcción de bácmidos recombinantes conteniendo el gen VP2.....	86
5.4.3	Obtención de los baculovirus recombinantes por transfección.....	87
5.4.4	Amplificación de los baculovirus recombinantes.....	88

5.4.5 Producción y purificación de VLPs de CPV.	89
5.4.6 Detección de la proteína recombinante VP2.	89
5.4.7. Evaluación de la capacidad antigénica de las VLPs de CPV-2 y 2c.....	91
5.5 RESULTADOS - VLPs	94
5.5.1. Obtención de partículas no replicativas, VLPs, basadas en la proteína VP2 de CPV.94	
5.5.2. Análisis de la expresión de la proteína VP2.....	97
5.5.3. Evaluación de la respuesta inmune generada por las VLPs.	101
5.6. DISCUSION- VLPs.....	103
5.7. CONCLUSIONES.....	107
6. PERSPECTIVAS	108
7. REFERENCIAS.....	109
8. ANEXOS	128
Anexo 1. Publicación “ Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay.	126
Anexo 2. Tabla comparativa entre las secuencias aminoacídicas de NS1/2 de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank.....	131
Anexo 3. Tabla comparativa entre las secuencias aminoacídicas de VP1 de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank.....	134

FIGURAS

Figura 1. Árbol taxonómico de la familia <i>Parvoviridae</i>	13
Figura 2. Estructura del parvovirus.....	14
Figura 3. Representación gráfica de la topología de VP2.....	15
Figura 4. Esquema de la estructura secundaria de la proteína VP2.....	15
Figura 5. Mapa topográfico de una de las subunidades proteicas de la cápside viral.....	16
Figura 6. Mapa transcripcional del genoma de CPV.....	17
Figura 7. Esquema que muestra la posición de los repetidos dobles y triples en el extremo 5' del genoma de CPV.....	18
Figura 8. Resumen general de las vías de infección conocidas de cápsides virales.....	21
Figura 9. Ciclo replicativo del ADN de parvovirus autónomos.....	22
Figura 10. Proceso evolutivo del CPV-2 en perros.....	27
Figura 11. Distribución mundial de las variantes de CPV-2 en perros domésticos.....	29
Figura 12. Patogénesis de CPV.....	33
Figura 13. Brecha de inmunidad.....	36
Figura 14. Detección de variante de CPV en muestras de Uruguay.....	54
Figura 15. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas parciales de las cepas de campo de CPV de Uruguay utilizando el programa Bioedit.....	55
Figura 16. Evidencia de aislamiento de la cepa CPV-2c de Uruguay.....	56
Figura 17. Detección de CPV por fluorescencia.....	57
Figura 18. Gel de agarosa mostrando la extracción de las formas replicativas por el método de HIRT.....	58
Figura 19. Región nucleotídica secuenciada de los genomas en estudio.....	59
Figura 20. Gráfica de la distribución de las muestras de perros analizadas por edades.....	64
Figura 21. Arbol filogenético del gen VP2 de las muestras de caninos y del animal silvestre, aguará guazú, de Brasil.....	65
Figura 22. Esquema del protocolo de clonado libre de enzimas de restricción.....	76
Figura 23. Geles de agarosa.....	80
Figura 24. Observación de células tratadas con el clon infeccioso en células CRFK.....	81
Figura 25. Detección de CPV en células tratadas con clones infecciosos.....	81
Figura 26. Generación de baculovirus recombinantes y expresión génica con el sistema de expresión Bac-to-Bac®.....	84
Figura 27. Esquema de la inmunización de ratones con las vacunas recombinantes expresando la proteína VP2 de CPV.....	92

Figura 28. Gel de agarosa mostrando los megacebadores.....	94
Figura 29. Gel de agarosa mostrando los productos de la segunda PCR.....	94
Figura 30. Gel de agarosa mostrando las digestiones con la enzima BamHI.....	95
Figura 31. Gel de agarosa mostrando los productos de PCR con primers pUC M13.....	96
Figura 32. Ensayo de Inmunofluorescencia de la proteína VP2 expresada en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes Bac CPV/VP2-2, Bac CPV/VP2-2c y células Sf9 sin infectar.....	98
Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs de parvovirus canino obtenidas de la expresión en los respectivos baculovirus recombinantes BacCPV/VP2-2 (a) y Bac CPV/VP2-2c(b).....	99
Figura. 34. Análisis por SDS-PAGE y Western blot.....	100
Figura 35. Actividad hemoaglutinante de las VLPs de CPV utilizando glóbulos rojos de cerdos...100	
Figura 36. Test de aglutinación en portaobjetos del sobrenadante de la seroneutralización.....101	
Figura 37. Títulos de anticuerpos neutralizantes determinada por seroneutralización y revelada por HA en ratones inmunizados con VLPs.....	102

TABLAS

Tabla 1. Variación de aminoácidos en la proteína VP2 de parvovirus felinos y caninos.....	25
Tabla 2. Especie y familia taxonómica de carnívoros silvestres infectados por variantes de CPV..	31
Tabla 3. Muestreo de carnívoros salvajes.....	46
Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del genoma de CPV.....	47
Tabla 5. Secuencias obtenidas de GenBank para establecer las relaciones filogenéticas entre variantes.....	52
Tabla 6. Variaciones nucleotídicas y aminoacídicas entre las cepas de CPV-2 Cornell atenuada y Cornell salvaje.....	60
Tabla 7. Diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre las cepas CPV-2c 294MF y 294 p30.....	60
Tabla 8. Diferencias aminoacídicas en la proteína VP2 de CPV-2c.....	62
Tabla 9. Mutaciones presentes en la secuencia de proteína de CPV-2b del aguará guazú comparado con cepas prototipo CPV-2 (M38245) y CPV-2b (M74849).....	63
Tabla 10. Secuencias de los cebadores para la amplificación del genoma de CPV en 2 partes.....	77
Tabla 11. Secuencias de los cebadores para la primer ronda de PCR conteniendo parte de la secuencia de pFastBac y parte de la secuencia del gen VP2.....	85
Tabla 12. Diseño experimental para ensayo en ratones con VLPs de CPV.....	92
Tabla 13. Diferencias aminoacídicas entre las VP2 presentes en las VLPs CPV-2 y CPV-2c.....	96
Tabla 14. Producciones de VLP.....	97

ABREVIATURAS

A-72: Línea celular canina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
Ala: Alanina
APC: Células presentadoras de antígenos
Arg: Arginina
ARN: Ácido desoxirribonucleico.
Asn: Asparagina
Asp: Aspartato
ATB: antibiótico-antimicótico 1% (penicilina 100 Unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL, anfotericina B 0.25 µg/mL, ATB/AM Gibco #15240-062)
BEVS: Sistema de vector de expresión de Baculovirus
BCIP: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
BFPV: *Blue fox parvovirus*, parvovirus del zorro azul
CPV: *Canine Parvovirus*, Parvovirus Canino
CRFK: Células de riñón felino Crandell-Rees
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DMEM: Medio esencial modificado de Dulbecco's
DMSO: dimetil sulfóxido
dNTPs: 2' desoxinucleósido trifosfatos
dpi: días post infección
ECP: efecto citopático
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
FPV: *Feline panleukopenia virus*, Virus de la Panleucopenia felina
Glu: Glutamato
Gly: Glicina
HA: Hemoaglutinación
HCl: Ácido clorhídrico.
ICTV: *International Committee of taxonomy of Viruses*. Comité internacional de taxonomía viral
IDT: Integrated DNA Technologies
Ile: Isoleucina
INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
IPTG: isopropil-β- D-1-tiogalactopiranosido
LB: Luria Bertani
Leu: Leucina
Lys: Lisina
MCPV: *Masked palm civet parvovirus*, Parvovirus de la civeta de la palma enmascarado
MCV: *Minute canine virus*, Virus diminuto de los canino
Met: Metionina
MEV: *Mink enteritis virus*, virus de la enteritis del visón,
MgCl₂: Cloruro de Magnesio
Mock: control negativo
MOI: multiplicidad de infección
MVM: *Murine minute virus*, Virus diminuto de los ratones.
NaCl: Cloruro de sodio
NaOH: Hidróxido de sodio
NBT: nitroazul de tetrazolio
NEB: New England Biolabs
NH₄SO₄: sulfato de amonio

NLS: señal de localización nuclear.
nm: nanómetros
NS1: Proteína no estructural 1
NS2: Proteína estructural 2
PAMP: Motivos de patrones asociados a patógenos
PCR: *Polimerase chain reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa
RDPV: *Raccoon dog parvovirus*, parvovirus del perro mapache
RFLP. polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción.
RPV: *Raccoon parvovirus*, parvovirus de los mapaches
SAT: *Slide agglutination test*, test de aglutinación en portaobjetos
SDS: Dodecilsulfato de sodio
Ser: Serina
Sf9: *Spodoptera frugiperda*
SFB: Suero Fetal Bovino
TAE: Tris, Acético, EDTA
TfR: Receptor de la transferrina
Thr: Treonina
TPB: caldo fosfato triptosa
TPB: caldo fosfato triptosa
Tyr: Tirosina
Val: Valina
VLPs: *Virus-like protein*, proteínas similares a virus.
VP: Proteína de la cápside viral

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

El Parvovirus Canino tipo 2 (CPV-2) pertenece al género Parvovirus en la familia *Parvoviridae*, la cual comprende a una gran variedad de virus ADN monocatenarios pequeños con huéspedes naturales que se extienden desde primates a insectos. Esta familia contiene dos subfamilias: *Parvovirinae*, que infecta vertebrados y *Densovirinae*, que infecta insectos y otros artrópodos (Cotmore & Tattersall, 2007). Recientemente, el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV), en su décimo reporte, ha modificado la nomenclatura de los géneros debido al ingreso de más de 100 especies nuevas. De este modo, el CPV ahora pertenece al género *Protoparvovirus*, dentro de la subfamilia *Parvovirinae* (Cotmore y cols, 2014). Este género, contiene virus que infectan un gran número de mamíferos y aves diferentes. Varios de estos causan importantes enfermedades en animales domésticos ó salvajes, incluyendo el virus de la Panleucopenia Felina (FPV), el Parvovirus Porcino y el Parvovirus Canino (CPV) (Figura 1).

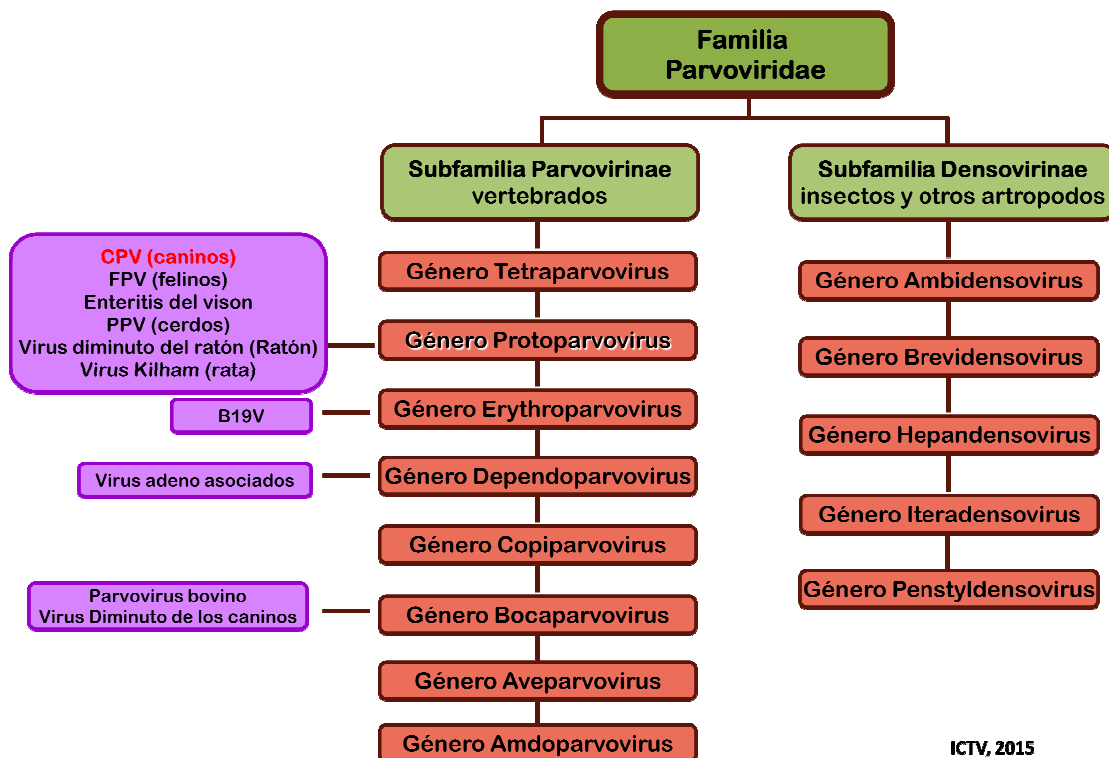


Figura 1. Árbol taxonómico de la familia *Parvoviridae*. (Tomado de ICTV, 2015). (<http://www.ictvonline.org>).

1.2 CARACTERISTICAS DEL VIRUS

1.2.1. El virión

Los parvovirus se encuentran entre los virus con genoma ADN más pequeños. El virión tiene una estructura relativamente simple, de entre 18 y 26 nm de diámetro, carece de envoltura lipídica y está compuesto en su totalidad por proteínas y ADN. Las estructuras de las cápsides completas (conteniendo el ADN), o de las cápsides vacías, fueron determinadas por cristalografía de rayos X (Tsao y cols, 1991; Agbandje y cols, 1993). Estas estructuras mostraron que las cápsides estaban ensambladas en un total de 60 subunidades de las proteínas VP1, VP2 y VP3, arregladas con simetría icosaédrica T=1 (Fields y cols, 2013). Figura 2.

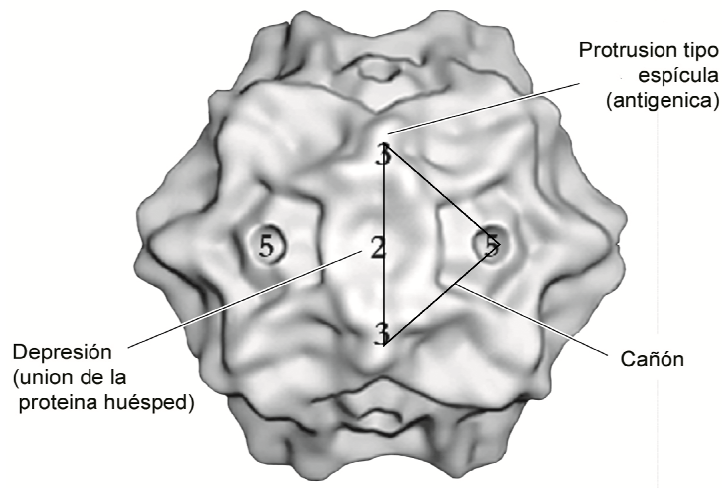


Figura 2. Estructura del parvovirus. Micrografía electrónica de parvovirus canino mostrando algunas de las características de la superficie alrededor de los ejes de simetría de dos, tres y cinco. (Tomado de Fields 4ta edición, Fields y cols, 2001).

Cada subunidad contiene el mismo motivo de barril beta de 8 hebras antiparalelas, que se encuentra también en la mayoría de las estructuras de las cápsides virales (Tsao y cols, 1991)(figura 3 y 4). Esta estructura de barril beta se encuentra principalmente por debajo de la superficie de la cápside y contiene sólo aproximadamente un tercio de la composición de aminoácidos de VP2, la principal proteína estructural en la mayoría de los parvovirus. Los dos tercios restantes se presentan como 4 bucles grandes conectando las hebras del barril beta. Los bucles forman la mayor parte de la superficie de la cápside, en la que varias características biológicas, como las especies de huésped y tropismo de los tejidos, la unión al receptor, y propiedades antigénicas han sido asignadas estructural y genéticamente (Parrish y cols, 1991; Parker y cols, 2001).

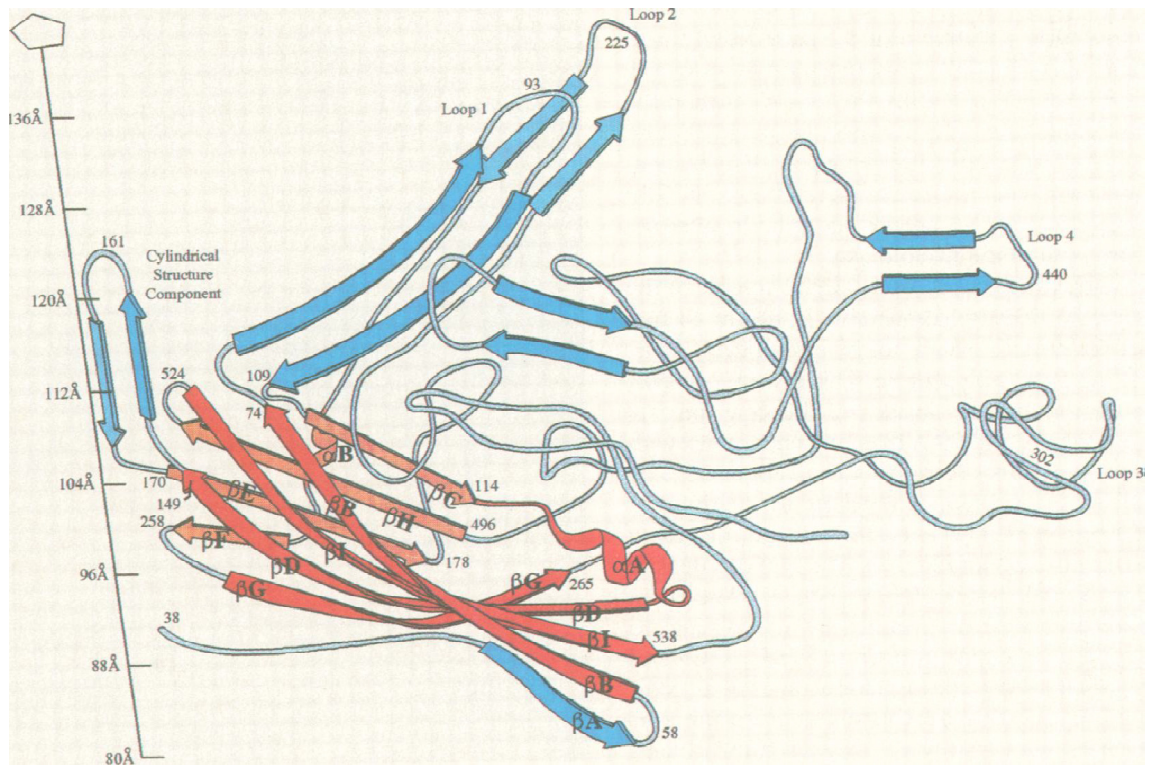


Figura 3. Representación gráfica de la topología de VP2. En rojo se muestra la estructura en forma de barril β , y en azul los lazos que conforman la superficie de la cápside. Además se incluyen algunas posiciones aminoacídicas estratégicas. Se detalla la distancia radial (\AA) desde el centro viral a lo largo del eje de simetría de 5. (Extraído de Tsao y cols, 1991).

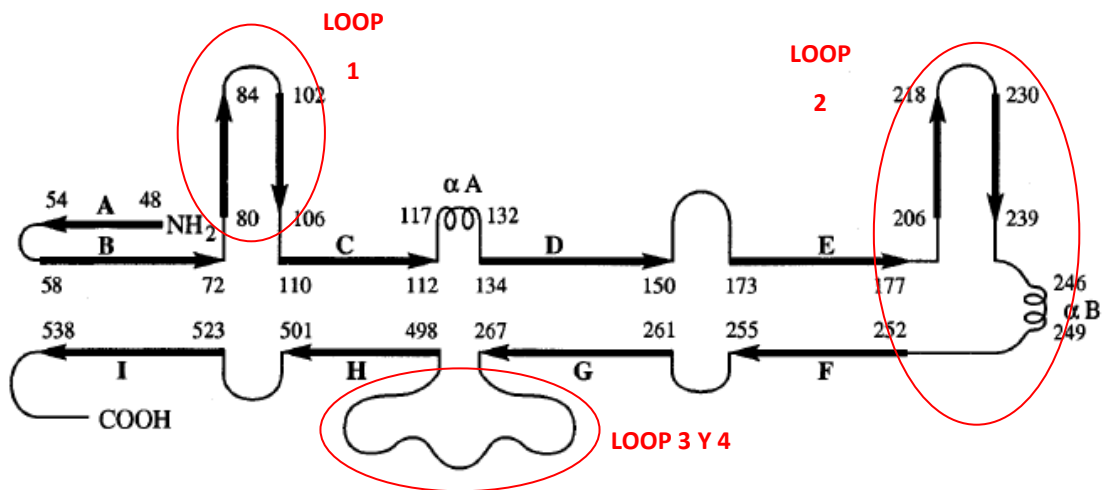


Figura 4. Esquema de la estructura secundaria de la proteína VP2. Las hebras beta principales y alfa hélices se muestran esquemáticamente como flechas y bobinas, respectivamente. Los números muestran las posiciones de algunos residuos aminoacídicos. (Tomado de Agdbanje y cols, 1995).

La arquitectura externa de la cápside presenta varias características estructurales. Cada unidad asimétrica tiene 2 elevaciones tipo espícula, que rodean los 20 ejes de simetría de 3 del icosaedro, una depresión profunda llamada el hoyuelo, en cada uno de los ejes de simetría

dobles, y un cilindro hueco rodeando a cada uno de los 12 ejes de simetría 5, el cual contiene un poro central que conecta el interior del virión con la partícula exterior (Cotmore & Tattersall, 2007)(Figura 2). El hoyuelo puede ser un sitio de unión del receptor por analogía con los picornavirus (Rossmann & Palmenberg, 1988; Rossmann, 1989). Las regiones antigénicas han sido mapeadas en las protrusiones del eje de simetría de 3 y sirven como blanco de los anticuerpos neutralizantes, mientras que las depresiones del eje de 2 han estado implicadas en la adhesión de factores de la células huésped (Nandi & Kumar, 2010). Figura 5.

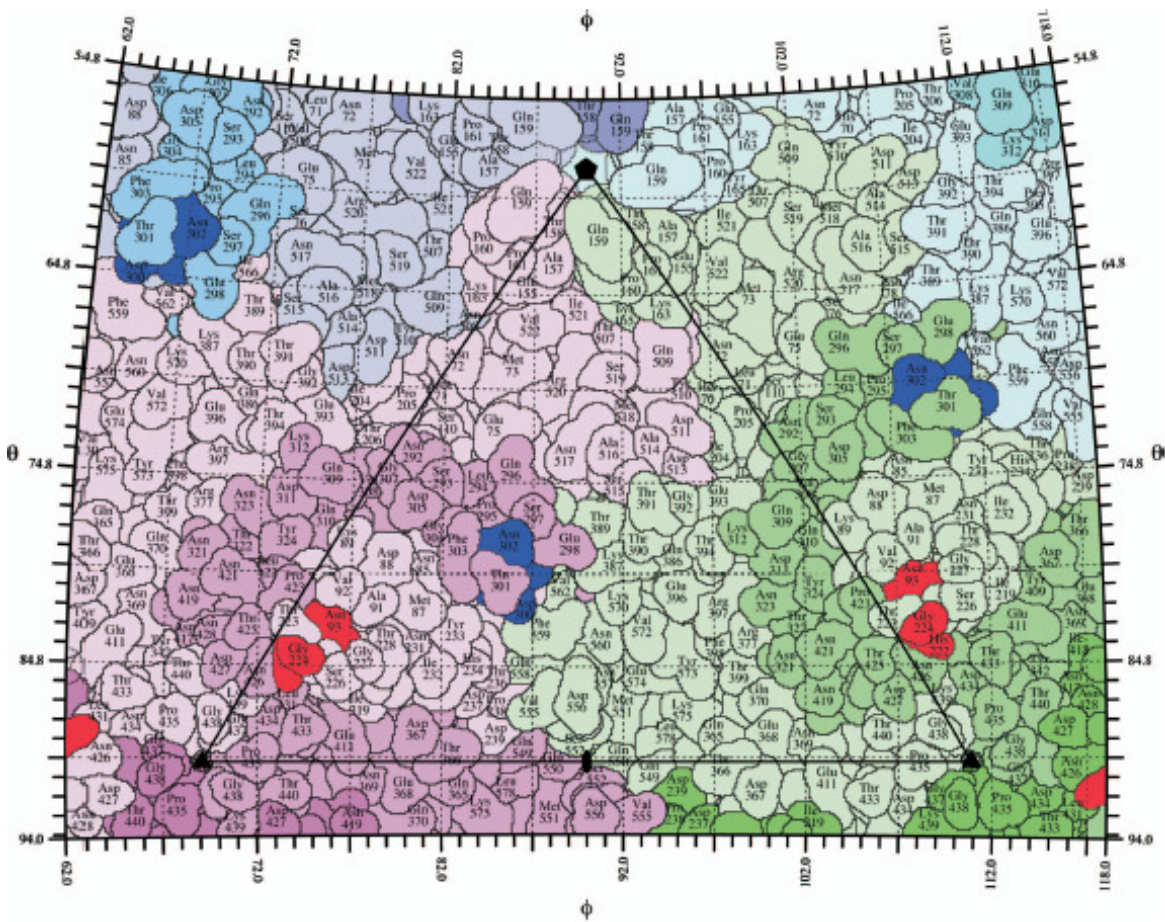


Figura 5. Mapa topográfico de una de las subunidades proteicas de la cápside viral. La superficie viral se muestra como una proyección estereográfica donde los ángulos polares ϕ and θ representan la latitud y la longitud de un punto en la superficie viral, respectivamente. La superficie del virus se representa como una colcha de aminoácidos, y la unidad asimétrica icosaédrica del virus está indicada por el límite triangular. Para visualizar las diferentes copias de la proteína de la cápside en el mapa de ruta que comprende la unidad asimétrica, las moléculas de VP2 se muestran en tonos de magenta, verde y azul. Las mutaciones de escape de los anticuerpos neutralizantes son de color rojo para el sitio A y azul oscuro para el sitio B. (Tomado de Haffestein y cols, 2009).

1.2.2.Genoma

El parvovirus canino tiene un genoma ADN simple hebra de sentido negativo de aproximadamente 5300 nucleótidos de largo, con secuencias nucleotídicas palindrómicas en forma de horquilla en ambos extremos (Paradiso y cols, 1982; Reed y cols, 1988).

Este genoma posee dos marcos abiertos de lectura (ORF); el ORF ubicado hacia el extremo 3' codifica las proteínas no estructurales, NS1 y NS2, y el ORF ubicado hacia el extremo 5' codifica las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3, a través de empalme alternativo de los ARNm virales (Reed y cols, 1988). Solamente la hebra negativa es empaquetada en la cápside. Figura 6.

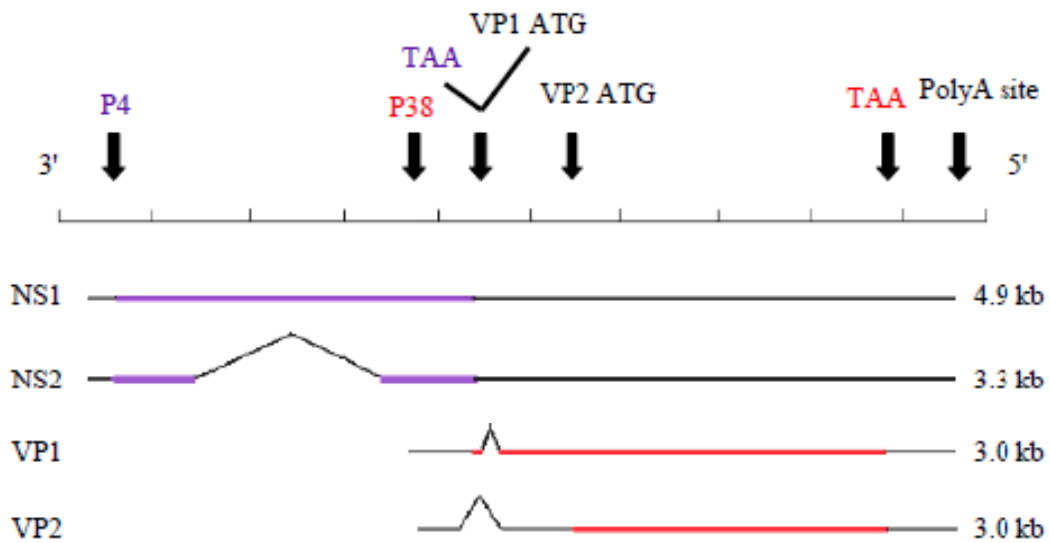


Figura 6. Mapa transcripcional del genoma de CPV. El genoma simple hebra de CPV es responsable de la producción de 5 proteínas a través de 2 ORFs. Cada ORF produce mRNAs por empalme alternativo, comparten el mismo sitio de poliadenilación, pero están controlados por diferentes promotores, P4 y P38. La quinta proteína es producida post-traduccionalmente por clivaje proteolítico en el virus ensamblado. El genoma está representado en la dirección 3' → 5'. Los tamaños de los principales mRNAs de virión se indican a la derecha, mientras que las proteínas codificadas están a la izquierda. Las líneas coloreadas representan regiones en mRNA que se traducen en proteínas (Adaptado de Reed y cols, 1988).

En ambos extremos del genoma lineal existen secuencias palindrómicas esenciales que se pueden plegar en telómeros horquilla duplex auto-cebantes, que son característicos de esta familia viral (Cotmore & Tattersall, 2007). Estos proveen la mayor parte de la información necesaria en “cis”, tanto para la replicación del ADN viral como para la encapsidación (Cotmore & Tattersall, 2007).

Una característica notoria de CPV es la presencia de 2 grupos de repetidos en tándem en el extremo 5' (Figura 7). El primer grupo (doble repetido) flanquea el codón stop del gen VP1/VP2 en el nucleótido 4538 de CPV-N (Reed y cols, 1988), y se ubica entre los nucleótidos 4514 y 4636. El otro grupo (triple repetido) se ubica a 65 nucleótidos corriente abajo del final del primer grupo y

finaliza 100 nucleótidos antes del sitio poli A, entre los nucleótidos 4701 y 4886. Se desconoce la función de ambos grupos de repetidos, pero se cree que se generaron por anomalías en la replicación y parecen ser tolerados mientras no excedan el límite para el empaquetamiento óptimo del genoma (Rhode, 1985).

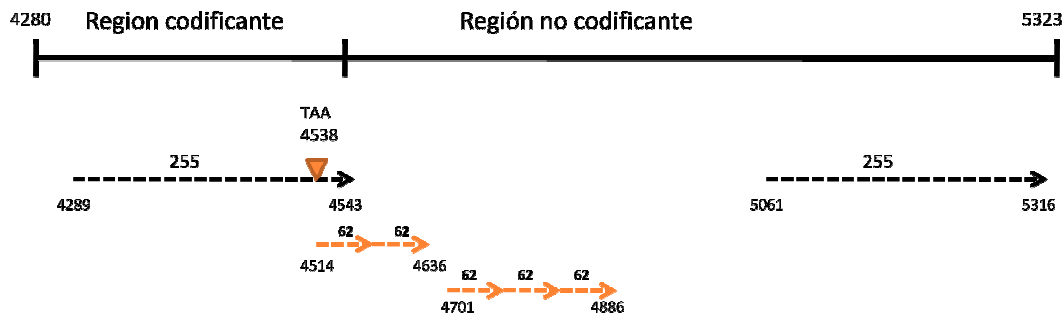


Figura 7. Esquema que muestra la posición de los repetidos dobles y triples en el extremo 5' del genoma de CPV (flechas anaranjadas). Las flechas punteadas indican repetidos de 255 pb de función desconocida al momento de la publicación. (Modificado de Reed y cols, 1988).

1.2.3. Proteínas

El parvovirus canino tiene cinco proteínas importantes que se clasifican en 2 grupos: proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y proteínas estructurales (VP1, VP2, VP3). La cápside viral, cuya función es proteger al genoma de las proteasas del huésped, se compone de 60 copias de VP2, y una pequeña cantidad de VP1 y VP3, no obstante ha sido reportado que la proteína VP2 por si sola puede ensamblar en la cápside (Cortes y cols, 1993).

La proteína **NS1** es la más grande con un tamaño de 83 KDa (Cotmore & Tattersall, 2007). También conocida como la proteína iniciadora de la replicación, es absolutamente necesaria para el crecimiento del virus en todos los tipos de células (Naeger y cols, 1990). NS1 actúa en la replicación como una proteína de unión a ADN específica de sitio dependiente de ATP con actividades de corte de ADN y helicasa, lo que permite iniciar la síntesis de ADN en secuencias de origen vírico específico mediante la introducción de un corte de cadena única específica de sitio. Esto proporciona un extremo 3' que sirve como un cebador para ciclos sucesivos de síntesis de ADN, mientras que la reacción de transesterificación que crea el corte deja a NS1 unido covalentemente al extremo 5', donde se cree que recluta moléculas NS1 adicionales para formar la helicasa replicativa 3' a 5' (Cotmore & Tattersall, 2007).

La proteína **NS2** tiene un tamaño de 25 KDa, se encuentra en el núcleo y citoplasma del huésped. Su función es menos conocida, sin embargo se ha propuesto que junto con el extremo amino terminal de VP2 están vinculadas en el egreso viral desde el núcleo (Miller y cols, 2002).

El tamaño de la proteína **VP1** es de 82.3 KDa y tiene 748 residuos aminoacídicos. Contiene la secuencia completa de VP2 más los aminoácidos que difieren de la proteína VP2 en el extremo amino. Tiene un único péptido de 15 KDa que compone varios aminoácidos básicos que son normalmente encerrados en la cápside (Saliki y cols, 1992).

En la mayoría de los parvovirus, el extremo amino terminal de VP1 cambia de interno a externo cuando se expone a algunas condiciones químicas y físicas extremas, como el calor o bajo pH, siendo la exposición inducida por calor un proceso irreversible (Vihinen-Ranta y cols, 2002). Los cambios conformacionales de la proteína VP1 de la cápside y la exposición del extremo N-terminal de VP1 juegan un rol importante en la infección viral (Fields y cols, 2013). Los viriones de CPV y MVM exponen el extremo amino de VP1 durante el tráfico endosomal, lo que también sugiere que el extremo amino de VP1 estaba inicialmente escondido en la cápside viral (McKenna y cols, 1999; Suikkanen y cols, 2003b).

El NLS es una señal de localización nuclear que asiste en la navegación de los virus hacia el núcleo, lo cual lleva a una posterior translocación nuclear. Un estudio previo identificó un NLS típico en los residuos 4-13 del extremo N-terminal de VP1 de CPV y demostró que la translocación nuclear es un proceso dependiente de ATP (Vihinen-Ranta y cols, 1997).

En la mayoría de los parvovirus, el extremo amino terminal tiene un dominio de homología PLA2 secretorio (sPLA2s) que contiene el sitio catalítico de sPLA2 y un bucle de unión a calcio conservado (Fields y cols, 2013). PLA2 es una enzima lipolítica que destruye la membrana y permite que los virus escapen de los lisosomas (Fields y cols, 2013). Además, PLA2 se localiza inicialmente en la cápside nativa pero se vuelve hacia el exterior luego de tratamiento de calor o pH (Ros y cols, 2006). En CPV se demostró que cuando se incubaba la cápside con inhibidores de PLA2, la infectividad de CPV se reducía significativamente y la permeabilidad de la membrana endosomal se cambiaba durante el período de infección, demostrando que la actividad de PLA2 es esencial para una infección efectiva (Suikkanen y cols, 2003b).

La proteína **VP2** es el principal componente de la cápside viral. Consiste de 584 aminoácidos y tiene un tamaño de 65 KDa (Langeveld y cols, 1994). Cumple una función importante en controlar la interacción entre el receptor viral con el receptor de transferrina y el sitio de unión a ácido siálico. Los principales epítopes de células T y B están mapeados en la proteína VP2. También se ha demostrado que tiene el epítipo neutralizante en el extremo amino terminal (Cortes y cols, 1993). Provee un “anti-receptor”, que interactúa con el receptor celular y lleva a la internalización del virus; el N-terminal de VP2 también coopera con VP1 para estimular el proceso de translocación nuclear (Sahna y cols, 2008).

La proteína **VP3**, con un tamaño aproximado de 63 KDa, es el menor componente de la cápside en el virión completo, pero no se encuentra en cápsides vacías (Cotmore & Tattersall, 2007). VP3 deriva de clivaje proteolítico post-traducciona l de 20 aminoácidos del extremo amino de VP2, sólo sucede cuando el genoma viral completó el ensamblaje de la cápside y el empaquetamiento, en definitiva solo ocurre en el virión maduro y con un genoma intacto (Tu y cols, 2015).

1.2.4. Ciclo replicativo

La habilidad del parvovirus canino de infectar una célula depende de la etapa del ciclo celular en que la misma se encuentre. Los parvovirus autónomos solo pueden infectar células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. El inicio de la infección viral comienza cuando el CPV se une a un receptor de transferrina (TfR) en la superficie celular (Parker y cols, 2001). A continuación, el virus es interiorizado rápidamente por la célula a través de endocitosis mediada por clatrina dependiente de dinamina (Parker & Parrish, 2000). Siguiendo a la endocitosis de vesículas recubiertas con clatrina, el complejo receptor-virus es transportado a los endosomas. Antes de que el material viral pueda alcanzar el núcleo tiene que escapar de las vesículas transportadoras (Parker & Parrish, 2000; Parker y cols, 2001; Suikkanen y cols, 2002). El extremo amino de la proteína VP1 tiene un dominio tipo fosfolipasa A2 (PLA2) cuya función, junto con el ambiente de bajo pH de las vesículas tardías endosomales/lisosomales es ayudar al virus a penetrar a través de la membrana de la vesícula. Como consecuencia la cápside es liberada al citoplasma en la región perinuclear (Suikkanen y cols, 2003b). Figura 8.

Luego de que el virus intacto es liberado al citoplasma es transportado hacia el núcleo a través de microtúbulos con ayuda de la proteína dineína. La cápside es llevada a través del citoplasma hacia la cercanía del poro nuclear. La señal de localización nuclear (NLS) en el extremo amino de VP1 (en la cápside) dirige el transporte del virus hacia el núcleo. Finalmente, el virus entra al núcleo vía el complejo de poro nuclear. Algunos estudios sugieren que el CPV es lo suficientemente pequeño para pasar intacto a través del poro nuclear (Vihinen-Ranta y cols, 2000; Suikkanen y cols, 2003b).

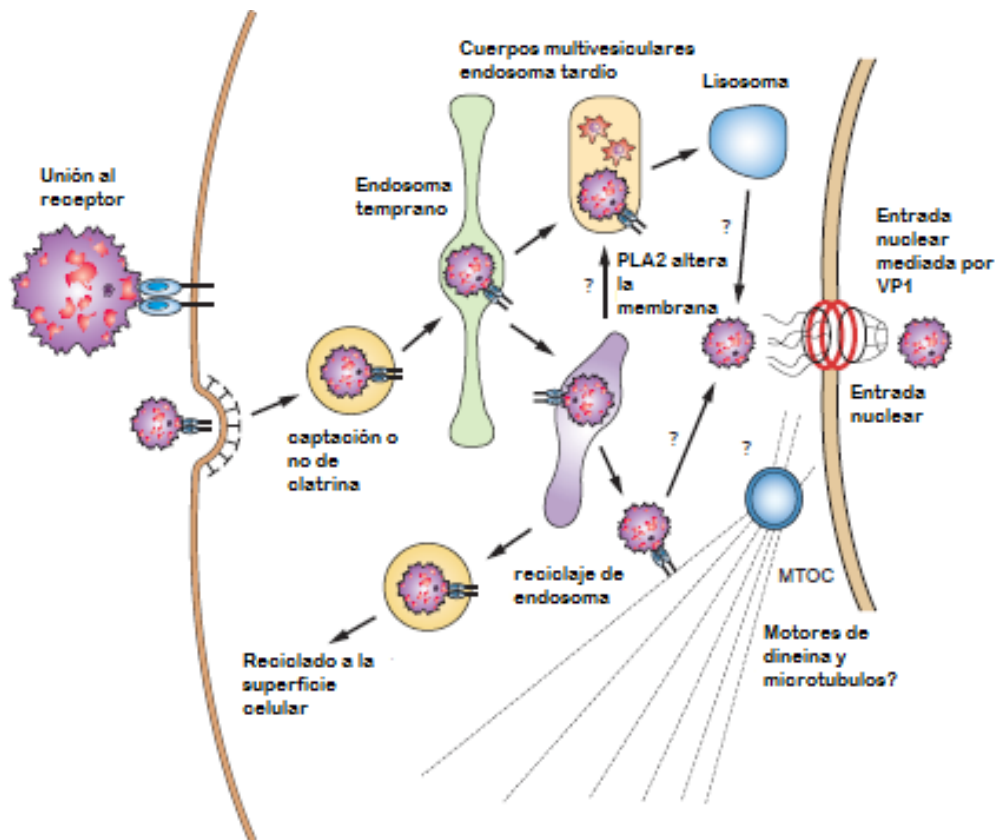


Figura 8. Resumen general de las vías de infección conocidas de cápsides virales. Desde la superficie celular al núcleo, se ejemplifica para el parvovirus canino que se une al receptor de transferrina y que es absorbido por endocitosis mediada por clatrina. Los pasos posteriores de la vía, incluyendo la clasificación del sistema endosomal de la célula, y el tráfico dentro del citoplasma y en el núcleo pueden variar entre los virus y aún no están completamente definidos. (Tomado de Fields 6^{ta} edición, Fields y cols, 2013).

La replicación del ADN viral y el ensamblaje de la cápside tienen lugar en el núcleo y requieren de la fase S del ciclo celular de la célula huésped, puesto que el ADN viral necesita de la maquinaria de replicación de la célula anfitriona ya que el virus no codifica una enzima que realice esta función.

En la figura 9 se muestra el modelo actual de la replicación de ADN de virus autónomos de roedores. Una horquilla formada por el palíndromo en el extremo 3' del genoma viral sirve como cebador para la síntesis de la hebra complementaria (véase el paso 1, figura 9). La hebra alargada se une covalentemente a la forma de horquilla del extremo 5' del molde para formar un modelo dúplex lineal covalentemente entrecruzado en ambos extremos mediante horquillas de ADN (véase el paso 2, figura 9). La horquilla formada en el extremo derecho es cortada en la cadena recientemente sintetizada por NS1 en un sitio 18 nucleótidos aguas abajo del extremo 5' original, y NS1 queda unido covalentemente al extremo 5' formado por la muesca. El 3'OH permite la síntesis de reparación para llenar el hueco en el extremo 3' de la hebra recientemente sintetizada de modo que el extremo derecho del intermediario es ahora una forma doble hebra del

palíndromo 5' original con NS1 unido covalentemente al extremo 5' de la hebra parental. El extremo 5' restaurado es 18 nucleótidos más largo que el extremo 5' del ADN del virión (paso 4, figura 9). La forma extendida del extremo derecho de la secuencia palindrómica se desnaturaliza de manera que ambas hebras pueden formar horquillas (véase el paso 5, figura 9), y el 3'OH al final de la horquilla en la cadena de progenie inicia la síntesis de ADN que se extiende a través de ambos para formar una estructura dimérica dúplex lineal (véase el paso 7, figura 9). La secuencia palindrómica del extremo izquierdo está ahora en una forma lineal bicatenaria en el centro del dímero intermedio (puente dímero), con la secuencia GAA de la burbuja presente en la horquilla del palíndromo del extremo izquierdo en el lado izquierdo del puente dímero y la secuencia de GA a la derecha, y esas secuencias determinan la generación de hilos de ADN de virión.

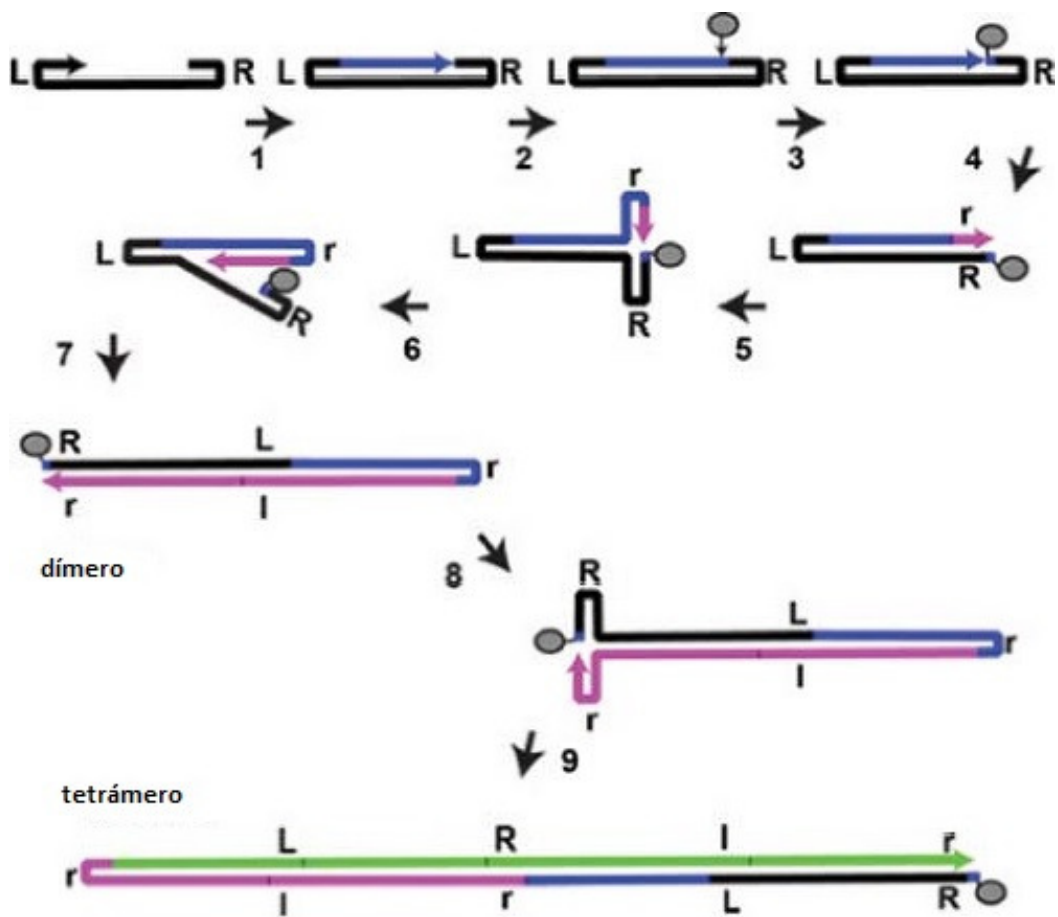


Figura 9. Ciclo de replicación del ADN de parvovirus autónomos, basado en el modelo de horquilla rodante para el virus minuto de los ratones (MVM). El genoma viral está representado por una línea continua (negro para el genoma original y diferentes colores para los ADN recién sintetizados); el extremo 3' se indica mediante una punta de flecha. Las letras L y R representan las secuencias palindrómicas del extremo izquierdo y del extremo derecho, respectivamente. Las mayúsculas y minúsculas representan las versiones "flip" y "flop" de las secuencias, que son complementos invertidos entre sí. (Tomado de Fields, 6^{ta} edición, Fields y cols, 2013).

La síntesis de las proteínas NS parece ocurrir en primer lugar, porque los transcritos de la proteína NS aparecen más temprano en el curso de la infección que los transcritos para las proteínas estructurales y porque una o ambas proteínas NS regulan la expresión génica.

Una vez traducidas en el citoplasma, las proteínas migran al núcleo para participar en el ensamblaje de las nuevas partículas virales. Los viriones emergen de la célula lisándola, lo que conduce al efecto citopático observado por las células infectadas por este virus.

1.3. ORIGEN Y EMERGENCIA VIRAL

El CPV-2 surgió como un nuevo virus en perros domésticos en los años 70. Causó una pandemia y se diseminó por Asia, Australia, Nueva Zelanda, las Américas y Europa a principios de 1978 (Parrish y cols, 1988b; Parrish, 1999). Fue nombrado como CPV-2 para diferenciarlo del Virus diminuto de los caninos (*Minute virus of canine-MVC*) o también conocido como CPV tipo 1 (CPV-1) (Carmichael y cols, 1994). Las estimaciones del reloj molecular y los estudios filogenéticos indicaron que el CPV-2 probablemente emergió varios años antes de propagarse globalmente en perros en 1978 y 1979 (Parrish y cols, 1988b; Shackelton y cols, 2005; Hoelzer y cols, 2008b). Un grupo de investigadores describió anticuerpos neutralizantes de CPV-2 en sueros de perros en Grecia en 1974 (Koptopoulos y cols, 1986), mientras que los primeros sueros positivos en los EE.UU. y Australia se informaron a principios de 1978 (Parrish, 1999). Desde ese año, el virus ha sido omnipresente en perros en todo el mundo (Parrish, 1999).

Las relaciones filogenéticas entre los aislamientos de CPV-2 de perros, y los virus de gatos (FPV), visón (MEV), mapache (RPV), perro mapache (parvovirus de perro mapache, RDPV) y zorro azul (parvovirus del zorro azul), mostraron que todos los CPVs derivaron de un solo ancestro común, y que las cepas de perros eran en su mayoría similares a los virus de diferentes animales silvestres, incluyendo mapaches y zorros (Allison y cols, 2012, 2013). Se demostró que el CPV estaba relacionado con un virus similar al FPV reconocido durante mucho tiempo, pero probablemente no de los gatos (Truyen, 2006). El CPV-2 probablemente surgió cuando adquirió mutaciones que le permitieron la unión al receptor de transferrina canina (TfR) tipo 1 (Truyen, 1996; Shackelton y cols, 2005; Allison y cols, 2012). Varios estudios han demostrado que el TfR desempeña un papel clave en la susceptibilidad de las células a la infección por estos virus (Hueffer & Parrish, 2003; Palermo y cols, 2006).

CPV y FPV son más del 98% idénticos en la secuencia de ADN, pero tienen rangos de huésped específicos, propiedades antigénicas y de hemoaglutinación (HA) que están controladas por el gen de la proteína de la cápside (Chang y cols, 1992; Truyen y cols, 1995; Shackelton y cols,

2005). La exitosa transferencia viral entre especies y la adaptación al nuevo huésped canino implicaron pocos cambios de aminoácidos alrededor de la espícula del eje triple (Truyen y cols, 1995). Dichos cambios genómicos fueron suficientes para que el CPV-2 adquiriera el rango de hospedador canino, pero perdió la capacidad de replicarse en el huésped felino (Truyen & Parrish, 1992). Tres diferencias en los residuos de VP2, 93, 103 y 323 entre FPV y CPV-2 podrían definir el rango de huésped canino (Chang y cols, 1992; Truyen y cols, 1995) ver tabla 1. Los cambios de los residuos aminoacídicos 80, 564 y 568 se asociaron a la pérdida de capacidad de replicarse en gatos (Truyen y cols, 1994) (Figura 10). Los residuos 232 y 375 también cambiaron entre las secuencias FPV y CPV-2, sin embargo, la variación del residuo 375 se encontró sólo en algunos aislamientos de la cepa original de CPV-2, y en variantes posteriores de CPV, el residuo revirtió a Asp, lo que sugiere que 375Asn no es crítico para el éxito de CPV en la naturaleza. Sin embargo, el residuo 375 de VP2, está situado en el eje triple junto con 323 determinando la dependencia del pH de HA (Parrish, 1991; Parrish y cols, 1991; Chang y cols, 1992). Otra diferencia importante entre estos dos parvovirus carnívoros es que el CPV evoluciona mucho más rápido que FPV (Decaro y cols, 2008b; Decaro y cols, 2009a) mostrando tasas de sustitución genómica similares a las de los virus ARN, con valores de alrededor de 10^{-4} sustituciones por sitio por año (Shackelton y cols, 2005).

Tabla 1. Variación de aminoácidos en la proteína VP2 de parvovirus felino y caninos (Decaro & Buonavoglia, 2012).

Residuo aminoacídico	80	87	93	101	103	232	297	300	305	323	375	426	555	564	568
Posición nucleotídica	3024-3026	3045-3047	3063-3065	3087-3089	3093-3095	3480-3482	3675-3677	3684-3686	3699-3701	3753-3755	3909-3911	4062-4064	4449-4451	4476-4478	4488-4490
Codón	AAA (Lys) AGA (Arg)	ATG (Met) TTG (Leu)	AAA (Lys) AAC (Asn) AAT (Asn)	ATT (Ile) ACT (Thr)	GUA (Val) GCA (Ala)	GTA (Val) ATA (Ile)	TCT (Ser) GCT (Ala)	GCT (Ala) GGT (Gly)	GAT (Asp) TAT (Tyr)	GAC (Asp) AAC (Asn)	AAT (Asn) GAT (Asp) GAA (Glu)	AAT (Asn) GAT (Asp) GAA (Glu)	GTA (Val) ATA (Ile)	AAT (Asn) AGT (Ser)	GCT (Ala) GGT (Gly)
FPV	Lys	Met	Lys	Ile	Val	Val	Ser	Ala	Asp	Asp	Asp	Asn	Val	Asn	Ala
CPV-2	Arg	Met	Asn	Ile	Ala	Ile	Ser	Ala	Asp	Asn	Asn	Asn	Val	Ser	Gly
CPV-2^a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Ile	Ser	Gly
CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ser	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
New CPV-2^a	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Ser	Gly
New CPV-2b	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Asp	Val	Ser	Gly
Asp-300 (2a/2b)	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn(2a) Asp(2b)	Val	Ser	Gly
CPV-2c	Arg	Leu	Asn	Thr	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Ser	Gly

1.3.1. Emergencia de las variantes antigénicas de CPV-2.

La circulación activa del virus y los programas iniciales de vacunación ayudaron a desarrollar la inmunidad de rebaño en las poblaciones caninas, lo que redujo considerablemente la mortalidad y la propagación del virus. Sin embargo, la presión de la inmunidad del huésped puede haber contribuido también a la aparición progresiva de variantes antigénicas de CPV-2. En los años 80', surgieron 2 variantes antigénicas distinguibles utilizando anticuerpos monoclonales que se denominaron CPV tipo 2a (CPV-2a) y 2b (CPV-2b).

En 1980, en USA, Japón, Bélgica, Australia, Francia y Dinamarca, el CPV-2 fue rápidamente desplazado por la variante antigénica y genética CPV 2a (Parrish y cols, 1988b). El reemplazo global natural de CPV-2 por CPV-2a durante un período de 2-3 años indica que CPV-2a tiene una fuerte ventaja epidemiológica sobre CPV-2 (Parrish y cols, 1988b). También se observó que el CPV-2a y sus derivados habían recuperado la capacidad de infectar a los gatos, y además se convirtió en el virus más común en muchos otros carnívoros (Truyen, 1996).

La variante CPV-2b fue detectada por primera vez en 1984 en USA (Parrish y cols, 1991). CPV-2a y CPV-2b difieren de la cepa original CPV-2 en 5 ó 6 residuos aminoacídicos en la proteína de cápside VP2 (tabla 1). Por el contrario, solo 2 residuos aminoacídicos diferencian CPV-2a de CPV-2b, Asn426Asp e Ile555Val (Truyen, 2006). El residuo 426 se sitúa en el sitio antigénico principal (epítotope A) sobre la punta en el eje de simetría 3 de la cápside y la mutación de Asn-426 a Asp diferencia a CPV-2b no solo de CPV-2 y CPV-2a sino también del parvovirus felino (FPV) y del virus de la enteritis del visón (MEV). Por el contrario, el residuo 555 se encuentra en un sitio antigénico menor y la mutación de Ile555Val representa una reversión o una retención de la secuencia del tipo 2 original (Parrish y cols, 1991; Strassheim y cols, 1994).

Una nueva variante antigénica fue reportada en Italia en el año 2001 (Buonavoglia y cols, 2001), mediante el análisis de la secuencia del gen VP2. Sin embargo, luego se reportó que la cepa CPV-2c circuló en Alemania 4 años antes a su detección en Italia (Decaro y cols, 2007). Se encontraron en 2 cepas de CPV aisladas en perros con gastroenteritis hemorrágica, 2 variaciones en los aminoácidos Ser297Ala y Asp426Glu, con respecto al tipo 2b del CPV clásico. El cambio en el residuo 297 es compartido por muchos de los tipos 2a y 2b de los CPVs circulantes actualmente (Truyen, 2006) (referidos como nuevos CPV 2a y 2b en tabla 1) y afecta a un residuo antigénico cercano al epítotope B, en cambio la sustitución Asp426Glu no ha sido observada previamente.

Posteriormente, los virus compartiendo esta mutación inusual, primeramente llamados mutantes Glu-426 y actualmente referidos como CPV-2c fueron detectados con alta frecuencia en Italia (Martella y cols, 2004), exhibiendo un aumento progresivo en su distribución y contándose

en un 60% de los CPVs detectados en 2004 (Martella y cols, 2005). Este nuevo mutante fue detectado luego en Vietnam (Nakamura y cols, 2004), España (Decaro y cols, 2006), USA (Hong y cols, 2007), Portugal, Alemania, Reino Unido (Decaro y cols, 2007) y Uruguay (Pérez y cols, 2007).

En resumen, las diferencias antigénicas entre las tres variantes están asociadas con cambios en el residuo 426 (Asn en CPV-2a, Asp en CPV-2b y Glu en CPV-2c), el principal sitio antigénico de CPV. Ver Figura 10.

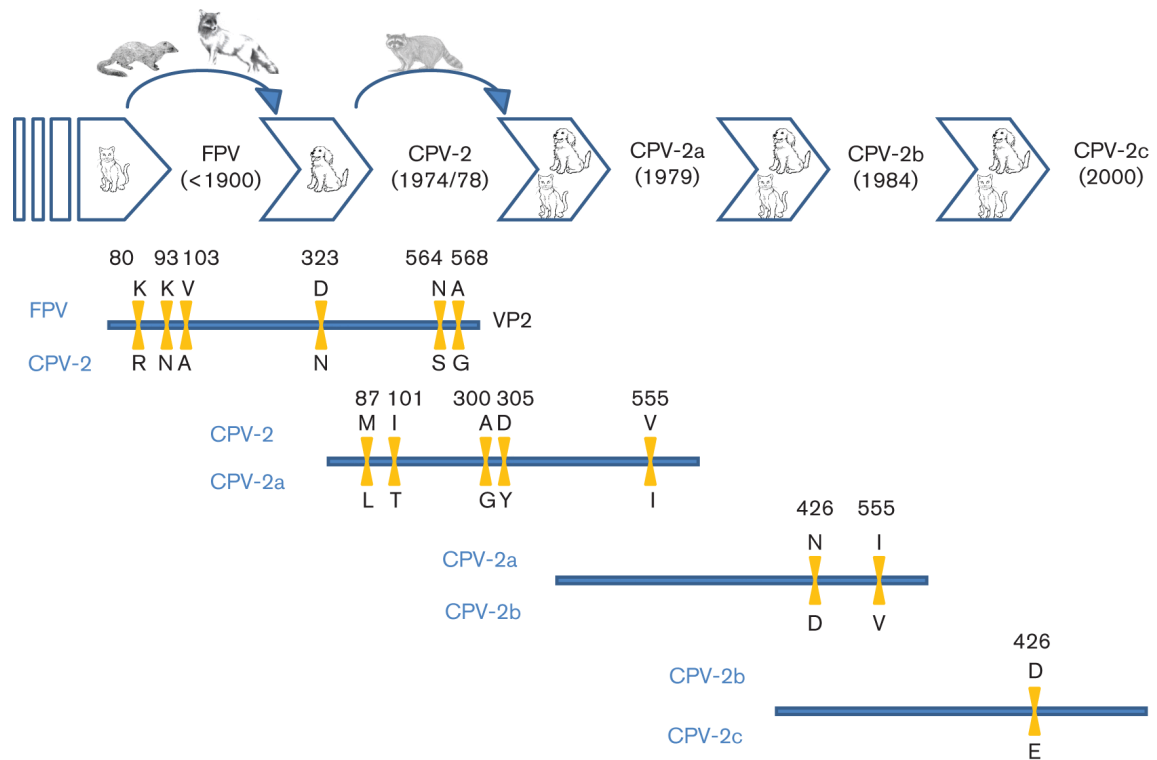


Figura 10. Proceso evolutivo del CPV-2 en perros. Designación de las variantes antigénicas de CPV-2 y FPV basadas en sitios antigénicos principales que ocurren en la proteína de la cápsida VP2. Las posiciones de aminoácidos se basaron en la secuencia de referencia con el número de acceso M24004 (FPV-b), M23255 (CPV-d), M24000 (CPV-31), M74849 (CPV-39) y FJ005196 (G7). (Tomado de Miranda & Thompson, 2016b).

1.3.2. Distribución mundial de las variantes antigénicas

La distribución geográfica actual de las variantes antigénicas de CPV a nivel mundial es heterogénea. En un trabajo del año 2007 en Estados Unidos se reportó el predominio de la variante CPV-2b, seguido de CPV-2c y CPV-2a (Hong y cols, 2007). En México, solo se ha tipificado CPV-2c (Pedroza-Roldan y cols, 2015; Faz y cols., 2018). Las tres variantes circulan en América del Sur con una mayor frecuencia de CPV-2c en Ecuador (Aldaz y cols, 2013), Argentina (Gallo Calderón y cols, 2015), Brasil (Pinto y cols, 2012; de Oliveira y cols, 2018) y Uruguay (Pérez y cols, 2007).

En Uruguay la variante CPV-2c predominó entre los años 2006 y 2009 y fue reemplazada en los años 2010 y 2011 por la variante CPV-2a con una prevalencia de 38 y 85 % respectivamente a cada año. La presencia de dicha variante CPV-2a fue consecuencia de la invasión de una cepa extranjera, dado que no estaba relacionada filogenéticamente con cepas de América del Sur ni del Norte, pero en cambio era idéntica a cepas asiáticas aisladas en ese momento (Maya y cols, 2013).

En Nueva Zelanda, se reportó como variante predominante a CPV-2a con una prevalencia de 98,5% respecto a la cepa original CPV-2 detectada en una pequeña proporción (1.5%) (Ohneiser y cols, 2015).

En Japón, la cepa mas prevalente es la CPV-2b seguida de la cepa CPV-2a a una menor frecuencia (Soma y cols, 2013). En Taiwan, se reportó una co-circulación de CPV-2a y 2b a igual tasa (Lin y cols, 2014). En China y Corea, la variante predominante es la CPV-2a, seguida por CPV-2b (Jeoung y cols, 2008; Yi y cols, 2016) y en el noreste de China se ha identificado recientemente la circulación de CPV-2c (Geng y cols, 2015). En India, se identificaron las tres variantes con predominio de CPV-2b (Nandi y cols, 2010). Mientras que en un estudio reciente no se encontró a la variante CPV-2c (Mittal y cols, 2014).

En los países europeos se ha reportado el predominio de la variante CPV-2a, en Bulgaria (Filipov y cols, 2011), Italia, Reino Unido, España, Alemania, Francia, Bélgica y Hungría, seguido por CPV-2c y CPV-2b (Decaro y cols, 2007). Mientras que en Portugal, la variante predominante fue la CPV-2c, seguido de CPV-2b y CPV-2a en menor proporción (Miranda y cols, 2016a).

Existen pocos reportes sobre la distribución de las variantes de CPV en el continente africano. Mientras que tanto CPV-2a como CPV-2b fueron detectados en Sudáfrica y Namibia (Steinel y cols, 1998; Dogonyaro y cols, 2013), y en Nigeria solo CPV-2a fue reportada (Dogonyaro y cols, 2013). En Túnez, se encontró que las tres variantes circulan aproximadamente con igual frecuencia (Touihri y cols, 2009). En Marruecos, fue reportada la co-circulación de CPV-2b y CPV-2c (Amrani y cols, 2016) en los últimos 5 años. Recientemente se detectaron las 3 variantes en Zambia con el predominio de la variante CPV-2c (Kapiya y cols, 2018).

En la figura 11 se observa la distribución geográfica mundial reportada de cada una de las 3 variantes de CPV-2 en perros domésticos.

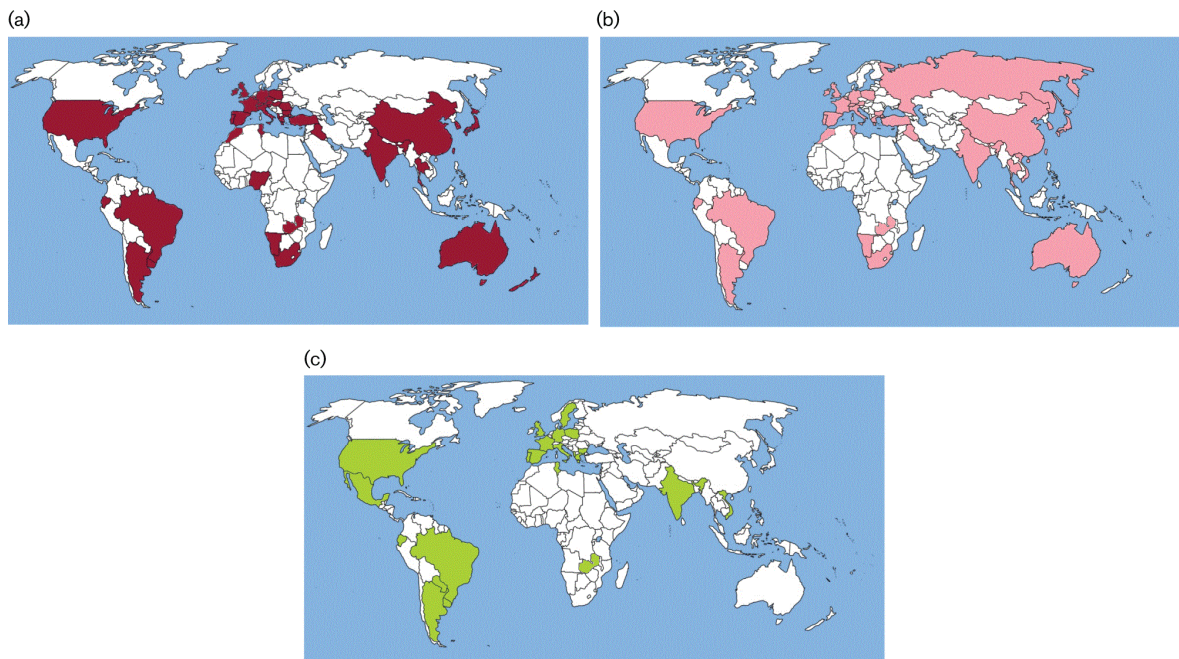


Figura 11. Distribución mundial de las variantes de CPV-2 en perros domésticos. Rojo: presencia de variante CPV-2a; rosado: presencia de variante CPV-2b; verde: presencia de variante CPV-2c. (Modificado de Miranda & Thompson, 2016b).

1.4. RANGO DE HUESPED

Animales domésticos

Las pocas diferencias de aminoácidos entre FPV, CPV-2 y CPV-2a/b parecen haber alterado las características antigénicas del virus y han modificado importantes propiedades biológicas, tales como el rango de huésped *in vivo* e *in vitro* (Pollock & Carmichael, 1983a; Truyen & Parrish, 1992; Truyen y cols, 1996), las interacciones con el receptor celular, la proteína transferrina (Parker y cols, 2001; Hueffer & Parrish, 2003), y la virulencia. La emergencia de CPV-2 desde un virus similar a FPV probablemente se debe a que el virus ganó la capacidad de unirse al receptor de la transferrina canina, el receptor de CPV en células caninas (Parker y cols, 2001). En varios estudios hechos por el grupo del Dr. Colin Parrish este receptor ha sido estudiado en detalle, demostrando que las estructuras del virus que han sido definidas previamente por determinar el rango de huésped y la antigenicidad, también influyen la unión al receptor (Hueffer y cols, 2003). El receptor de transferrina es expresado con alta densidad en células en activa división, y esto ayuda a explicar la patogénesis particular de la infección por parvovirus y su necesidad de tejidos activos mitóticamente (Parrish, 1995; Hueffer y cols, 2003). Los nuevos tipos antigénicos CPV-2a y CPV-2b fueron obviamente seleccionados como resultado de su mejorada unión a receptor, ya que se vio que estos tipos se unen al receptor más eficazmente que el virus original CPV-2 (Hueffer & Parrish, 2003).

El virus de la panleucopenia felina replica en células felinas *in vitro* y en gatos *in vivo*, pero no replica en células caninas *in vitro* y exhibe solo una replicación limitada en perros *in vivo* (Chang y cols, 1992; Truyen & Parrish, 1992). Esto se debe a que el FPV no se puede unir al TfR canino, en particular debido a un único sitio de glicosilación presente en el TfR canino (Chang y cols, 1992; Parker y cols, 2001; Hueffer y cols, 2003).

Por el otro lado, CPV-2 replica en células caninas y felinas *in vitro*, pero la replicación *in vivo* se restringe a caninos (Truyen & Parrish, 1992). Los nuevos tipos antigénicos (2a y 2b), en contraste, replican en gatos, y luego de la infección experimental, pueden inducir aun enfermedad clínica (Mochizuki y cols, 1996; Truyen y cols, 1996).

Animales silvestres

Los parvovirus son extremadamente estables en el ambiente y es probable que la transmisión indirecta (por exposición oro-nasal a superficies contaminadas) juegue un papel importante en la transmisión y el mantenimiento del los virus en una población, particularmente en poblaciones de carnívoros salvajes que pueden caracterizarse por bajas tasas de contacto entre animales. Para la transmisión del parvovirus canino entre carnívoros domésticos y silvestres se ha propuesto la transmisión directa (por ruta fecal-oral) a través del contacto cercano o la predación de carnívoros más pequeños, los virus probablemente se transmiten fácilmente a través de largas distancias mediante fómites (Hoelzer & Parrish, 2010).

La infección por CPV se ha demostrado en las familias *Canidae*, *Felidae*, *Procyonidae* y *Mustelidae* (Steinel y cols, 2001) los cuales se resumen en la Tabla 2. Sin embargo, varios estudios informaron la detección de CPV en otros carnívoros silvestres mediante análisis serológico (Santos y cols, 2009; Woodroffe y cols, 2012) y, en consecuencia, no hay secuencias disponibles en la base de datos GenBank.

El residuo 300 es importante para distinguir la antigenicidad y el rango de hospedadores entre parvovirus, pero puede variar entre los aislados de CPV (Qin y cols, 2007). Este residuo aminoacídico es una Alanina en FPV, CPV-2 y los virus de mapache similares a FPV, pero es una Glicina en todos los CPV-2a derivados de virus de perros. Sin embargo, se ha visto el residuo Aspartato en esta posición en todos los aislados de mapache derivados de CPV, independientemente de su posición en la filogenia (Allison y cols, 2012) y también se encontró una Asparagina en el gato leopardo vietnamita (Ikeda y cols, 2000). Chen y colaboradores mostraron que los aislamientos del RDPV y el parvovirus de la civeta de la palma enmascarado (MCPV) eran antigénicamente similares a CPV-2a, pero tenían un cambio en Gly300Ser (Chen y cols, 2011). La mutación Gly300Ser habría contribuido a la adaptación de CPV-2a a perros

mapaches (*Nyctereutes procyonoides*) y civetas de palma enmascaradas (*Paguma larvata*). Además, el MCPV tuvo un cambio en Thr301Ala en la proteína VP2. El residuo 301, después del residuo 300, se localiza en el bucle 3 en los extremos del eje de simetría triple en la superficie viral. Por lo tanto, sus cambios también podrían afectar la antigenicidad y el rango de hospedero del CPV (Chen y cols, 2011). Otra evidencia de la evolución continua del CPV fue la identificación de la mutación puntual Gln370Arg en el gen VP2 de un panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) clasificado como CPV-2a (Guo y cols, 2013). Todas las variantes han tenido éxito en la recuperación del huésped felino/ carnívoro y se pueden esperar nuevas mutaciones genómicas en el futuro (Steinel y cols, 1998).

Tabla 2. Especie y familia taxonómica de carnívoros silvestres infectados por variantes de CPV, de acuerdo a las referencias analizadas. (Tomado de Miranda & Thompson, 2016b).

Familia	Especie	Nombre común	Variante de CPV
Canidae	<i>Canis lupus</i>	Lobo gris	2a, 2b, 2c
	<i>Otocyon megalotis</i>	Zorro de orejas de murciélago	2b
	<i>Vulpes vulpes</i>	zorro rojo	2a
	<i>Canis latrans</i>	Coyote	2b, 2c
	<i>Nyctereutes procyonoides</i>	Perro mapache	2a
Felidae	<i>Acinonyx jubatus</i>	Leopardo cazador	2b
	<i>Panthera tigris altaica</i>	Tigre siberiano	2c
	<i>Felis bengalensis</i>	Gato leopardo	2a, 2b, 2c
	<i>Puma concolor</i>	Puma	2b, 2c
	<i>Lynx rufus</i>	Gato montés	2a, 2c
Viverridae	<i>Paguma larvata</i>	Civeta de palma enmascarada	2a
Mustelidae	<i>Martes foina</i>	Marta de piedra	2a, 2b
	<i>Aonyx cinerea</i>	Nutrias de garras pequeñas asiáticas	2c
Ailuridae	<i>Ailurus fulgens</i>	Panda rojo	2a
Ursidae	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Panda gigante	2a
Procyonidae	<i>Procyon lotor</i>	Mapache	2a, 2b

Steinel y colaboradores informaron la detección de ADN viral de CPV-2b en seis guepardos (*Acinonyx jubatus*) de Namibia y Estados Unidos y, en un zorro de orejas de murciélago (*Otocyon megalotis*) de Namibia (Steinel y cols, 2000). La secuencia CPV-2a también se encontró en la muestra fecal del tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*) de un zoológico alemán. La muy alta prevalencia de infecciones por CPV-2a / 2b en estos gatos grandes en comparación con los gatos domésticos puede sugerir una mayor susceptibilidad de estas especies para estos tipos de virus (Steinel y cols, 2000). Un aislamiento de una marta de piedra (*Martes foina*) recogida en Portugal

reveló la presencia de CPV-2b (Duarte y cols, 2013), mientras que una variedad de marta de piedra CPV-2a fue referida por Steinel y colaboradores (Steinel y cols, 2001). En Italia, cuatro aislamientos de lobos analizados por Battilani y colaboradores (Battilani y cols, 2001) fueron identificados antigénicamente y genéticamente como CPV-2b. El análisis filogenético de varios animales no domésticos, como mapache (*Procyon lotor*), coyote (*Canis latrans*), lobo gris (*Canis lupus baileyi / nubilus / occidentalis*), puma (*Puma concolor*), zorrillo rayado (*Mephitis mephitis*) y lince (*Lynx rufus*) (Allison y cols, 2012, 2013) reveló la presencia de las tres variantes de CPV. Un estudio reciente de Filipov y colaboradores (Filipov y cols, 2016) detectaron dos parvovirus salvajes carnívoros positivos, un lobo (*Canis lupus*) y un zorro rojo (*Vulpes vulpes*), ambos infectados por cepas de CPV-2a. También se realizó un diagnóstico de CPV-2c en un grupo de nutrias de garras pequeñas asiáticas (*Aonyx cinerea*) (Gjeltema y cols, 2015).

En Brasil, se ha reportado la exposición a parvovirus de zorros cangrejeros, lobos de crin, mapaches, tigrina (*Leopardus tigrina*), ocelotes, pumas y marsupiales (*Speothos venaticus*) que viven en libertad (Filoni y cols, 2006; de Almeida Curi y cols, 2010, 2012). Sin embargo no existe prácticamente información a nivel molecular.

1.5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

Como se comentó anteriormente, el parvovirus canino se propaga rápidamente en las poblaciones caninas por la ruta fecal-oral o por exposición a superficies contaminadas. La excreción fecal se produce 3 días post inoculación experimental y el virus continúa excretándose en las heces por 3-4 semanas después de la enfermedad clínica o subclínica (Goddard & Leisewitz, 2010).

Al entrar en el cuerpo, el virus afecta principalmente tejidos mitóticamente activos, tales como los tejidos linfoides, el epitelio intestinal y la médula ósea, así como el corazón en cachorros neonatales (figura 12). Después de un período de incubación de 3-7 días, la enfermedad puede caracterizarse por dos formas clínicas: la forma entérica, que comprende vómitos, diarrea hemorrágica, depresión, pérdida de apetito, fiebre y deshidratación en perros más jóvenes (Carman & Povey, 1985; Parrish, 1995; Hoelzer y cols, 2008a), o la miocarditis, que se puede observar después de la infección de los cachorros neonatales, donde los signos clínicos se ven varias semanas después de la infección (Meunier y cols, 1984; Sime y cols, 2015). La infección por parvovirus canino también se caracteriza por una disminución de los recuentos de glóbulos blancos como resultado de la infección de la médula ósea y otros tejidos linfoides (Appel y cols, 1979).

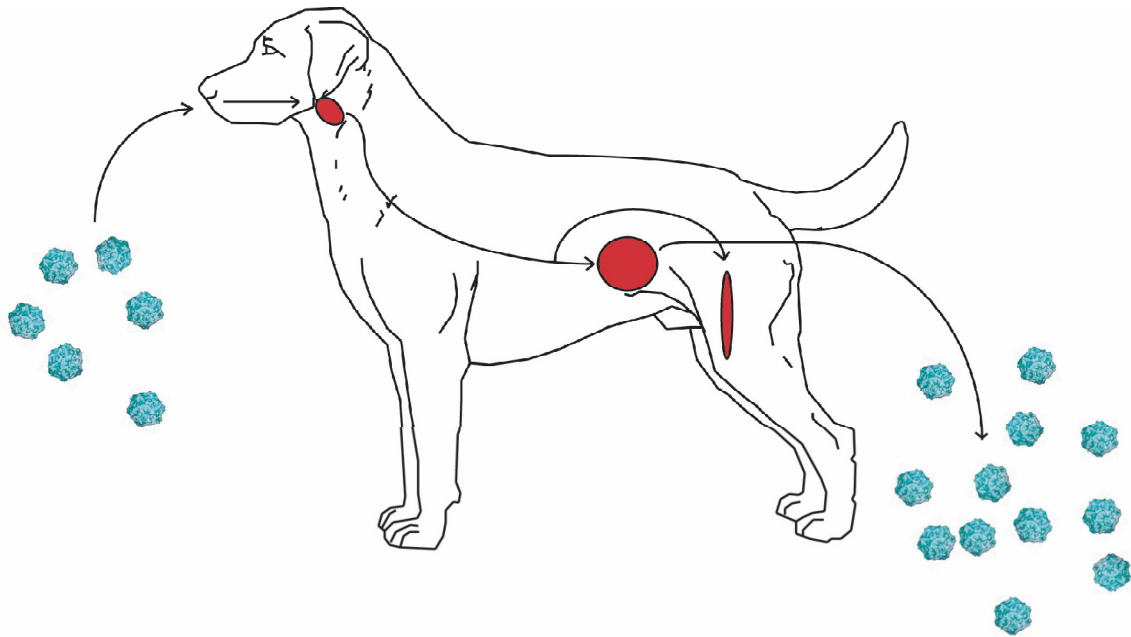


Figura 12. Patogénesis de CPV. Debido a la necesidad de células en activa división, el CPV a menudo afecta primero las amígdalas. Después de unos días, el virus se extiende al intestino delgado y la médula ósea, sitios donde se encuentran un gran número de células en división. La infección de la médula ósea conduce a la reducción en el número de linfocitos, mientras que las consecuencias de la infección intestinal incluyen la destrucción del revestimiento intestinal y, por tanto, la diarrea y el vómito. Por último, el CPV se propaga al medio ambiente a través de las heces del animal infectado. (Tomado de Laurila, 2007).

La forma clínica más característica de CPV es la diarrea hemorrágica, cuya extensión depende a menudo de los anticuerpos maternos de los cachorros en el momento de infección. Los perros infectados con parvovirus generalmente mueren por la deshidratación o infección secundaria más que por el propio virus. A menudo se detectan infecciones subclínicas o inaparentes, principalmente en cachorros con títulos de anticuerpos maternos intermedios y en perros adultos (Decaro y cols, 2005c). Las tasas de mortalidad pueden ser muy altas en cachorros (hasta 70%), pero usualmente son menores a 1% en perros adultos (Decaro & Buonavoglia, 2012).

La enteritis hemorrágica del intestino delgado, la ampliación de los ganglios linfáticos mesentéricos y los parches de Peyer son las principales lesiones macroscópicas observadas en los perros que mueren como consecuencia de la infección por CPV. Histopatológicamente, el intestino delgado se ve afectado por la necrosis de criptas multifocal y cuerpos de inclusión intranuclear, mientras que el agotamiento extenso de linfocitos se observa en parches de Peyer, ganglios linfáticos, bazo y timo (Decaro & Buonavoglia, 2012).

La enfermedad se caracteriza por un curso clínico rápido con la muerte que a menudo puede ocurrir 2-3 días después de la aparición de signos en huéspedes no protegidos (Carman & Povey, 1985; Parrish, 1995). El tratamiento puede ser costoso, por lo que el reconocimiento

temprano de los perros que requieren terapia agresiva es crucial para el resultado final. La tasa de perros infectados que sobreviven es variable y en ausencia de tratamiento, el porcentaje de animales que sobreviven es bajo (9%). En los perros tratados, las tasas de supervivencia pueden alcanzar el 95% (Glickman y cols, 1985). Las tasas de mortalidad también varían entre los estudios, pero en su mayoría oscilan entre el 25% y el 35% (Glickman y cols, 1985; Godsall y cols, 2010) o el 43% informado por Ling y cols, 2012. Puede afectar a perros a cualquier edad, pero la infección grave es más común en cachorros entre 6 semanas y 6 meses de edad (Houston y cols, 1996). Todas las razas son susceptibles a la enfermedad, aunque se describe que las razas mixtas son menos susceptibles que muchas razas puras. Dentro de las razas puras, se ha reportado a Rottweilers, Doberman Pinscher, Springer Spaniel Inglés, American Pit Bull Terriers y Pastor alemán con mayor riesgo de enteritis por CPV (Glickman y cols, 1985; Houston y cols, 1996).

1.6. CONTROL Y PREVENCIÓN

Dado que el parvovirus canino está muy adaptado tanto en la población canina salvaje como en la doméstica, la eliminación del virus es casi imposible y la parvovirus seguirá siendo una preocupación para los veterinarios de pequeños animales. El virus se encuentra en todas partes, puede sobrevivir por más de 6 meses a temperatura ambiente y se transporta fácilmente entre perros a través de jaulas, camas sucias o humanos. En situaciones de criadero, las buenas prácticas de higiene, incluyendo desinfección de superficies y el personal, son fundamentales para la prevención de la transmisión nosocomial de la infección viral (Prittie, 2004).

El CPV es especialmente resistente en el medio ambiente, probablemente por la carencia de envoltura. Es capaz de superar las temperaturas de congelación del invierno en el suelo al aire libre y muchos desinfectantes domésticos no son capaces de destruirlo en el interior. Los perros infectados eliminan el virus en sus heces en cantidades gigantescas durante las dos semanas posteriores a la exposición. En el interior, el virus pierde su infectividad en 1 mes, por lo tanto, debería ser seguro introducir un nuevo cachorro en el interior 1 mes después de que la infección activa haya finalizado. Al aire libre, la congelación es completamente protectora para el virus. Si el aire libre está contaminado y está congelado, uno debe esperar a que se descongele antes de introducir un nuevo cachorro con seguridad. Las áreas sombreadas deben considerarse contaminadas por 7 meses. Las áreas con buena exposición a la luz solar deben considerarse contaminadas durante 5 meses (Scott, 1980; Eleraky y cols, 2002).

Posiblemente, como consecuencia de su simpleza estructural, el virión es extremadamente resistente a la inactivación. Los viriones maduros son estables en presencia de

solventes lipídicos, o en exposición a pH 3 a 9 o, para la mayoría de las especies, a 56°C por 60 minutos. También son estables a -20°C por un año y luego de este período puede sobrevivir a 4°C con cierta disminución de la infectividad. El virus puede ser inactivado con hipoclorito de sodio (dilución 1:32), formol (1:50), glutaraldehído, beta propiolactona, hidroxilamina, agentes oxidantes o luz ultravioleta (Fieldsy cols, 2013).

1.6.1. Inmunización

La inmunización es la clave para el control exitoso y la prevención de la enfermedad en animales domésticos (Pollock & Carmichael, 1983b). Las concentraciones de anticuerpos séricos están directamente relacionados con la inmunidad. Desde la emergencia de la enfermedad, están disponibles vacunas efectivas (muertas y atenuadas) para el parvovirus canino. En 1979 se disponía de la primer vacuna de CPV a virus vivo modificado. Las vacunas parecen ser seguras y conferir inmunidad protectora que permite controlar gran parte de la enfermedad. Sin embargo, el virus todavía está ampliamente distribuido en la naturaleza, y si los cachorros no están vacunados, y cuando los anticuerpos maternos interfieren con su vacunación, generalmente se infectan naturalmente (Parrish, 1999). Los anticuerpos maternos suprimen la respuesta a la vacunación en cachorros jóvenes y son el principal problema en el control de la infección (Pollock & Carmichael, 1983b).

Los anticuerpos contra CPV se transfieren de una perra inmune a sus cachorros a través de la placenta y el calostro, siendo la transferencia vía calostro aproximadamente el 90% de los anticuerpos derivados de la madre (Pollock & Carmichael, 1982). Los anticuerpos maternos protegen contra la infección por virus de tipo salvaje y también interfieren con la vacunación e inhiben el desarrollo de inmunidad activa (Decaro y cols, 2005c; Jakely cols, 2012). La disminución del nivel de anticuerpos maternos ocurre desde la semana 1 a la 13 en los cachorros. Las vacunas usadas hasta la fecha no son confiables cuando se administran en presencia de anticuerpos maternos (Nandi y cols, 2013). El período entre la desaparición o cuando hay niveles muy bajos de protección por inmunidad pasiva derivada de la madre y la habilidad de responder a la vacunación con el desarrollo de inmunidad activa se conoce como “brecha de inmunidad” o “ventana de vulnerabilidad” (Scott y cols, 1970; Carmichael y cols, 1983). Durante este período, generalmente de entre 7 y 12 semanas de edad (figura 13) los perros se vuelven susceptibles a la infección por virus de tipo salvaje o a las vacunas, y se observan varios casos clínicos (Scott y cols, 1970; Decaro & Buonavoglia, 2012; Truyen & Parrish, 2013).

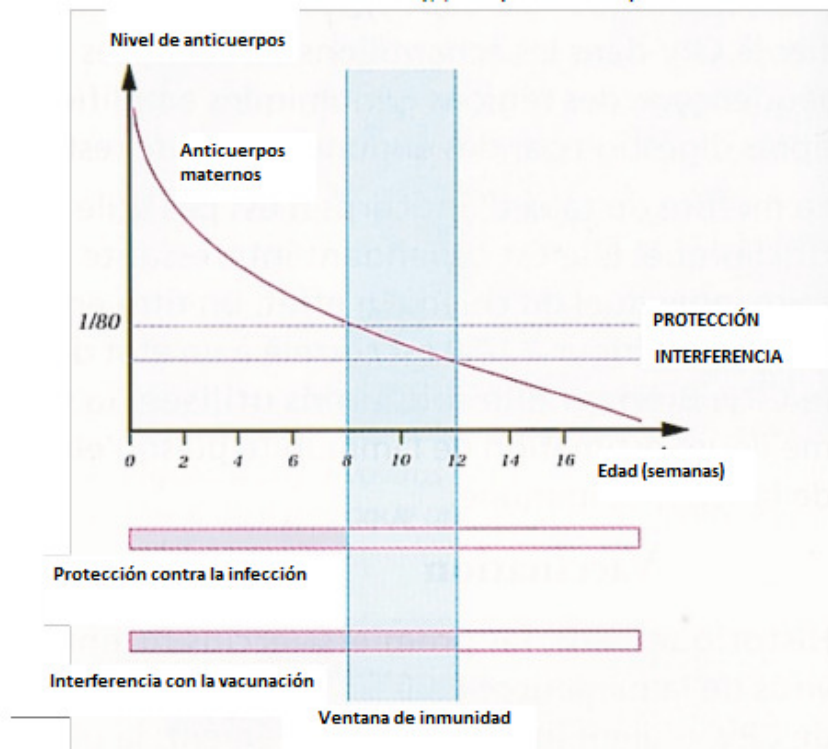


Figura 13. Brecha de inmunidad. La brecha de inmunidad se define como el período durante el cual la inmunidad materna ya no protege a los cachorros de la infección por parvovirus canino, pero todavía interfiere con el desarrollo de una inmunidad vacunal. (Adaptado de Truyen y cols, 2009).

La vacunación es el método más rentable e ideal para controlar la enfermedad en animales (Nandi y cols, 2013). Los cachorros son vacunados rutinariamente contra CPV durante sus primeros meses de vida, y luego sigue una vacunación anual. Un enfoque más común es vacunar repetidamente a los perros a intervalos de 3-4 semanas, comenzando a las 6 a 8 semanas de edad y terminando alrededor de las 16 semanas de vida o más. Todos los perros deben recibir un refuerzo un año después de la finalización de la serie inicial seguido de un refuerzo cada 3 años (Day y cols, 2010; Jakel y cols, 2012). Un estudio acerca de la duración de la inmunidad utilizando una vacuna de CPV-2 reportó una duración mínima de inmunidad vacunal de 7 años en función del desafío y de 9 años basada en serología (Schultz, 2006). La vacunación inicial de los cachorros se realiza generalmente utilizando vacunas CPV-2 monovalentes y en los tiempos restantes utilizando vacunas multivalentes. La vacunación es un método importante y efectivo en las estrategias de control y previene la infección de parvovirus canino en perros (Nandi y cols, 2013).

La circulación del virus activo y los programas de vacunación inicial ayudaron a desarrollar la inmunidad colectiva en poblaciones animales, lo que redujo enormemente la mortalidad y la propagación del virus (Decaro & Buonavoglia, 2012; Nandi y cols, 2013). Las vacunas a virus vivo modificado son utilizadas ampliamente, ya que las vacunas inactivadas solo pueden inducir inmunidad a corto plazo (Truyen & Parrish, 2013). Estas vacunas preparadas usando el CPV-2

original o su variante CPV-2b, han sido descritas como muy efectivas, pudiendo proteger a los perros contra la enfermedad por parvovirus, así como todas las variantes actualmente circulantes, y casi completamente seguras (Day y cols, 2010). Los resultados de seis ensayos controlados que utilizaron la vacuna a virus vivo modificado informaron beneficios en términos de reducción de los signos clínicos, pruebas serológicas y eliminación de virus en la mayoría de los casos (Hernández-Blanco & Catala-López, 2015). Las vacunas CPV-2 a virus muerto (inactivadas) son menos efectivas y tardan más en inducir respuesta inmune en comparación con las vacunas a virus vivo modificado, por lo cual no son recomendadas para uso rutinario. Las vacunas a virus muerto pueden proporcionar algún beneficio en especies silvestres y exóticas o en perras preñadas, donde no se recomiendan las vacunas modificadas (Day y cols, 2010).

En Uruguay, actualmente se comercializan diversas vacunas contra CPV, siendo en su mayoría a virus vivo atenuado y polivalentes (CPV-2, Coronavirus canino, Distemper virus y Adenovirus tipo 2). Todas las vacunas reportadas en el Vademecum de especialidades veterinarias de Uruguay contiene la cepa CPV-2 (Vademecum elaborado por Sinergia).

1.6.2. Falla de las vacunas.

Existe cierta preocupación de que las vacunas usadas actualmente para prevenir la infección por CPV en perros podrían fallar en proteger efectivamente a los cachorros contra la nueva variante antigénica CPV-2c (Truyen, 2006). Si bien el tipo original de CPV-2 ha sido reemplazado completamente por los tipos antigénicos 2a, 2b, y 2c, es aun utilizado en la mayoría de las vacunas comerciales. Existen diferentes opiniones en lo que respecta a la protección que confieren dichas vacunas contra las variantes de campo. Por un lado, varios estudios han demostrado que las vacunas CPV-2 son aun eficaces en inducir protección contra las variantes de CPV que circulan (Greenwood y cols, 1995; Yule y cols, 1997; Larson & Schultz, 2008; Spibey y cols, 2008). Por otro lado, se cree que la inmunidad inducida por las vacunas CPV-2 es efectiva contra el virus homólogo (vacunal) pero significativamente menor contra las variantes, permitiendo que una cepa agresiva cause infección y aun mortalidad en perros vacunados regularmente (Decaro y cols, 2005a).

Los experimentos desarrollados por Pratelli y sus colaboradores (Pratelli y cols, 2001), demostraron que los cachorros inmunizados con vacunas con CPV-2 tuvieron títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos contra el virus homólogo (CPV-2) que contra el virus heterólogo (CPV-2b). Por otra parte, los cachorros inmunizados con vacunas CPV-2b tuvieron similares títulos de anticuerpos neutralizantes para ambos virus. Sin embargo, estos

autores dicen que a pesar de todo, el problema puede no ser tan crítico porque, en el campo, son raras las infecciones por parvovirus debidas a fallas de la vacuna CPV-2 como consecuencia de un bajo nivel de inmunidad en perros contra los virus heterólogos. Los cachorros vacunados con CPV-2 poseen anticuerpos contra el virus heterólogo que probablemente están en niveles que todavía proporcionan inmunidad completa o parcial a cachorros jóvenes a los 2 a 4 meses de edad, momento en que son más susceptibles a la infección por CPV.

Se realizaron experimentos similares para evaluar la reactividad cruzada serológica entre CPV-2 y CPV-2a, CPV-2b y CPV-2c en sueros de perros y conejos (Cavalli y cols, 2008). Los animales a los cuales se les administró CPV-2 mostraron un título de anticuerpos neutralizantes significativamente menor contra los virus heterólogos con respecto a los virus homólogos.

Por otra parte, se ha probado la eficacia de la vacuna clásica CPV-2 contra la cepa de campo CPV-2c (Spibey y cols, 2008). Sin embargo en este experimento el desafío fue llevado a cabo en condiciones controladas al día 28 post-vacunación, cuando los anticuerpos comúnmente alcanzan los mayores niveles (Decaro y cols, 2004). Otro trabajo reciente reporta un brote de CPV-2c en perros adultos vacunados. Se plantea que es muy probable que una cepa CPV-2c altamente patogénica fue capaz de infectar a los perros adultos, causando enfermedad y en un caso aun la muerte, ya que la inmunidad inducida por la cepa vacunal CPV-2 no fue capaz de asegurar una adecuada protección contra la cepa de campo (Decaro y cols, 2008a).

No se sabe nada acerca de la protección inducida por el tipo original contra CPV-2c luego de un largo período entre vacunación y desafío, cuando los títulos de anticuerpos tipo 2, pueden no ser lo suficientemente eficientes para prevenir la infección y enfermedad causada por una CPV-2c de campo. Existe consenso de que las diferencias antigénicas entre el tipo 2 original y sus variantes pueden disminuir la efectividad de las vacunas basadas en CPV-2 (Greenwood y cols, 1995; Yule y cols, 1997; Pratelli y cols, 2001).

La interferencia de los anticuerpos maternos en cachorros es considerada la principal causa de falla en la vacunación (Decaro & Buonavoglia, 2012). Por tanto, para evitar la interferencia con la inmunización activa, las vacunas se deberían administrar a sus crías solo después de la disminución de los anticuerpos maternos. Se ha propuesto diferentes estrategias para superar esta interferencia, incluidas las vacunas de títulos elevados (Burtonboy y cols, 1991) y la vacunación intranasal (Martella y cols, 2005).

Hay otras razones que pueden estar asociadas a la falla de vacuna en la enfermedad causada por parvovirus canino, como las medidas zoonosanitarias inapropiadas, prácticas de desinfección, el seguimiento de un incorrecto esquema de vacunación, un huésped inmunocomprometido y la presencia de enfermedades concomitantes (Nandi y cols, 2013). El

éxito de la vacunación también depende del tipo de vacuna usada, por ejemplo, las vacunas inactivadas son menos efectivas y demoran más en inducir respuesta inmune cuando se comparan con las vacunas a virus vivo modificado (Day y cols, 2010).

1.6.3. Nuevas vacunas- VLPs.

Un tipo de vacuna alternativa, son las vacunas basadas en VLPs (Virus like particles- partículas similares a virus). Combinan varias ventajas de las vacunas a virus completo y vacunas recombinantes de subunidades integrando características que subyacen a su inmunogenicidad, seguridad y potencial de protección: 1) geometría bien definida y notable uniformidad con estructuras de superficie repetitivas y ordenadas, 2) naturaleza particulada y multivalente, 3) preservación de la conformación antigénica nativa, 4) seguridad, ya que son absolutamente no infecciosos y no replicativos porque carecen de genoma, 5) mayor estabilidad que los antígenos solubles en condiciones ambientales extremas, 6) aplicabilidad como vectores para la presentación de antígenos extraños, 7) cumplirían con los requisitos para diferenciar animales vacunados de no vacunados (Crisci y cols, 2012).

Las VLPs son ensamblajes supramoleculares con una geometría bien definida, usualmente icosaédricas o estructuras con forma de varilla, con diámetros que van desde 25 a 100 nm (Johnson and Chiu, 2000) e imitan la estructura general de los viriones nativos. Estas cajas proteicas se basan en la capacidad intrínseca natural de muchos tipos de subunidades virales estructurales, con frecuencia proteínas principales de la cápside o envoltura, para autoensamblarse espontáneamente en VLPs cuando se expresan utilizando sistemas de expresión recombinantes (Garcea & Gissmann, 2004). Se componen de copias múltiples de una o más proteínas virales y, por lo general, no se pueden distinguir antigénicamente de virus infecciosos o partículas subvirales (Jennings & Bachmann, 2008).

El despliegue multivalente y la estructura altamente ordenada de las VLPs constituyen motivos de patrones asociados a patógenos (PAMPs). Dado que estos motivos son, en general, únicos para los antígenos microbianos, el sistema inmune de los mamíferos ha evolucionado para responder vigorosamente a esta disposición de antígenos. Los PAMP activan los mecanismos de detección inmune innatos (Plummer & Manchester, 2011) y pueden ser reconocidos por los receptores tipo Toll y otros receptores de reconocimiento de patrones que están presentes en las células huésped. Además, debido a su superficie altamente repetitiva, las VLPs promueven el entrecruzamiento entre receptores de células B, aumentando su activación y promoviendo la formación de células de memoria (Bachmann & Zinkernagel, 1997). La estimulación de las células

B por las VLP es, en algunos casos, lo suficientemente fuerte como para provocar la inducción de anticuerpos IgM por células T independientes. Por lo tanto, hay ejemplos de VLPs que actúan como antígenos de células B independientes de células T (Bachmann y cols, 1993; Fehr y cols, 1998; Chackerian y cols, 1999; Kouskoff y cols, 2000). Además, los PAMP también pueden estimular la captación de antígenos por las células presentadoras de antígenos (APC) y la posterior presentación de antígenos a las células de la respuesta inmune adaptativa. Más allá de la propiedad de los PAMP, su naturaleza y dimensiones de partículas conllevan a las VLP, pero no a sus subunidades de proteínas, que pueden ser captadas de manera eficiente por las APC, en particular las células dendríticas. La absorción de antígenos por las APC depende de diferentes propiedades, como el tamaño, la forma, la carga superficial, etc, siendo el tamaño del antígeno un factor clave (Crisci y cols, 2012).

En general, se ha demostrado que las VLPs estimulan una fuerte respuesta inmune mediada por células B y pueden ser muy efectivas en estimular una respuesta proliferativa de células T CD4+ y linfocitos T citotóxicos (Schirmbeck y cols, 1996; Paliard y cols, 2000; Murata y cols, 2003; Tissot y cols, 2010), el objetivo fundamental de cualquier vacuna.

En términos de seguridad, el hecho de que las VLPs carezcan de ácido nucleico viral, elimina por completo cualquiera de los riesgos asociados con replicación de virus, inserción, reversión, recombinación, o reordenamiento (Crisci y cols, 2012). Se pueden preparar vacunas basadas en VLPs sin la necesidad de propagar virus patógenos utilizando diferentes sistemas de expresión (Vicente y cols, 2011). Por lo tanto, se obvian los problemas de seguridad asociados con la producción y administración de vacunas de virus completos, relacionadas con el escape de virus de las instalaciones de producción, el surgimiento de mutantes de reversión o los efectos en individuos inmunocomprometidos (Jennings & Bachmann, 2008)

Al día de hoy, se han aprobado y se comercializan varias vacunas profilácticas basadas en VLPs; por ejemplo, vacuna contra el virus de la Hepatitis B (Engerix[®], GlaxoSmithKline's y Recombivax HB[®], Merck and Co.'s), vacuna contra el papillomavirus humano (Cervarix[®], GlaxoSmithKline's; Gardasil[®], Merck and Co.'s). El desarrollo de estas pseudopartículas virales o VLPs, como alternativa a las vacunas convencionales basadas en virus atenuados o inactivados, constituyó un enfoque atractivo para la inmunización, en virtud de sus propiedades inmunogénicas y de seguridad (Jennings & Bachmann, 2008).

El sistema de vector de expresión de baculovirus (BEVS) se ha establecido como una herramienta importante para producir una variedad de proteínas eucarióticas complejas para estudios relacionados con la estructura y función. De modo similar, el sistema ha sido usado para investigar la formación de cápsides de muchos virus. En estudios con Rotavirus (Sabara y cols,

1991), Picornavirus (Urakawa y cols, 1989), Orbivirus (French & Roy, 1990), Calicivirus (Planaduran y cols, 1996), Papillomavirus (Rose y cols, 1993), Herpesvirus (Thomsen y cols, 1994), y parvovirus (López de Turiso y cols, 1992), los BEVS han sido utilizado para la producción de VLPs. Entre los parvovirus, se produjeron VLPs para los virus adeno-asociados (Hoque y cols, 1999), parvovirus de la enfermedad aleutiana del visón (Wu & Rossmann, 1993), parvovirus humano B19 (Brown y cols, 1991; Kajigaya y cols, 1991), parvovirus porcino (Rueda y cols, 2000) y parvovirus canino (López de Turiso y cols, 1992).

La proteína VP2 de CPV, la principal proteína de la cápside, juega un papel importante en la estimulación de la inmunidad protectora contra la parvovirus. Estudios previos han demostrado que la VP2 de CPV-2 expresada sola en el sistema Baculovirus se incorpora eficientemente en cápsides vacías que retienen las propiedades biológicas del CPV natural (Saliki y cols, 1992; Yuan & Parrish, 2001). Algunos estudios con mutantes de delección permitieron definir ciertos dominios esenciales en la VP2 de parvovirus porcino (Sedlik y cols, 1995) y de CPV (Hurtado y cols, 1996) para el ensamblaje en VLPs. De esos estudios concluyeron que: i) el extremo amino es probablemente el mejor sitio para inserciones, ya que las inserciones en este sitio no alteran la estructura. Sin embargo, el extremo amino está completamente escondido adentro de la cápside, siendo inaccesible para los anticuerpos (Cortes y cols, 1993; Sedlik y cols, 1995) ii) Las delecciones en los loops 1,3 y 4 y en el extremo carboxi terminal evitan el correcto ensamblaje de la cápside, mientras que los mutantes con delecciones en el loop 2 son capaces de ensamblar en VLPs normales (Hurtado y cols, 1996). De este modo, la mayoría de los residuos expuestos están involucrados en interacciones críticas necesarias para el ensamblaje de la partícula. Por otro lado, en estudios acerca de la inmunogenicidad viral se ha visto que los loops son el sitio más adecuado para la inserción de epítopes para usar las partículas de CPV como carriers para la entrega de antígenos y el desarrollo de vacunas a subunidades.

Elia y colaboradores (Elia y cols, 2012) expresaron VLPs de CPV en un sistema baculovirus-insecto y desarrollaron un ELISA basado en VP2 recombinante. Demostraron que este ELISA es una herramienta valiosa para la detección del nivel de anticuerpos maternos interferentes antes de la vacunación de los cachorros aumentando las tasas de vacunación activa. Es posible adaptar este ensayo para fines comerciales y chequear el status inmune de los perros antes de vacunarlos.

Feng y colaboradores (Feng y cols, 2014) expresaron VLPs de CPV en pupas de gusanos de seda y confirmaron que estas VLPs estimulan respuestas inmunes humorales y celulares. Estos autores mostraron que se puede desarrollar una respuesta inmune sistémica en perros que reciben 2 mL de homogeneizado crudo administrado oralmente. Esos resultados indican que las VLPs de CPV permanecen inmunogénicas cuando son presentadas al sistema inmune de la

mucosa intestinal. El ácido gástrico y la digestión enzimática, que generalmente interfieren con el funcionamiento de las vacunas orales, pueden no ser problemas con estas vacunas, probablemente porque las VLP de CPV mantienen la estabilidad de la partícula de CPV nativa (Gil y cols, 2001, 2007; Feng y cols, 2014).

Jin y colaboradores (Jin y cols, 2016) generaron una alta producción de VLPs de CPV en un sistema de expresión de baculovirus demostrando que es un proceso de producción fácil, rentable y conveniente de realizar. Generaron VLPs de CPV con alto título de HA, demostrando que generan una fuerte respuesta inmune tanto por inoculación intramuscular como por vial oral.

Teniendo en cuenta la alta tasa de generación de nuevas cepas de CPV, es necesario actualizar las vacunas existentes. Para esto, es necesario desarrollar una vacuna nueva y segura basada en el tipo antigénico prevalente, como podría ser el caso de vacunas alternativas, tales como las vacunas basadas en partículas similares a virus (VLPs- virus like particles).

2. HIPÓTESIS

Teniendo en cuenta la alta variabilidad genómica del parvovirus canino es importante la constante detección de nuevas mutaciones en las cepas emergentes que puedan dar lugar a cambios en las propiedades biológicas del virus. Para ello consideramos esencial comparar las secuencias de los genomas obtenidas de la cepa presente en la vacuna nacional de tipo CPV-2 (Cornell atenuada), la variante de campo CPV-2c (294MF) aislada en Uruguay y la cepa CPV-2 Cornell salvaje. Así como también evaluar la variabilidad de los genomas de cepas circulantes de CPV en perros y animales silvestres.

Por otro lado, se ha demostrado que hay protección completa entre cepas CPV-2, CPV-2a y CPV-2b, sin embargo, existe controversia sobre si las vacunas existentes hoy en día confieren protección cruzada frente a las infecciones producidas por las cepas CPV-2c. Por tanto, el desarrollo de nuevos candidatos a vacunas que incluyan esta última variante que ha emergido resulta de real importancia.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y evaluar mutaciones relevantes en el parvovirus canino relacionadas con sus propiedades biológicas y con énfasis en la proteína de cápside VP2.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1 Caracterización biológica y genómica de CPV

3.1.1. Adaptación de una variante de campo CPV-2c al crecimiento en cultivo celular y caracterización del modelo de infección viral.

3.1.2. Análisis de los genomas completos de las cepas prototipo: Cornell salvaje CPV-2, Cornell atenuada CPV-2 (presente en una vacuna comercial), y la nueva variante circulante a nivel de campo CPV-2c con el fin de corroborar las mutaciones existentes en la variante 2c y/o identificar otros cambios de relevancia ya sea en la proteína VP2 u otras proteínas del virus.

3.2. Caracterización molecular de CPV en muestras de campo provenientes de caninos y animales silvestres.

3.3. Evaluar la respuesta inmune generada por variantes de la proteína de cápside VP2, a partir de:

3.3.1. Un sistema replicativo empleando un clon infeccioso de CPV

3.3.2. Partículas no replicativas, VLPs (Virus Like Particles), en la cual solo se considerará a la proteína VP2 sin tener en cuenta otra parte del genoma.

4. CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y GENÓMICA DE CPV.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

Para abordar el objetivo 3.1 de este capítulo, se trabajó con muestras de Uruguay, mientras que en el objetivo 3.2 se analizaron muestras provenientes de Brasil.

4.1.1 Muestras

4.1.1.1 Muestras clínicas de Uruguay

Se analizaron 13 muestras de hisopado rectal de caninos, recibidas en agosto de 2009 y provenientes de la ciudad de Canelones, Uruguay. Todas las muestras correspondían a cachorros vacunados con signos clínicos típicos de parvovirus que habían resultado positivos a un kit diagnóstico comercial para CPV. El diagnóstico clínico y por kit lo llevaron a cabo los veterinarios que atendieron a los cachorros.

4.1.1.2 Cepas virales

Como cepa de referencia se utilizó una cepa vacunal (cepa Cornell atenuada) proveniente de un stock de cultivo celular proporcionada por Laboratorios Santa Elena. La misma fue utilizada como control positivo en todas las PCR.

La cepa salvaje utilizada fue la cepa Cornell de ATCC (VR-2017) provista también por Laboratorios Santa Elena.

4.1.1.3 Muestras clínicas de Brasil

Se colectaron 27 muestras de carnívoros silvestres que se encontraban en cautiverio, donde el tiempo de confinamiento varió entre 1 y 4 semanas, como se muestra en la Tabla 3. Estas especies fueron atrapadas en granjas o alrededor de áreas urbanas, por el grupo de vida silvestre de Minas Gerais, Brasil. Luego de realizarles pruebas de laboratorio, algunos animales fueron liberados en áreas protegidas o mantenidos en cautiverio cuando no eran saludables o no podían readaptarse a la naturaleza.

Por otro lado, se recolectaron 41 muestras fecales de perros vacunados y no vacunados, de entre 30 días y 10 años de edad, con sintomatología de parvovirus. Las muestras fueron obtenidas directamente del recto, por personal del Hospital Veterinario de la Universidad de Minas Gerais en el momento de consulta y solo se tomó muestras de aquellos perros cuyo motivo de visita era la aparición de diarrea. Las muestras, tomadas entre los años 2010 y 2011, fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Tabla 3. Muestreo de carnívoros salvajes. Se detalla la cantidad de muestras obtenidas por especie y el tiempo en cautiverio.

Especie de animales salvajes de Brasil	Nombre común	Tiempo en cautiverio			Número de muestras (%)
		< 1 semana	1 a 4 semanas	> 4 semanas	
<i>Cerdocyon thous</i> (Cachorro do mato)	Zorro cangrejero	1	2	7	10 (37.1)
<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Lobo Guará)	Aguará guazú	2			2 (7.4)
<i>Leopardus pardalis</i> (Jaguaririca)	Ocelote	1	1		2 (7.4)
<i>Leopardus tigrinus</i> (Gato do mato pequeno)	Leopardo tigre			2	2 (7.4)
<i>Leopardus wiedii</i>	Gato tigre			1	1(3.7)
<i>Puma concolor</i> (Onça Parda)	Puma			8	8(29.6)
<i>Puma yagouaroundi</i> (Jaguarundi)	Jaguarundi o Gato moro			2	2 (7.4)
Total (%)		4 (14.8)	3 (11.1)	20 (7.4)	27 (100)

4.1.2 Extracción de ADN viral.

En el caso de las muestras de Uruguay, para la extracción de ADN viral a partir de materia fecal y de los sobrenadantes de cultivos, se aplicó la metodología “fast-boil” descrita previamente (Schunck y cols, 1995; Decaro y cols, 2005b). Brevemente, las muestras fueron diluidas 1/10 en PBS y clarificadas a 1500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se hirvió durante 10 minutos para inactivar posibles inhibidores de PCR y luego, la muestra se colocó rápidamente en hielo. Finalmente se diluyó 1/10 en agua de PCR y se conservó a -20°C hasta su uso.

Para las muestras provenientes de Brasil la extracción de ADN se realizó con el Kit Qiagen QIAamp Stool Mini Kit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

4.1.3 Diseño de cebadores

En la tabla 4 se detallan los cebadores utilizados para la amplificación del genoma completo de parvovirus canino, sintetizados en IDT (Integrated DNA Technologies, USA). La mayor parte de ellos fue diseñada especialmente para este trabajo, mientras que otros fueron tomados de diferentes fuentes bibliográficas como se especifica en dicha tabla.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la amplificación del genoma de CPV.

NOMBRE	SECUENCIA	POSICIÓN	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
For 1	ATTCTTTAGAACCAACTGACCAAGTTCACGTA	1-32	DISEÑADO PARA LA TESIS
For NS1 Paloma	AGTGAACCTCTCTACTCTG	246-265	Secuencia provista por comunicación personal con Paloma Rueda
Rev 702	CCAGTTGCTTGTGTAAGTTC	682-702	DISEÑADO PARA LA TESIS
For 507	CGGAAGTTGATAGTCTGCC	507-526	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 1232	CACCTCCTGGTTGTGCCATC	1213-1232	DISEÑADO PARA LA TESIS
For 1167	CACCTGAAGACTGGATGATG	1167-1186	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 1807	CAACATTCTGTCTTATTGG	1787-1807	DISEÑADO PARA LA TESIS
For 1703	GAACCAACTCCAGTAATTATG	1703-1723	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 2468	CGGCGTCAGAAGGGTTAGTTG	2448-2468	DISEÑADO PARA LA TESIS
For 2283	CGATGGCACCTCCGGCAAAGAG	2283-2304	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 3075	GCCATGTTCCGTTAACTGC	3056-3075	DISEÑADO PARA LA TESIS
For 3025- P2s	GAAGAGTGGTTGTAAATAATA	3025-3045	(Senda y cols, 1995)
Rev 3706- P2as	CCTATATCACCAAAGTTAGTAG	3685-3706	(Senda y cols, 1995)
Hfor	CAGGTGATGAATTTGCTACA	3556-3575	(Buonavoglia y cols, 2000)
Hrev	CATTGGATAAACTGGTGGT	4166-4185	(Buonavoglia y cols, 2000)
555 For	CAGGAAGATATCCAGAAGGA	4003-4022	(Buonavoglia y cols, 2000)
555 Rev	GGTGCTAGTTGATATGTAATAAACA	4561-4585	(Buonavoglia y cols, 2000)
For 4430	CAACAAATGAGTATTAATGTAG	4430-4451	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 4823	ACCAACCACCCACACCATAACAAC	4924-4947	DISEÑADO PARA LA TESIS
Rev 5323	TCTAGAGATGTTAATATAATTTTCTAGGTGCTA	5291-5323	(Wang y cols, 2005)
Pbs	CTTAACTTCCTGTAACAG	4043-4062	(Pereira y cols, 2000)
Pbas	CATAGTTAAATTGGTTATCTA	4450-4470	(Pereira y cols, 2000)
Pabs	GAAGAGTGGTTGTAAATAATT	3025-3046	(Pereira y cols, 2000)
Pabas	CCTATATAACCAAAGTTAGTA	3685-3706	(Pereira y cols, 2000)
NS1 For	ATGTCTGGCAACCAGTATACTGAG	272-295	(Saxena y cols, 2011)
NS1 Rev	AGGTGCCATCGTACCTTAATC	2277-2293	(Santra y cols, 2014)
5093 Rev	GTGGGAGATGCACAACATCA	4958-4977	DISEÑADO PARA LA TESIS
5122 Rev	AAGTATCAATCTGTCTTTAA	4927-4947	DISEÑADO PARA LA TESIS
4947 Rev	GATTGATACTTATGGTAAGGTTAG	4914-4937	DISEÑADO PARA LA TESIS
5047 Rev	GCTTAATCAACCAGACCGCATAGC	5023-5047	DISEÑADO PARA LA TESIS

4.1.4 Amplificación por PCR.

Las amplificaciones por PCR del genoma completo de CPV, se dividen en tres partes a los efectos de una mejor organización de este punto. En primer lugar, amplificación de un segmento del gen VP2 para determinación de las variantes. En segundo lugar, la amplificación de la región codificante y en tercer lugar, las estrategias abordadas para la amplificación de los extremos.

4.1.4.1 PCR para determinación de variante.

Para determinar la variante de CPV presente en las muestras de campo obtenidas en Canelones, se amplificó por PCR dos regiones diferentes del gen VP2 que abarcan la región del aminoácido 426, utilizando dos juegos de cebadores 555for/555rev y Hfor/Hrev descritos en la literatura. Las condiciones de las PCR se describen en los siguientes cuadros:

PCR Hfor/Hrev

Reactivo	Concentración
Buffer PCR 10X	1 X
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u
Cebador Hfor	10 µM
Cebador Hrev	10 µM
ADN molde	10 µL
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U
Agua destilada c.s.p	50 µL

94°C	3 min	
94°C	45"	
45°C	30"	30 ciclos
72°C	1'30"	
72°C	10 min	

PCR 555 for/rev

Reactivo	Concentración
Buffer PCR 10X	1 X
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u
Cebador 555for	10 µM
Cebador 555rev	10 µM
ADN molde	10 µL
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U
Agua destilada c.s.p	50 µL

94°C	3 min	
94°C	45"	
55°C	30"	30 ciclos
72°C	1'30"	
72°C	10 min	

4.1.4.2 Amplificación de la región codificante

Se realizaron varias amplificaciones para determinar la región codificante de aproximadamente 4300 nucleótidos para una muestra CPV-2c, cepas Cornell atenuada y salvaje, y para las muestras brasileras. En los cuadros a continuación se especifican los detalles de las diferentes reacciones de PCR realizadas:

PCR - VP2-2c (294) For 2781/rev 4518

Reactivo	Concentración
Buffer Hifi 10X	1 X
MgCl ₂ 50 mM	2 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u
For 2781	10 µM
Rev 4518	10 µM
ADN molde	10 µL
Taq Platinum® (Invitrogen)	1,25 U
Agua destilada c.s.p	50 µL

94°C	5 min	
94°C	45"	
45°C	1'	40 ciclos
68°C	2'	
68°C	10 min	

PCR VP2-2 EN GRADIENTE .

94°C	5 min	
94°C	45"	
40,45, 50, 55°C	1'	40 ciclos
68°C	2'	
68°C	10 min	

PCR For 507/Rev 1807

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
MgCl ₂	1,5 mM	94°C	30"	30 ciclos
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	45°C	30"	
For 507	10 µM	72°C	2'	
Rev 1807	10 µM	15°C	30 min	
ADN molde	10 µL			
Taq Platinum (invitro)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 µL			

PCR For 1167/rev 1807—45°C y 1703/2468

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	94°C	45"	40 ciclos
Cebador For	10 µM	*°C	1'	
Cebador Rev	10 µM	72°C	1'30"	
ADN molde	10 µL	72°C	10 min	
U Taq (China)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 µL			

PCR For 1703/3075—45 y 48°C

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
MgCl ₂	1,5 mM	94°C	30"	30 ciclos
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	45°C	30"	
For 1703	10 µM	72°C	2'	
Rev 3075	10 µM	15°C	30 min	
ADN molde	10 µL			
Taq Platinum (invitro)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 µL			

PCR 4430 for/4823 rev

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
MgCl ₂	1,5 mM	94°C	30"	35 ciclos
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	45°C	30"	
For 4430	10 µM	72°C	2'	
Rev 4823	10 µM	15°C	30 min	
ADN molde	10 µL			
Taq Platinum (invitro)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 ul			

4.1.4.3 Amplificación de los extremos

Debido a la forma en horquilla de los extremos del parvovirus canino es muy difícil su amplificación por PCR, tal es así que en GenBank se encuentran muy pocas secuencias completas. Por esta razón se diseñaron varias estrategias para las muestras CPV-2c 294MF y CPV-2 Cornell atenuada.

ESTRATEGIA 1. Extracción de formas replicativas del ADN de CPV de bajo peso molecular. (Extracción de Hirt modificada). (Hirt, 1967)

Esta estrategia se basa en la extracción de ADN de bajo peso molecular a partir de cultivo celular. Las células infectadas son lisadas con detergente SDS y luego el detergente es precipitado por ejemplo con NaCl a 4°C. El ADN celular si no se corta también precipita y el ADN viral que es de menor tamaño por muchos órdenes de magnitud permanece en el sobrenadante.

Para llevar adelante este ensayo se infectaron células CRFK con parvovirus canino. Para el caso de la cepa vacunal se inocularon 2 botellas Roux de vidrio, de superficie aproximada 200 cm² mientras que para la cepa CPV-2c (294MF) se inoculó 1 botella roller de 850 cm² de superficie. Luego de 48 hs de infección, se cosechó el virus tripsinizando las células y centrifugando a 1500

rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió para cada roller en 9 mL de buffer de lisis y para las 2 botellas Roux en 6 mL. El buffer de lisis está compuesto por: 50 mM de Tris HCl (pH 7.5), 1% SDS, 10 mM EDTA y 3 µg/mL de proteinasa K. Se incubó durante 4 hs a 37°C y luego se realizó una precipitación salina agregando NaCl 1M. Se incubó O.N. a 4°C. Se centrifugó durante 1 h a 15.000 rpm 4°C para remover el ADN cromosómico y los debris celulares particulados. A continuación, se precipitó el sobrenadante conteniendo el ADN de bajo peso molecular y el ARN. Para esto, se colocó en tubo eppendorf 600 µL de sobrenadante más 600 µL de cloroformo/isoamílico. Se agitó por inmersión durante 5 minutos. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos. Se recuperó la fase superior y se repitió 1 vez. El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio en una relación 1/10 del volumen. Se mezcló por inmersión y se dejó O.N. a -20°C. Se centrifugó a 10.000 rpm 1 hora, 4°C y posteriormente se secó el pellet. Se resuspendió en 120 µL (para CPV-2) y 200 µL (para CPV-2c) de agua de PCR. Posteriormente, se corrió un gel de agarosa al 0,8% en buffer de corrida TAE 1x.

Para el caso de CPV-2c se realizó un tratamiento con RNAsaA (Fermentas) a una concentración de 100 µg/mL. Se incubó durante 30 minutos a 37°C y se inactivó la enzima a 70°C durante 15 minutos. Se volvió a correr un gel de agarosa al 0,8%. Se cortó la banda y se purificó de gel. Esa banda purificada se usó como molde para los siguientes ensayos.

Se realizaron diferentes PCR para amplificar los extremos del genoma utilizando diluciones 1/10 y 1/100 de la extracción de Hirt anterior.

PCR 1 for/702 rev						PCR 4430for/5323rev			
Reactivo	Concentración					Reactivo	Concentración		
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min			Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min
MgCl2 50 Mm	1.5 mM	94°C	30"			MgCl2 50 mM	1.5 mM	94°C	30"
dNTPs 10 Mm	0.2 mM c/u	47°C	30"	35 ciclos		dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	40°C	30"
1 For	10 µM	72°C	1'			4430 for	10 µM	72°C	1'
702 rev	10 µM					5323 rev	10 µM		
ADN molde	10 µL					ADN molde	10 µL		
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U					Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U		
Agua destilada c.s.p	50 µL					Agua destilada c.s.p	50 µL		

ESTRATEGIA 2. Diferentes PCR

- ❖ PCR convencionales con las siguientes combinaciones de cebadores:

For4430/Rev5323, For1/Rev1232, For555/Rev5323

Y con enzimas de diferente origen y fidelidad: Taq SBS (China), Taq (Sigma), Taq Platinum (Invitrogen), Taq Pfu (Fermentas).

❖ Diferentes condiciones en las PCRs

Relación 10:1 en el par de cebadores y 2 concentraciones de DMSO: 1 y 5%

Se probaron los siguientes pares de cebadores: Rev1232/1For, 555for/5323rev, 5323rev/1For, 4430for/5323rev

PCR en gradientes con cebadores hacia los extremos.

- ❖ Según Sukhumsirichart y cols, 2006 para extremos con horquilla se puede realizar PCR en rampa c/ 1 solo primer, alta temp y DMSO. Se probó con Taq china y con Taq Pfu. Cebadores: for 555/Rev 1232/rev 5323

4.1.5 Análisis del polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP).

Las muestras clínicas de Uruguay fueron caracterizadas mediante el análisis del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) con la enzima MboII (NEB) (Buonavoglia y cols, 2001). Esta enzima reconoce la secuencia específica GAGAA presente en la posición 4006-4010 del genoma viral de CPV-2, 2a, 2b y 2c. Únicamente en la cepa CPV-2c existe un sitio adicional en la posición 4062-4066 debido al codón GAA que codifica para Glu-426, generando 2 fragmentos de 500 y 80 pb. Sin embargo, dado que este análisis solo permite diferenciar las variantes 2c, hay que recurrir a la secuenciación para discriminar entre las demás variantes. Las muestras sometidas a RFLP provienen de la PCR con los oligonucleótidos 555for/555rev detallado en el punto 4.1.4.1.

4.1.6. Evaluación de productos de PCR, purificación y secuenciación.

Los productos de las amplificaciones por PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%, mientras que los productos del análisis de restricción en geles al 2,5% de agarosa, siempre utilizando buffer de corrida Tris-Acetato-EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA).

Las bandas de interés fueron purificadas utilizando el kit de purificación de ácidos nucleicos “Nucleospin Gel and PCR clean-up” (Macherey-Nagel, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la obtención de las secuencias se contrató el servicio de secuenciación automática de Macrogen (Seoul, Korea), y de Instituto Pasteur de Montevideo.

4.1.7 Análisis de secuencias y filogenia.

Los alineamientos y análisis de las secuencias de todas las muestras fueron realizados con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.8.0. (Hall, 1999).

El análisis filogenético de las muestras de Brasil se realizó con el programa MEGA7 (Kumar y cols, 2016). El árbol filogenético fue construido utilizando el método de neighbor-joining y el modelo Kimura 2 parámetros.

Para la comparación de secuencias y establecimiento del subtipo de las variantes se utilizaron las siguientes secuencias obtenidas de GenBank que se resumen en la tabla 5:

Tabla 5. Secuencias obtenidas de GenBank para establecer las relaciones filogenéticas entre variantes.

TIPO DE CPV	NOMBRE	Nº ACCESO	Referencia bibliográfica
CPV-2	CPV-b	M38245	(Parrish, 1991)
CPV-2a	CPV-15	M24003	(Parrish y cols, 1988a)
	Arg9	JF346754	(Gallo Calderón y cols, 2012)
	Ec/01/2017 y Ec/04/2017	MG264075 y MG264076	(De la Torre y cols, 2018)
	ME40	KF149983	(Aldaz y cols, 2013)
	Br46-95	DQ340430	(Pereira y cols, 2007)
CPV-2b	CPV-39	M74849	Parrish 1995 no publicado
	Arg5	JF414817	(Gallo Calderón y cols, 2012)
	Bel2015-02, Bel2015-01, Bel2016-01, Bel2014-01	KX774252, KX774251, KX774250, KX774249	(Silva y cols, 2017)
	ME20, ME6	KF149972, KF149985	(Aldaz y cols, 2013)
	Br183-85	DQ340409	(Pereira y cols, 2007)
	Bra02/13, Bra03/13, Bra05/13, Bra01/13,	MF177259, MF177258, MF177256, MF177251	(Grecco y cols, 2018)
	Ec/24/2017	MG264078	(De la Torre y cols, 2018)
	ARG50, 201-98, 01,-99, 242-98, E6, E20	MF177246, MF177232, MF177226, MF177225, MF177280, MF177269	(Grecco y cols, 2018)
CPV-2c	56/00	FJ222821.1	(Decaro y cols, 2009a)
	Arg68	JF414826	(Gallo Calderón y cols, 2012)
	ME28	KF149984	(Aldaz y cols, 2013)
	Ec/08/2017	MG264077	(De la Torre y cols, 2018)
	cat234/08	GU362935	(Decaro y cols, 2010)
	GR09/09	GQ865519	(Ntafis t cols, 2010)
	239/08	FJ005251	(Decaro y cols, 2009a)
	04S19	DQ025988	Pingret 2008 no publicado

4.1.8 Aislamiento en cultivo celular

Las muestras de materia fecal obtenidas en Canelones fueron diluidas 1/10 en medio de cultivo, clarificadas a 2000 rpm durante 10 minutos y los sobrenadantes clarificados fueron filtrados por un filtro de 0,22 µm. Luego de esto, se inoculó 1 mL en células de fibroma canino A-72 (ATCC, CRL-1542) crecidas en una botella F25 cm² recientemente lavadas con medio sin suero. Se realizó una etapa de adsorción durante 3 hs a 37°C, luego de lo cual se tripsinizaron las células y se repicaron en una proporción 1 a 2. Se adicionó medio de infección conteniendo 5% de Suero Fetal Bovino (SFB, Invitrogen). Se trabajó con los medios de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen) y Leibovitz (L-15, Invitrogen).

Las células inoculadas fueron incubadas durante 3-5 días en estufa a 37°C, en el caso del medio DMEM con 5% CO₂, hasta la aparición de efecto citopático característico (células redondeadas y desprendidas). Luego de esto, se raspó la monocapa, se centrifugó toda la cosecha a 2000 rpm, 5 minutos y el sobrenadante se utilizó para realizar el siguiente pasaje, manteniendo iguales condiciones.

La muestra 294 MF fue subcultivada hasta el pasaje 45. Cada 5 pasajes se realizó PCR de un fragmento del gen VP2 para confirmar la presencia de CPV. En el pasaje 30 se amplificó y se secuenció el gen que codifica la proteína VP2 por completo para la comparación con la secuencia de la muestra 294MF original.

4.1.9 Identificación de CPV mediante inmunofluorescencia.

Luego de 2 pasajes la presencia de CPV fue confirmada por ensayo de inmunofluorescencia directa. Las células fueron lavadas durante 10 minutos con PBS 1x a temperatura ambiente. Luego se colocó el anticuerpo monoclonal murino anti-CPV conjugado a isotiocianato de fluoresceína (VMRD) y se incubó durante 30 minutos en cámara húmeda a 37°C. Posteriormente se lavó 1 vez con PBS 1x y se dejó secar. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). La presencia de CPV también fue confirmada mediante PCR empleando los cebadores 555for/555rev como se describió anteriormente en el ítem 4.1.4.1.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Detección y análisis de variantes de campo CPV-2c.

Se realizó la extracción de ADN de las 13 muestras de materia fecal obtenidas por los veterinarios de campo en la ciudad de Canelones, a partir de cachorros con síntomas clínicos característicos de parvovirus. Se amplificó por PCR un segmento del gen VP2 (que incluye el aminoácido 426) con la finalidad de clasificar la variante circulante a nivel de campo. Las 13 muestras resultaron positivas en dicha reacción. En la figura 14A, se puede observar el resultado de la PCR con los cebadores Hfor/Hrev que amplifican un fragmento de 629 pb correspondiente a 5 de las 13 muestras, correspondiendo la muestra del carril 5 a la cepa 294MF y la muestra 1 es el control negativo.

A modo confirmatorio, se realizó una digestión del producto de PCR con los cebadores 555for/555rev utilizando la enzima MboII. En la figura 14B se observa la diferencia en el patrón de restricción del producto de PCR digerido, bandas de 500 y 80 pb y sin digerir banda de 583 pb. Este resultado infiere que estamos frente a una cepa del tipo CPV-2c, dado que esta enzima corta 2 veces en el sitio GAGAA solo para esta variante. En los casos de las otras variantes de CPV, CPV-2a y CPV-2b, solo corta 1 vez.

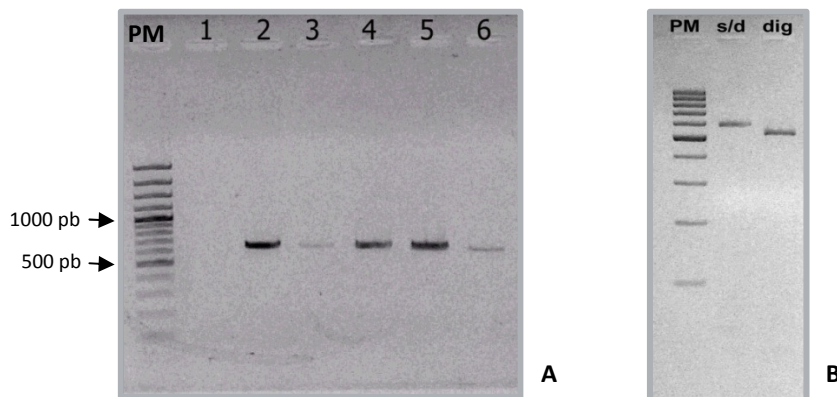


Figura 14. Detección de variante de CPV en muestras de Uruguay. A) Visualización de los productos de PCR con los cebadores Hfor/Hrev por electroforesis en gel de agarosa al 1%. PM. Marcador de Peso Molecular Generuler Plus (Fermentas) de 100pb. B) RFLP de los productos de PCR. s/d: banda de 583 pb correspondiente al producto de la PCR 555for/555rev sin digerir, dig: producto de la PCR 555for/555rev digerido con MboII. Bandas esperadas 500 y 80 pb. PM. Marcador de Peso Molecular Generuler (Fermentas) de 100pb.

Los productos de la reacción de PCR con los cebadores Hfor/Hrev fueron purificados y secuenciados en la empresa Macrogen, Korea. Una vez obtenidas las secuencias y depuradas, se realizó un BLAST, observándose que todas ellas presentaban alta homología en sus secuencias nucleotídicas. Se confirmó la presencia del codón GAA que codifica para el aminoácido Glutamato, demostrando que se obtuvo la variante CPV-2c. Posteriormente, las secuencias aminoacídicas fueron alineadas utilizando el programa Bioedit como puede observarse en la figura 15. En la región analizada las muestras presentan homología, diferenciándose únicamente en el aminoácido 426, como lo indica la flecha en dicha figura.

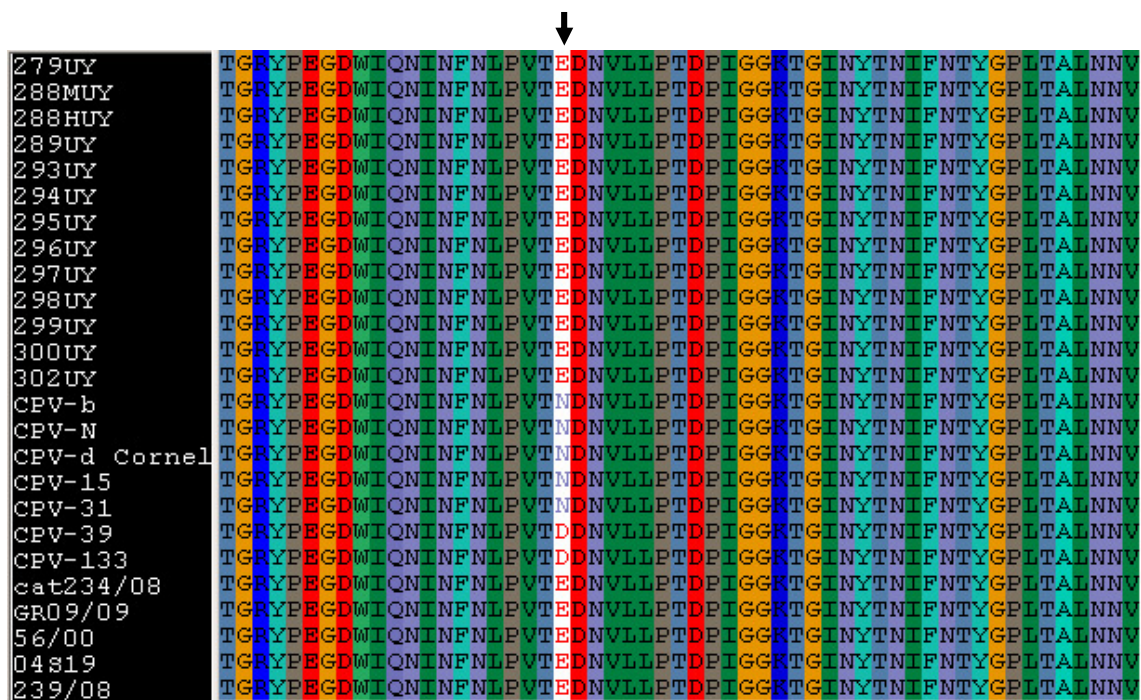


Figura 15. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas parciales de las cepas de campo de CPV de Uruguay utilizando el programa Bioedit. Se muestran los aminoácidos 406 a 460 de VP2, la flecha indica el aminoácido 426.

4.2.2 Aislamiento de la variante CPV-2c en cultivos celulares.

Las 13 muestras clínicas de materia fecal recibieron el tratamiento indicado en el punto 4.1.8 de materiales y métodos para su inoculación en cultivos celulares. En primer lugar se utilizó el medio de cultivo L-15, se realizaron 2 pasajes en ciego a las muestras de materia fecal pero se observaba que el medio se alcalinizaba, las células se deterioraban y no se lograba ver el efecto citopático característico del parvovirus. Para solucionarlo se hizo una adaptación de las células al medio de cultivo DMEM, con lo cual las células recuperaron su viabilidad.

Se comenzó nuevamente la infección de las cepas utilizando medio de cultivo DMEM y si bien en el primer pasaje no se distinguía un ECP evidente, al quinto día se realizó un pasaje en ciego, luego del cual, la variante 294MF se destacó por su ECP característico de parvovirus. Como puede observarse en la figura 16C en el control de células sin infectar las mismas presentan su morfología fibroblástica característica, en cambio en las células infectadas, Fig. 16 A y B, se observa el efecto citopático descrito para CPV, donde las células se observan refráctiles al microscopio, se redondean y se desprenden.

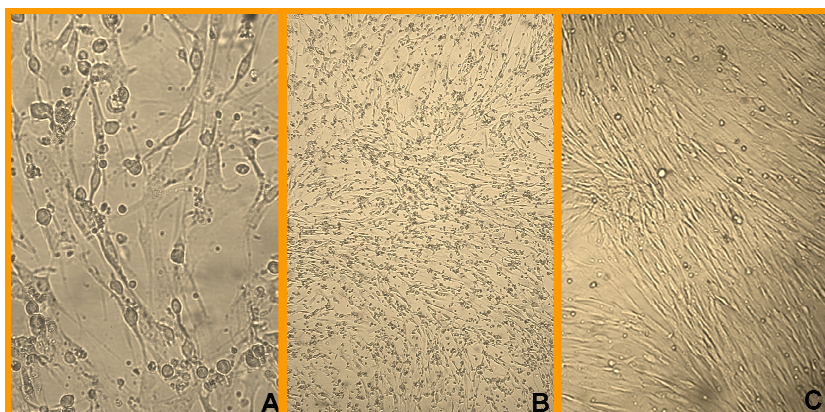


Figura 16. Evidencia de aislamiento de la cepa CPV-2c de Uruguay.

A y B) Efecto citopático típico de CPV-2 en la línea celular A-72, 4 días post-infección presentado en 2 aumentos diferentes (200X y 40X).
C) células A-72 no infectadas, aumento 100X

Se continuó realizando subcultivos de esta cepa y entre el segundo y el quinto pasaje el ECP se hizo más evidente al cuarto día posterior a la infección. Sin embargo a partir del sexto pasaje, las cosechas se realizaron al tercer día, indicando la adaptación de esta cepa 294MF al cultivo celular en la línea celular canina A-72. Al momento de la cosecha de cada pasaje se tomó una alícuota de sobrenadante para realizar PCR y digestión con la enzima de restricción MbolI a modo de confirmar la presencia de CPV-2c en cada subcultivo.

Más aun, la adaptación al cultivo celular de esta cepa de campo quedó demostrada dado que se realizaron 45 subcultivos. Cada 5 pasajes, se corroboró por PCR la presencia de CPV-2c.

El aislamiento de parvovirus canino fue confirmado mediante una fluorescencia directa con un anticuerpo monoclonal anti-CPV conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, VMRD), observándose el típico patrón recomendado por el proveedor del anticuerpo, células únicas con fluorescencia de inclusión citoplásmica y nuclear. Figura 17.

Todos estos resultados en su conjunto dieron lugar a la publicación "Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay". Publicada en la revista Ciencia Rural (Blanc y cols, 2011). Anexo 1.

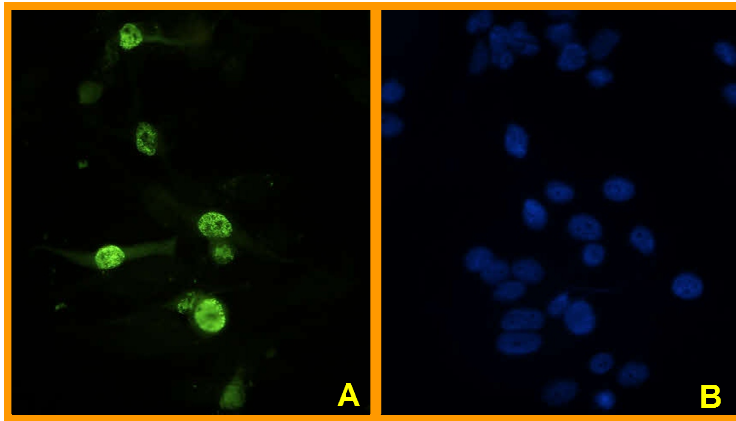


Figura 17. Detección de CPV por fluorescencia.

A) Fluorescencia directa utilizando el Anticuerpo Monoclonal anti-CPV conjugado a FITC (verde) en células A-72 infectadas con la cepa CPV-2c. B) Núcleo celular de las células A-72 infectadas con CPV-2c teñido con DAPI (azul). Aumento de ambas fotografías, 400x.

4.2.3 Análisis genómico de la cepa de campo CPV-2c-294MF, CPV-2c 294 p30 y de las cepas CPV-2 Cornell atenuada y salvaje.

La amplificación de las secuencias completas de las cepas CPV-2 Cornell vacunal atenuada y Cornell salvaje tuvo como objetivo identificar y comparar qué cambios en el genoma de la segunda estaban implicados en la atenuación de la primera y poder analizar en qué región del genoma se encontraban. Dado que las vacunas actuales, en ese momento, contenían este tipo de CPV, nos permitiría usarla como referencia para compararla con cepas de campo y analizar nuevas mutaciones. Además, dicha información pretendía ser utilizada para atenuar por mutagénesis una cepa de campo del tipo 2c con la finalidad de incluirla en la formulación vacunal existente de Laboratorios Santa Elena.

Nos propusimos obtener la secuencia completa de la variante de campo CPV-2c para analizar señales en dicha secuencia que pudieran indicar la posible virulencia que se venía observando a nivel de campo, donde algunos animales adultos vacunados que se infectaban con la variante CPV-2c enfermaban e incluso morían (Decaro y cols, 2008a, 2009b). Este hecho era inusual ya que generalmente la parvovirus era descrita como una enfermedad de cachorros jóvenes, mientras que los perros adultos quedaban protegidos por las vacunas suministradas. Además analizamos la secuencia de la región codificante de la cepa 294 subcultivada durante 30 pasajes.

La amplificación del genoma completo de parvovirus canino es compleja, lo cual queda demostrado por las pocas secuencias completas (región codificante más extremos) disponibles en la base de datos GenBank. A esto se suma que los extremos en forma de horquilla evidentemente quedan inaccesibles a las Taq polimerasas. En consecuencia, se realizaron una variedad de abordajes para intentar conseguirlo. Para simplificar y organizar el trabajo se realizó en tres

partes: en primer lugar se amplificó la región codificante, genes no estructurales y estructurales; en segundo lugar se trabajó en el extremo 3' y en tercer lugar nos ocupamos del extremo 5'.

La región codificante de las cuatro cepas en estudio, CPV-2 Cornell atenuada y salvaje, CPV-2c 294MF y CPV-2c 294 p30, fue amplificada en varias reacciones de PCR, obteniéndose los 4266 nucleótidos esperados.

El extremo 3' se logró amplificar una vez realizada la extracción de Hirt, de ADN de bajo peso molecular detallada en el punto 4.1.4.3 de materiales y métodos. Durante la replicación del parvovirus canino, el genoma simple hebra se convierte en una forma replicativa doble hebra (RF), que funciona tanto como molde para la síntesis de ARN mensajero como un intermediario de la síntesis de ADN de la progenie viral (Siegl y cols, 1985). El punto clave de esta técnica es cosechar el virus a las pocas horas de infección por ejemplo, 24 o 48 hs, cuando el ECP se observa en un 10 o 20% de la monocapa. En la figura 18 se puede observar una banda fuerte entre 5000 y 6000 pb, obtenida luego de la extracción de Hirt y post tratamiento con RNasa para la cepa CPV-2c 294MF que representa el intermediario replicativo doble hebra.

Por otra parte, para la cepa CPV-2 Cornell salvaje y la cepa CPV-2c 294p30 no se amplificaron los primeros 248 y 263 nucleótidos, respectivamente, correspondientes al extremo 3'.

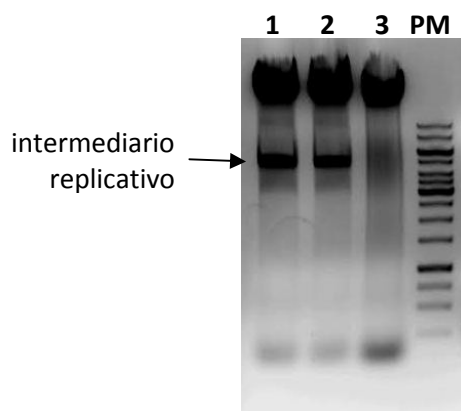


Figura 18. Gel de agarosa mostrando la extracción de las formas replicativas por el método de HIRT. Muestras 1 y 2 extracción de rollers infectadas con CPV-2c 294MF y muestra 3: control de células sin infectar. PM: 1 Kb Fermentas. La flecha indica el intermediario replicativo.

Sin embargo, el extremo 5' fue imposible de amplificar pese a todas las estrategias ensayadas. Se intentaron numerosas PCR con varias combinaciones posibles de cebadores y varias Taq polimerasas de diferentes fidelidades e incluso distintos proveedores, no obteniendo los resultados esperados. Se intentaron datos aportados por la bibliografía como la PCR con 1 solo cebador, la PCR con 10 veces más de 1 cebador respecto del otro, diferentes concentraciones de DMSO, sin éxito.

Tomando en consideración la codificación descrita para la secuencia de la cepa de referencia CPV-N (NC_001539, (Reed y cols, 1988), la figura 19 resume los nucleótidos secuenciados para cada una de las cepas estudiadas. De la misma se desprende el largo total de la región secuenciada para cada una de las cepas y los nucleótidos secuenciados correspondiente a cada uno de los extremos. Se obtuvo la secuencia completa del extremo 3' para las cepas CPV-2c 294 MF y para la cepa CPV-2 Cornell atenuada. Por otra parte, se logró la secuenciación de 275, 302 y 280 nucleótidos correspondientes a la secuencia post-codón stop de VP2 de las cepas 294 (MF y p30), Cornell atenuada y Cornell salvaje, respectivamente. En definitiva, restan por amplificar los primeros nucleótidos de las cepas CPV-2c 294p30 y CPV-2 Cornell salvaje, y 511, 484 y 506 nucleótidos de la región 5' para 294 (MF y p30), Cornell atenuada y Cornell salvaje, respectivamente.

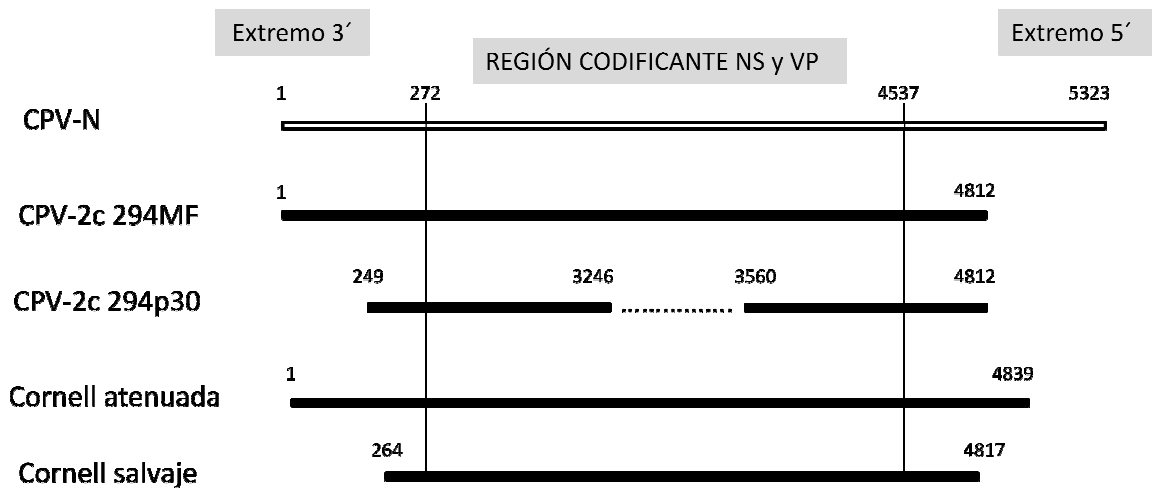


Figura 19. Región nucleotídica secuenciada de los genomas en estudio. Se diferencian los tramos de los extremos 3', 5' y la región codificante que abarca los nucleótidos que codifican para proteínas no estructurales y estructurales. La cepa de referencia utilizada para la ubicación de los nucleótidos es la cepa CPV-N, NC_001539 (Reed y cols, 1988). La zona punteada en CPV-2c 294p30 indica la región nucleotídica que no se logró secuenciar.

Para la exploración de las regiones codificantes amplificadas, realizamos 3 análisis por separado. En primer lugar, comparamos las secuencias obtenidas de las cepas CPV-2 Cornell atenuada y Cornell salvaje. En segundo lugar, realizamos la comparación de las secuencias de las cepas 294MF y 294 subcultivada durante 30 rondas de replicación. Por último, comparamos la secuencia amplificada de la muestra de campo CPV-2c 294MF con 82 secuencias completas de tipo CPV-2c disponibles en GenBank .

En el primer caso, comparando las regiones codificantes de las cepas CPV-2 Cornell vacunal atenuada y CPV-2 Cornell salvaje se detectaron 5 variaciones nucleotídicas en el gen NS1, que se

tradujeron en 3 aminoácidos no sinónimos, ver tabla 6. En el gen VP1 se encontró 1 mutación nucleotídica perteneciente a un codón no sinónimo, mientras que en el gen VP2, se hallaron 5 cambios nucleotídicos correspondiendo solo 1 de ellos a un codón sinónimo.

Tabla 6. Variaciones nucleotídicas y aminoacídicas entre las cepas de CPV-2 Cornell atenuada y Cornell salvaje. La cepa de referencia para designar las posiciones de nucleótidos y aminoácidos fue la CPV-N (NC_001539) (Reed y cols, 1988). Solo se indica el aminoácido correspondiente a mutaciones no sinónimas.

	NS1/ NS2					VP1	VP2				
Nucleótidos.	1327- 1329	1462- 1464	1477- 1479	1609- 1611	1720- 1722	2410 2412	2914- 2916	3325- 3327	3412- 3414	3415- 3417	4033- 4035
Aminoácidos	443	488	493	537	574	133	134	271	300	301	507
Cornell salvaje	ATT (Ile)	GAA	GTG	GCA (Ala)	GTA (Val)	ACA (Thr)	AGT (Ser)	AAA (Lys)	GCT (Ala)	ACT (Thr)	ACA
Cornell atenuada	G.. (Val)	..G	..A	T.. (Ser)	A.. (Ile)	G.. (Ala)	.A. (Asn)	.G. (Arg)	.A. (Asp)	.T. (Ile)	..G

Como se mencionó en el punto anterior, la muestra CPV-2c 294MF fue subcultivada durante 45 pasajes. En el pasaje 30 se amplificó y secuenció la región codificante, donde no se logró secuenciar una región de 314 nucleótidos correspondientes al gen VP2. La secuencia obtenida de dicho pasaje 30 presentó únicamente 2 variaciones nucleotídicas que dieron lugar a 2 modificaciones aminoacídicas respecto a la cepa original como puede observarse en la tabla 7.

Tabla 7. Diferencias de nucleótidos y aminoácidos entre las cepas CPV-2c 294MF y 294p30.

	VP2	
Nucleótidos.	3568- 3570	3637 3639
Aminoácidos	352	375
CPV-2c 294 MF	CCA (Pro)	GAT (Asp)
CPV-2c 294 p30	T.. (Ser)	A.. (Asn)

Por último, se comparó la región codificante de la variante CPV-2c-294MF con 82 secuencias de cepas del tipo CPV-2c completas presentes en GenBank. En la tabla 8 se muestran únicamente las diferencias aminoacídicas de VP2 de aquellas muestras que presentaron mutaciones respecto a la cepa CPV-2 294MF. En los anexos 2 y 3 se presentan las variaciones en NS y en VP1, respectivamente, entre las 82 cepas. Se observó una alta variabilidad dentro de los genomas que se tradujo en una alta variabilidad aminoacídica. Se encontraron varias mutaciones

de aminoácidos no sinónimos: 33 en NS, 14 en VP1 y 22 en VP2. A pesar de todo la muestra CPV-2c 294MF no presentó variaciones que no hayan sido reportadas anteriormente.

En cuanto a la exploración de las regiones no codificantes del genoma de CPV observamos que las cepas CPV-2c 294 MF y CPV-2 Cornell atenuada, presentaron idéntica secuencia en los 272 nucleótidos correspondientes al extremo 3'.

Por otra parte, analizamos la presencia de los grupos de repetidos en la región 5' no traducida de las 3 cepas, la CPV-2c 294MF, la cepa Cornell vacunal y la cepa Cornell salvaje, observando que las cepas Cornell atenuada y salvaje presentan el primer doble repetido. No pudimos analizar el grupo de triples repetidos ya que no obtuvimos su secuencia por completo. Para una mejor identificación de estos repetidos ver figura 7.

Tabla.8. Diferencias aminoacídicas en la proteína VP2 de CPV-2c.

Aminoácidos	VP2																					Autor	
	5	13	14	114	131	139	154	172	216	235	262	267	297	322	324	370	415	427	440	447	452		579
294 MF	Ala	Pro	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ser	Arg	Gly	Ala	Phe	Ala	Thr	Tyr	Gln	Ile	Asp	Thr	Ile	Gly	Ala	Blanc tesis
CU21	Gly	Tyr	.	.	Ile	Arg	Tangwangvivat y cols, 2019
CU24	Gly	Tyr	.	.	Ile	Arg	Tangwangvivat y cols, 2019
5 MGL	Gly	Tyr	.	.	Ile	Arg	Temuujin y cols, 2018
UY346	.	Ser	Perez y cols, 2014
UY349	Thr	Perez y cols, 2014
UY326	Ser	.	Perez y cols, 2014
UY318	Ile	Ala	Perez y cols, 2014
UY261	.	Ser	Perez y cols, 2014
UY242	.	Ser	Perez y cols, 2014
UY190	.	.	Thr	Perez y cols, 2014
UY152	Met	.	.	Perez y cols, 2014
UY101	.	.	Thr	Val	Perez y cols, 2014
UY95	.	Ser	Gly	Perez y cols, 2014
UY55	.	.	.	Thr	Perez y cols, 2014
UY52	Asp	Perez y cols, 2014
UY47	Pro	Perez y cols, 2014
UY12	Asp	Perez y cols, 2014
UY375	.	Ser	Perez y cols, 2014
UY269	Ala	.	.	.	Perez y cols, 2014
UY196	Ala	.	.	.	Perez y cols, 2014
UY181	Ala	.	.	.	Perez y cols, 2014
UY21	Gly	Perez y cols, 2014
E32	Ile	Grecco y cols, 2014
E26	Ile	Ser	.	.	.	Grecco y cols, 2014
E13	Ile	Grecco y cols, 2014
ARG71	Glu	Ala	.	.	.	Grecco y cols, 2014
ARG68	Asn	Grecco y cols, 2014
Arg-66	Ala	.	.	.	Grecco y cols, 2014
LW	Met	Hemmatzadeh y cols, 2016

4.2.4 Análisis de variantes domésticas y salvajes de CPV de Brasil

En el caso de los animales silvestres, 3 de 27 muestras resultaron positivas para CPV por PCR, lo cual representa un total de 11.1% de las muestras analizadas. Loas 3 muestras para las cuales se logró amplificar por PCR el gen completo de VP2 provenían de: *Chrysocyon brachyurus* (aguará guazú), *Leopardus tigrinus* (leopardo tigre), *Cerdocyon thous* (zorro cangrejero). De las 3 muestras positivas, únicamente se obtuvo la secuencia completa de gen VP2 correspondiente a un aguará guazú, que presenta el aminoácido Aspartato en el sitio 426 lo cual indica que es una variante del tipo CPV-2b. Para las otras 2 muestras, únicamente se logró obtener la secuencia de un fragmento de 300 pb correspondiente al gen NS que al ser analizado en el programa BLAST presentó un 99% de homología con cepas brasileiras del tipo 2b del año 2013.

Cuando comparamos la secuencia completa del gen VP2 del aguará guazú con la secuencia completa de la cepa prototipo CPV-2 (M38245) y la cepa prototipo CPV-2b (M74849) se encuentran los típicos aminoácidos correspondientes a las variantes del tipo 2b que se detallan en la tabla 9. También se reportan cambios en los aminoácidos menos frecuentes Ser297Asn y Tyr324Leu.

Tabla 9- Mutaciones presentes en la secuencia de la proteína VP2 de CPV-2b del aguará guazú comparado con cepas prototipo CPV-2 (M38245) y CPV-2b (M74849).

PROTEÍNA VP2									
Nucleótidos .	259– 261	301– 303	889– 891	898– 890	913– 915	970– 972	1123– 1125	1276– 1278	1663– 1665
Aminoácidos	87	101	297	300	305	324	375	426	555
CPV-2 (M38245)	ATG (Met)	ATT (Ile)	TCT (Ser)	GCT (Ala)	GAT (Asp)	TAT (Tyr)	AAT (Asn)	AAT (Asn)	GTA (Val)
CPV-2b (M74849)	T.. (Leu)	.C. (Thr)	... (Ser)	.G. (Gly)	T.. (Tyr)	... (Tyr)	G.. (Asp)	G.. (Asp)	... (Val)
Aguará Guazú	T.. (Leu)	.C. (Thr)	.A. (Asn)	.G. (Gly)	T.. (Tyr)	.TA (Leu)	G.. (Asp)	G.. (Asp)	... (Val)

En el caso de las muestras de caninos de Brasil se analizaron 41 muestras, de las cuales 32 resultaron positivas por PCR (78%). En la gráfica a continuación (Figura 20) se muestra la distribución de muestras positivas y negativas según la edad, donde se puede observar un mayor porcentaje de positivos en los perros de menor edad dentro de la población estudiada. Los perros adultos con parvovirus probablemente no fueron vacunados o presentaban un esquema de vacunación incompleto, pero carecemos de esos datos.

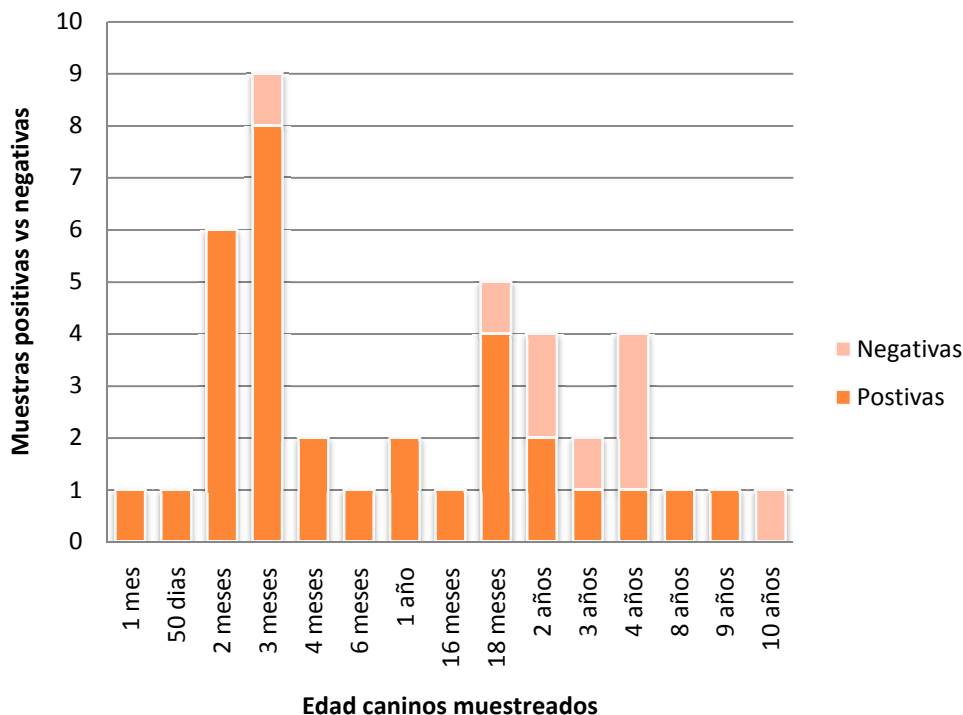
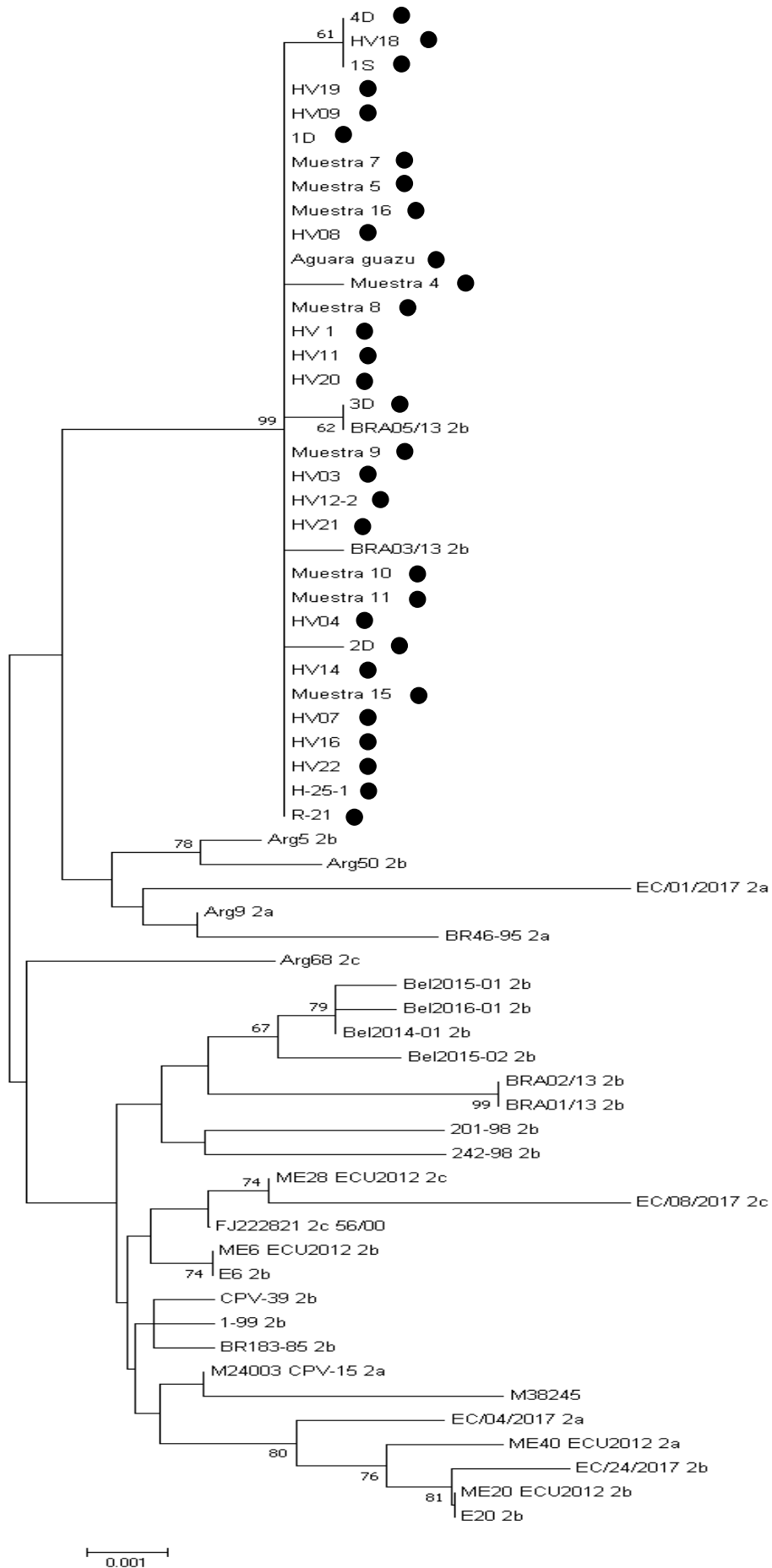


Figura 20. Gráfica de la distribución de las muestras de perros analizadas por edades.

Todas las cepas analizadas para los efectos de esta tesis son idénticas a nivel aminoacídico, sin embargo hay varias mutaciones de nucleótidos silenciosos. Sólo 7 de las 32 muestras presentan estas mutaciones, donde prevalece la reversión de T por C en 3 de los 5 cambios, mientras que los otros cambios son A x G y G x A. Por otra parte, la cepa del animal silvestre aguará guazú cuya secuencia resultó ser idéntica a las muestra de los perros se trataba de un animal que estaba en cautiverio.

Se construyó un árbol filogenético que incluye cepas regionales de Brasil, Argentina, Ecuador y cepas prototipo de cada subtipo de CPV, ver figura 21. El árbol presenta 2 grandes clados, en uno de ellos se encuentran todas las cepas de caninos y del aguará guazú, provenientes de Brasil trabajadas en esta tesis, junto a 2 cepas de Brasil del año 2013 reportadas en GenBank, con un soporte estadístico de 99%. Este clado comparte ancestro con cepas 2b de Argentina y 2a de Argentina, Ecuador y Brasil. Por otro lado, el otro clado presenta un ancestro y una mezcla de clados 2a, 2b y 2c.

Figura 21. Arbol filogenético del gen VP2 de las muestras de caninos y del animal silvestre, aguará guazú, de Brasil. Los puntos negros indican las muestras obtenidas en esta tesis



4.3 DISCUSIÓN

Al comienzo de esta tesis, en el año 2010, junto con colegas del Laboratorio Santa Elena (hoy Virbac Uruguay) nos planteamos la necesidad de evaluar las muestras que les llegaban como reclamos de la vacunación, provenientes de caninos con sintomatología clínica típicos de parvovirus, como diarrea sanguinolenta, vómitos, decaimiento, fiebre.

Se analizaron un total de 13 muestras de materia fecal, donde todas resultaron positivas por PCR y presentaron un patrón de RFLP compatible con la variante CPV-2c. El análisis de las secuencias indicó que todas ellas presentaron en la posición 426 de la proteína VP2, el codón GAA que codifica para el aminoácido glutamato, y que se corresponde con la nueva variante circulante CPV-2c. El residuo aminoacídico 426 se sitúa en el principal sitio antigénico sobre la espícula en el eje triple de la cápside y este cambio diferencia a CPV-2c (Glu) de CPV-2b (Asp) y CPV-2a (Asn). Además, el análisis filogenético basado en este fragmento confirmó que nuestras muestras se agruparon con otras cepas CPV-2c (Anexo 1). Este resultado coincide con los datos de prevalencia publicados en ese momento para Uruguay (Pérez y cols, 2007) y la región (Gallo Calderón y cols, 2011), obtenidos por biología molecular. Sin embargo, Maya y cols, reportaron que en el año 2010 emergió una variante CPV-2a con un 38% de prevalencia, que aumentó a 85% para el año 2011 (Maya y cols, 2013). Evidentemente las 13 muestras analizadas en esta tesis representaron un brote de una región puntual de Canelones y no representaron un análisis a nivel país como lo hicieron en el trabajo de Maya. Por otra parte, en la construcción filogenética de la publicación presentada en el Anexo 1 se vio que las cepas uruguayas CPV-2c se encuentran más relacionadas con las cepas CPV-2b y CPV-2a que con la cepa CPV-2 contenida en la vacuna. Estos resultados plantearon la inquietud acerca de la eficiencia de las vacunas actuales contra esa variante y reforzaron la necesidad de una vacuna actualizada con las variantes circulantes como sugieren muchos autores hoy en día.

En este sentido, en el marco de este trabajo de tesis se realizó el aislamiento viral de las muestras de Canelones en la línea canina A-72, y la que logró la adaptación, la muestra 294 MF, fue nuestro objeto de estudio en buena parte de esta tesis. Reportamos el primer aislamiento en cultivo celular de esta variante en nuestro país en el año 2011 (ver anexo 1).

La adaptación al cultivo celular de dicha muestra fue tan exitosa que se subcultivó hasta 45 pasajes. Cada 5 pasajes se confirmó por PCR y RFLP la presencia de CPV-2c. En el pasaje 30 se analizó la región nucleotídica correspondiente a la proteína VP2 completa y al compararla con la muestra original, únicamente se observaron 2 cambios de nucleótidos que se tradujeron en cambios de aminoácidos en los sitios 352 y 375: Pro352Ser y Asp375Asn. La mutación Pro352Ser, no ha sido descrita anteriormente en la literatura, pero al no encontrarse dicho residuo expuesto

en el loop de la proteína inmunogénica VP2 es probable que no revista mayor importancia. Sin embargo, el aminoácido Asparagina en el sitio 375 se encuentra descrito en la literatura como un marcador de cepas del tipo CPV-2, sin embargo en el trabajo de Zhou (Zhou y cols, 2017), analizando 1270 cepas de parvovirus canino vieron que la mutación Asp375Asn se encuentra tanto en cepas CPV-2 originales como en las variantes y por tanto ya no sirve como marcador.

Además de evaluar la adaptación de la cepa de campo CPV-2c 294MF en cultivo celular, pretendíamos evaluar su posible atenuación mediante el pasaje en cultivos de tejidos, con la finalidad de poder incluir esta variante en la formulación existente en ese momento en Laboratorios Santa Elena, de la cual el laboratorio de Virología de Facultad de Ciencias había participado en el desarrollo de la porción antigénica viral. Pero cambios en los lineamientos de la mencionada empresa no permitieron realizar los ensayos en perros por lo cual este trabajo se terminó en ese punto.

En nuestro interés por dilucidar cambios importantes en los genomas que puedan estar relacionados con las propiedades biológicas del virus pretendimos secuenciar los genomas completos de las cepa presente en la vacuna nacional (CPV-2 Cornell atenuada), la variante de campo CPV-2c 294MF y la cepa CPV-2 Cornell salvaje.

Comparando la región codificante (proteínas no estructurales y estructurales) de las cepas CPV-2 Cornell salvaje y Cornell atenuada encontramos mutaciones a nivel de nucleótidos, donde varias de ellas se tradujeron en codones no sinónimos. En lo que respecta a NS1 y NS2 no existen prácticamente reportes sobre variaciones dentro de estas proteínas, dado que los estudios sobre variabilidad genética están enfocados en la proteína antigénica VP2. En este sentido, cuando analizamos la proteína VP2 de las cepas CPV-2 Cornell salvaje y CPV-2 Cornell atenuada observamos 4 cambios aminoacídicos en la segunda respecto a la primera, Ser134Asn, Lys271Arg, Ala300Asp y Thr301Ile. Los cambios en los residuos aminoacídicos 271, 300 y 301 fueron reportados anteriormente en un mutante de CPV derivado de 102 pasajes en células primarias de riñón canino y 10 pasajes en la línea celular felina NFLK (Parrish & Carmichael, 1986). Los cambios en los residuos 300 y 301 fueron relacionados con la pérdida del rango de huésped canino *in vitro*, no así el cambio 271 que cuando estuvo presente en una muestra permitió la replicación en las células caninas A-72 (Parrish & Carmichael, 1986). Si bien desconocemos el proceso de atenuación de esta cepa, es probable que derive de dicho mutante o haya sido procesada de la misma forma.

Por su parte, comparamos la secuencia codificante de la muestra CPV-2c 294MF con 82 secuencias publicadas en GenBank, donde encontramos mutaciones entre 29 cepas que son las representadas en la tabla 8. La muestra CPV-2c 294MF no presentó mutaciones nuevas, pero al compararla con las mencionadas secuencias se encontró una alta variabilidad tanto a nivel

nucleotídico como aminoácido. En el caso de las proteínas NS y VP1, como se indicó en la comparación de las cepas CPV-2, no existen casi reportes que discutan la importancia de dichos cambios por lo cual desconocemos la importancia a nivel de comportamiento biológico del virus. En cambio, se encontraron 22 diferencias aminoacídicas en la proteína VP2 que está conformada por un total de 584 aminoácidos. Diez de las veintidos diferencias aminoacídicas se presentan en el lazo GH, entre los aminoácidos 267 y 498 (ver figura 4). Esta región, denominada lazo GH, ha sido descrita como la región de mayor variabilidad entre los parvovirus (Chapman & Rossmann, 1993).

Las mutaciones Ala5Gly, Pro13Ser, Ala14Thr, Ala114Thr, Asn131Asp, Val139Ile, Ser154Thr, Ser172Pro, Arg216Gly, Gly235Asp, Ala262Gly, Ala579Val se encuentran en una posición del genoma que aparentemente no tendrían relevancia en el comportamiento biológico del virus, ya que quedan hacia dentro de la cápside viral, sin embargo varios autores consideran que sería importante investigar el potencial funcional de dichos sitios más en profundidad (Aldaz y cols, 2013; Wang y cols, 2016).

Por otro lado, analizando la región de alta variabilidad del lazo GH se desprenden las siguientes consideraciones: la mutación Phe267Tyr se encuentra en una posición al inicio del lazo GH, que no afectaría la antigenicidad del virus por hallarse en una región que no queda expuesta en la superficie de la cápside viral. Esta mutación fue observada en Vietnam (Nakamura y cols, 2004), China (Zhang y cols, 2010; Han y cols, 2015; Xu y cols, 2015; Zhao y cols, 2015), India (Mukhopadhyay y cols, 2014), Uruguay (Pérez y cols, 2012; 2014) y Portugal (Miranda y cols, 2016a).

La mutación Ala297Asn fue reportada por Grecco y cols, en una cepa Argentina, sin embargo, el grupo de Pereira y cols, 2007 determinó que el sitio 297 se encuentra bajo presión selectiva positiva e indicó que la mutación Ser297Ala sugiere una ventaja selectiva que conlleva a un proceso de adaptación local continua (Pereira y cols, 2007).

Por su parte, la mutación Tyr324Ile fue reportada en China (Zhang y cols, 2010; Zhong y cols, 2014; Geng y cols, 2015; Han y cols, 2015; Xu y cols, 2015; Zhao y cols, 2015; Yi y cols, 2016), Korea (Jeoung y cols, 2008; Yoon y cols, 2009), Tailandia (Phromnoi y cols, 2010), Japón (Soma y cols, 2013), Taiwan (Lin y cols, 2014), India (Mittal y cols, 2014; Mukhopadhyay y cols, 2014), Uruguay (Pérez y cols, 2012; 2014) y Hungría (Cságola y cols, 2014). El residuo aminoacídico 324 se encuentra bajo presión selectiva positiva (Hoelzer y cols 2008b) y está adyacente al residuo 323 conocido por estar involucrado en el rango de huésped y el tropismo por intermedio del receptor de transferrina canino (Hueffer & Parrish, 2003). Además se encontró la mutación Thr322Ala, lo

cual hace pensar que de presentarse las mutaciones 322 y 324 en una misma muestra pueden llevar a un cambio que podría estar involucrado en el tropismo y cambio de rango de huésped.

La mutación Gln370Arg también fue observada en el panda gigante en China (Guo y cols, 2013) y en cepas CPV-2c en China (Geng y cols, 2015; Zhao y cols, 2015). El aminoácido 370 se ubica entre los residuos 359 y 375, el cual se considera un loop flexible de la cápside que está adyacente a un sitio de unión de Calcio doble, y que fue encontrado como esencial para la infectividad viral. Los cambios en este sitio también se han correlacionado con la habilidad del virus para hemoaglutinar eritrocitos (Simpson y cols, 2000).

El aminoácido 440 es el único que presenta 2 posibles mutaciones; Thr440Ala y Thr440Ser. El cambio Thr440Ala ha sido descrito en cepas CPV-2a y CPV-2b de Europa, Asia y Sudamérica (Battilani y cols, 2002; Chinchkar y cols, 2006; Pereira y cols, 2007; Kang y cols, 2008) y en cepas CPV-2c de América del sur y del norte (Kapil y cols, 2007; Gallo Calderón y cols, 2011). En el trabajo de Zhou y cols, 2017 realizaron un modelado molecular de la proteína VP2 en el cual demostraron que el residuo aminoacídico 440 se localiza en el loop 4, cuyo sitio superior consiste de los aminoácidos 422 a 428 y 433 a 443. En mi opinión este es un sitio que merece un seguimiento especial por la ubicación en la cápside viral y por la variabilidad que presenta.

La mutación en el sitio 427, Asp427Glu, se encontró únicamente en una cepa argentina pero debido a que se encuentra junto al residuo 426, el principal sitio antigénico de CPV, merecería un relevamiento especial.

La mutación Ile415Met se encontró en una cepa de Australia que únicamente fue reportada en GenBank, no existiendo una publicación que la refiera, mientras que las mutaciones Ile447Met y Gly452Ser fueron reportadas cada una en una cepa de Uruguay. Las tres se ubican en lugares de la proteína VP2 que no quedarían expuestos en la cápside viral por lo cual no serían de importancia a nivel funcional de todos modos sería conveniente profundizar también en estos sitios.

En su conjunto estos resultados remarcan la alta variabilidad genómica del parvovirus canino y consideramos que este trabajo ha contribuido al aporte de información referido a búsqueda de nuevas mutaciones. Sería imperioso poder relacionar estas mutaciones con cambios en las propiedades biológicas del virus y poder realizar inferencias que se adelanten a lo que pueda ocurrir con aparición de nuevas variantes.

El genoma del parvovirus canino tiene la particularidad de que presenta repetidos terminales invertidos en los extremos que forman estructuras en horquilla, con forma de Y en el extremo 3' y forma de U en el extremo 5'. El extremo 3' sirve como origen de replicación y

contiene elementos que actúan en cis y señales de empaquetamiento (Parrish, 1991; Horiuchi & Shinagawa, 1993). En GenBank existen pocas secuencias completas de CPV porque es muy difícil obtener por PCR los extremos en horquilla palindrómicos. Es por ello que desarrollamos varias estrategias para amplificar esta región, logrando únicamente amplificar el extremo 3', luego de obtener la forma replicativa del parvovirus mediante una extracción del genoma especial, sin embargo no pudimos obtener la secuencia completa del extremo 5'.

Otra característica del parvovirus es la reiteración de la secuencia de ADN en la región no traducida del extremo derecho del genoma. Hay 2 repeticiones de 62 nucleótidos separadas y no relacionadas en el extremo 5' no traducido. Una (repetida 2 veces) flanquea al codón stop y la otra repetición de 62 nucleótidos (repetida 3 veces) se ubica corriente abajo del final de la primer repetición (Reed y cols, 1988). Nuestra muestra CPV-2c 294MF y esta misma muestra luego de 30 pasajes en cultivos (294 p30), solo presentan 1 repetido de 62 nucleótidos del primer par, mientras que la cepa Cornell atenuada y la salvaje presentan ambos monómeros del primer repetido. Reed y cols, (Reed y cols, 1988) publicó que el doble repetido se da en las cepas que se han adaptado a cultivos y en nuestro caso la 294 MF es muestra clínica por lo que sería correcto que solo presente un repetido, sin embargo, la secuencia de la muestra 294 p30 continua sin presentar este segundo monómero esperado como dice la bibliografía para cepas adaptadas a cultivos celulares. En el caso de la cepa Cornell salvaje y atenuada, ambas provienen de cultivos celulares, sin embargo desconocemos la cantidad de pasajes que podría presentar la cepa salvaje para haber adquirido esos monómeros que luego mantuvo en las etapas de atenuación.

Por otra parte, considerando el objetivo referido al análisis de muestras de animales domésticos y silvestres de Brasil, cabe mencionar que la población humana ha aumentado en áreas suburbanas haciendo que aumente el contacto entre animales domésticos y silvestres, facilitando la transmisión de diversas enfermedades entre ellos.

En este trabajo secuenciamos el gen que codifica para la proteína VP2 de CPV a partir de la muestra de un animal silvestre, aguará guazú. También amplificamos dicha región para otras 2 muestras de animales silvestres, zorro cangrejero y leopardo tigre, pero no logramos obtener la secuencia, probablemente por una baja carga viral al momento de toma de muestra o una infección no tan reciente. Si bien CPV es conocido por ser un virus resistente también podría deberse a degradación de la muestra en el transporte, ya que las mismas son provenientes de Minas Gerais, Brasil.

Existen varios reportes de exposición al parvovirus canino en animales silvestres en Brasil, como zorro cangrejero (crab-eating fox- *Cerdocyon thous*), aguará guazú (maned-wolf- *Chrysocyon*

brachyurus), zorro del género *Lycalopex* (hoary fox- *Lycalopex vetulus*), mofeta (skunk- *Conepatus semistriatus*), yaguarundi (Jaguarundi- *Herpailurus yagouaroundi*), gato montés (pampas cat- *Leopardus colocolo*), ocelotes (ocelots- *Leopardus pardalis*), puma (*Puma concolor*), zorro gris (pampas fox- *Lycalopex gymnocercus*)(de Almeida Curi y cols, 2010, 2012; Furtado y cols, 2016). Todos estos trabajos publicados hasta la fecha refieren a prevalencia de anticuerpos en muestras de sueros, donde dicha prevalencia varía entre 49 y 100%. Sin embargo, a nivel molecular los datos son escasos y para nuestro conocimiento no se ha reportado secuencia nucleotídica de muestras pertenecientes a animales silvestres en Brasil. En la base de datos GenBank no hay información de secuencias nucleotídicas provenientes de la especie *Crysocyon brachyurus* en el mundo, por lo cual nuestra secuencia sería el primer reporte en carnívoros silvestres de esta especie.

Todas las muestras de caninos junto a la del aguará guazú presentan el aminoácido 426 Asp, característico de las variantes de CPV del tipo 2b. Esta variante circula en el mundo hace más de 30 años, y ha sido identificada en Europa, Asia, África, Oceanía y América. Ha aparecido con alta frecuencia en Reino Unido, USA, Taiwán y Japón (Decaro & Buonavoglia, 2012). En Sud América ha sido reportada en Argentina (Gallo Calderón y cols, 2012), Brasil (Pereira y cols, 2007), y Ecuador (Aldaz y cols, 2013).

Todas las secuencias de caninos y el aguará guazú de Brasil, obtenidas en esta tesis, presentan una alta homología de secuencia nucleotídica y se agrupan en un mismo clado en el árbol filogenético. Junto a nuestras muestras se agrupan 2 cepas brasileñas (BRA05/13 y BRA03/13) obtenidas en el año 2013 por Grecco y cols, obtenidas muy cercanas en el tiempo a las de la tesis que son del año 2011. Esto podría indicar que fue la cepa circulante prevalente en esos años en esta región de Brasil, y que la alta circulación en caninos pudo extenderse a animales silvestres que compartían hábitat con ellos.

El análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas muestra variaciones puntuales que no representan cambios en el aminoácido correspondiente. Esto se fundamenta en las altas tasas de sustitución a nivel genético que presenta el genoma de CPV (Shackelton y cols, 2005).

Analizando las secuencias aminoacídicas de perros y la del animal silvestre aguará guazú, vemos que son idénticas entre sí, con la característica de presentar todas ellas las variaciones no tan comunes Ser297Asn y Tyr324Leu. Junto a las secuencias de esta tesis se agruparon y con muy alta homología de secuencias, 2 cepas Brasileñas Bra05/13 y Bra03/13 que también presentan estas variaciones. La mutación Ser297Asn ha sido reportada anteriormente como una mutación única para aislados de Sud América (Gallo Calderón y cols, 2012). Son pocas las cepas reportadas hasta el momento pero se la encuentra indistintamente dentro de las 3 variantes de parvovirus

canino: Gallo Calderón y cols, 2012- Argentina (CPV-2a, Arg9.2003; CPV-2b, Arg5.2003, CPV-2c, Arg68); De la Torre y cols, 2018- Ecuador (CPV-2a- Ec/01/2017); Pereira y cols, 2007-Brasil (CPV-2a Br46-95) (Pereira y cols, 2007; Gallo Calderón y cols, 2012; De la Torre y cols, 2018). Pereira y cols, 2007 y Gallo Calderón y cols, 2012 reportaron que el residuo 297 se encuentra bajo una fuerte selección positiva. No está claro que funciones puede estar alterando este residuo 297 de VP2, ya que no se ha detectado variación antigénica en los virus que tienen esta mutación, pero se ubica cerca de residuos de VP2 como 299 y 300 que controlan la unión al receptor de transferrina canino TfR, sugiriendo que puede afectar esta función (Hoelzer & Parrish, 2010).

Además de las típicas variaciones entre variantes, encontramos un cambio aminoacídico Tyr324Leu, que si bien es de menor importancia desde el punto de vista antigénico, ha sido reportado en muestras tomadas en el mismo momento cronológico de nuestros análisis. El residuo 324 se encuentra adyacente al residuo 323, que afecta la unión al receptor TfR. Se ha demostrado que los residuos 93 y 323 son los más importantes en controlar el rango de huésped de CPV-2 (Hueffer y cols, 2003). El aminoácido Tirosina es el más encontrado en la posición 324, sin embargo Silva y cols, detectaron 3 cepas CPV-2b con el cambio Tyr324Leu, siendo el primer reporte de Brasil y del mundo (Silva y cols, 2017). Estas muestras fueron recolectadas en el año 2014-2015, mientras que esta variante ya existía en nuestra cepa recolectada en el año 2011. En Italia, Mira y cols, detectaron esta mutación en 8 muestras recolectadas en los años 2016 y 2017 (Mira y cols, 2018), lo cual indica una vez más la dispersión de las variantes en el mundo.

Podemos concluir que a pesar de que el parvovirus canino es un virus de genoma ADN y de pequeño tamaño, es un virus que presenta una alta variabilidad genética, observándose continuamente nuevas mutaciones. Estas nuevas mutaciones, como la 297Asn, que se mantienen con el tiempo, podrían ser analizadas como posibles nuevas variantes o sub variantes emergiendo en esta región de Sud América. Esto sugiere que es necesario el monitoreo continuo y la caracterización molecular de las cepas de CPV para identificar cambios genéticos y antigénicos que puedan interferir con la efectividad de la vacunas, así como proveer un mejor entendimiento de los mecanismos que dirigen la evolución de CPV.

4.4 CONCLUSIONES

- Se aisló por primera vez en Uruguay la cepa CPV-2c en cultivos celulares en el año 2010.
- El 100% de las muestras de caninos de Uruguay evaluadas durante el año 2011 correspondieron a la variante CPV-2c.
- Amplificamos aproximadamente 4800 nucleótidos de una muestra de campo CPV-2c y de la cepa presente en una vacuna nacional CPV-2 Cornell vacunal, no logrando amplificar el extremo 5' en ningún caso.
- La cepa Cornell atenuada difiere en 4 aminoácidos de la cepa Cornell salvaje en la proteína VP2 pero dichos cambios ya fueron publicados anteriormente no presentando relevancia.
- Al comparar la región codificante de la cepa CPV2c-294MF con otras cepas de GenBank se observó una alta variabilidad nucleotídica y aminoacídica
- Detectamos la variante CPV-2b en una muestra de animal silvestre, aguará guazú, siendo el primer reporte en la región y en el mundo en esta especie.
- Todas las muestras de caninos de Brasil resultaron del tipo CPV-2b y presentaron una alta homología de secuencia con el animal silvestre aguará guazú lo cual sugiere que hubo un cruce de especies.
- Las muestras brasileras de caninos y del aguará guazú presentaron las variaciones no tan comunes Ser297Asn y Tyr324Leu que ya fueron reportadas.

5. CAPÍTULO II: RESPUESTA INMUNE GENERADA POR VARIANTES DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE VP2.

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS - CLON INFECCIOSO DE CPV

Los clones infectivos datan desde hace muchos años siendo herramientas muy útiles para el mapeo genético de funciones virales específicas. Estos han permitido el análisis detallado de los genomas virales, así como han favorecido la elucidación de determinantes importantes en el rango de huésped, tropismo de tejidos y patogenicidad.

La estrategia de obtener un clon infeccioso del parvovirus canino en este trabajo se basa en la búsqueda de señales dentro del genoma que nos indiquen qué factores, aparte de las mutaciones en el aminoácido 426, pueden influir en el comportamiento biológico de este virus. Se pretende obtener un clon replicativo infeccioso de la variante de campo CPV-2c proveniente de materia fecal de muestras de caninos de nuestro país, y sobre este genoma generar mutaciones para obtener las variantes 2a y 2b, y evaluar las respuestas inmune generadas por cada variante y entre ellas. Asimismo, se generará un clon replicativo infeccioso a partir de la cepa Cornell vacunal atenuada como control.

5.1.1 Obtención de plásmido pBI265.

El plásmido pBI265 es un plásmido pGEM que contiene el clon infeccioso de CPV, cuyo genoma se corresponde con la variante original CPV-2 (Parrish, 1991) y fue cedido amablemente por el Dr. Colin Parrish de la Universidad Cornell, Colegio de Medicina Veterinaria, NY, USA. En principio este plásmido se utilizaría como control positivo para la construcción de nuestro clon infeccioso CPV-2c.

5.1.1.1 Recuperación del plásmido pBI265.

Se recibió aproximadamente 2 µg de plásmido colocado en una gota en papel filtro. Al llegar al laboratorio, se cortó el papel y se colocó en un tubo eppendorf. Se agregó 20 µL de agua de PCR, se incubó 4 hs a 50°C, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante el cual se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.1.1.2 Transformación de bacterias DH5 α

Se transformaron células *E. Coli* DH5 α (New England Biolabs, NEB, C29871) con el plásmido pBI265, a modo de obtener stock para las siguientes pruebas, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 μ L de plásmido se mezcló con 25 μ L de bacterias, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego, se realizó el shock térmico a 42°C durante 30 segundos y se colocó en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se agregó 425 μ L de medio SOC (NEB), se incubó a 37°C por 60 minutos y se sembraron placas de agar LB/ampicilina (100 μ g/mL). Se incubaron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se picaron colonias, se sembraron en 3 mL de LB/ampicilina líquido y se incubó a 37°C. Luego de 18 hs de incubación, se seleccionaron los cultivos que presentaron crecimiento y se realizó la extracción del ADN usando el kit QIAprep spin miniprep (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.1.2. Clonaje de la cepa de campo CPV-2c en el plásmido pBI265

Debido a que fue imposible amplificar los extremos del genoma de la cepa Cornell atenuada y únicamente obtuvimos el extremo 3' de nuestra variante de campo CPV-2c 294MF, sustituimos la región codificante de dicha variante en el clon infeccioso pBI265 utilizando la metodología de clonaje sin enzimas de restricción *RF cloning*, (Restriction-enzyme free cloning) detallada en la figura 22.

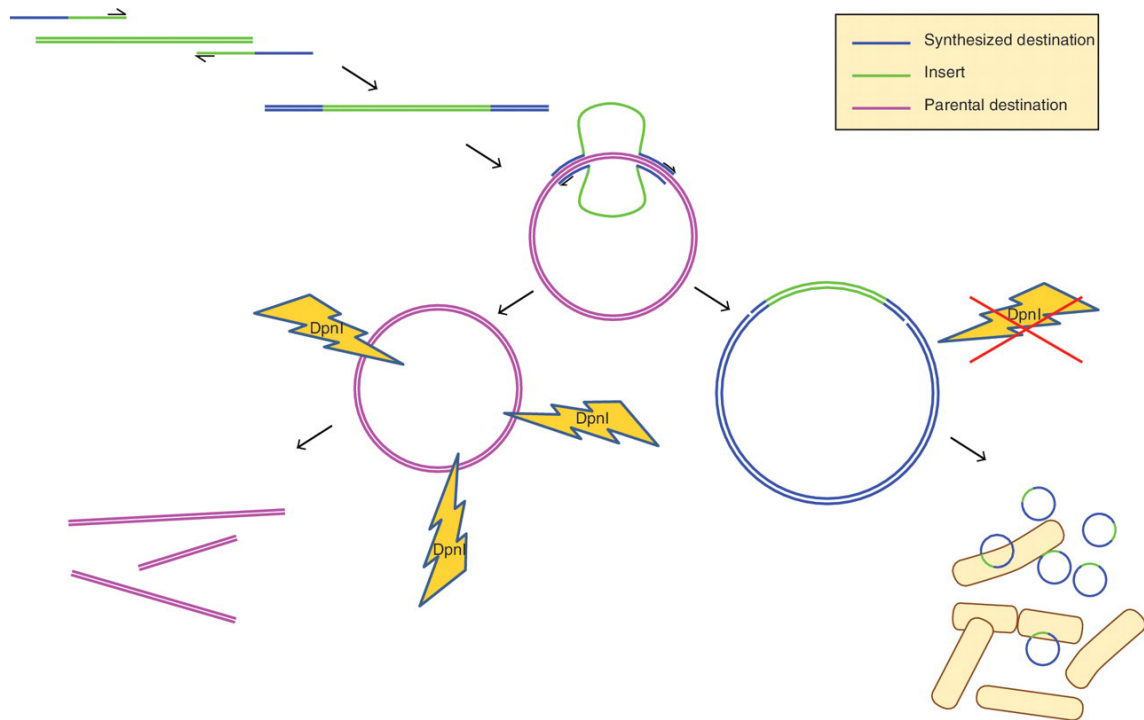


Figura 22. Esquema del protocolo de clonado libre de enzimas de restricción. Modificado de (Bond and Naus, 2012). El gen de interés es sometido a dos rondas de PCR. En primer lugar, dicho gen es amplificado por PCR utilizando un par de cebadores, cada uno contiene la secuencia blanco específica y una extensión en 5' que solapa con el sitio de inserción en el vector de destino. El producto de esta PCR (ADN doble hebra) es utilizado como un set de mega cebadores para la segunda reacción de amplificación. En este paso, cada una de las hebras de ADN se aparea al vector de destino en una región prediseñada y es extendido en una reacción de amplificación lineal. Las dos hebras de ADN nuevas forman un plásmido doble hebra con una muesca. El ADN parental metilado luego es removido por el tratamiento con la enzima DpnI y el nuevo plásmido sintetizado, que contiene el inserto de ADN es introducido en bacterias donde el ADN con muesca es sellado por actividad enzimática endógena.

5.1.2.1. Diseño de cebadores

Los cebadores para la amplificación de los fragmentos del genoma de CPV fueron diseñados en nuestro laboratorio para esta tesis, tomando como referencia la cepa M38245 (Parrish, 1991) y posteriormente fueron ordenados a IDT (Integrated DNA Technologies, USA) (ver secuencias en la Tabla 10). La región entre los nucleótidos 2358 y 2781 es idéntica en la secuencia de CPV-2 de pBI265 y en la secuencia de la muestra CPV-2c 294MF, por lo tanto no fue amplificada.

Tabla 10. Secuencias de los cebadores para la amplificación del genoma de CPV en 2 partes.

RF_273_f
5'- ATG TCT GGC AAC CAG TAT ACT GAG GAA GTT ATG GAG GGA G-3'
RF_2358_r
5'- GTC AAG ACT GTT CCC AGG CCC AAG ATA TTT ATA ACC TGG AGG CAC AAG TC-3'
For 2781 RF
5'- GGA TCC CGG TCC GAA GCG CGC GGA ATT CAA GCA CCA ATG AGT GAT GGA GCA GTT-3'
RF_4820_r
5'- AAC CAC CCA CAC CAT AAC AAC ATA CAT TAA TAG TTT ACA ATA CAT-3'

5.1.2.2. Amplificación con cebadores RF

En primer lugar se amplificaron 2 fragmentos de la región codificante de CPV-2c, partiendo de una extracción de ADN de la muestra 294MF, utilizando cebadores RF. Los 2 fragmentos fueron unidos posteriormente mediante 2 reacciones de *RF cloning* seguidas, resultando en el plásmido **pBl265-2c**. A continuación se detallan las 2 reacciones que además, utilizaron el mismo ciclado.

PCR con cebadores fragmento 1

Reactivo	Concentración f			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	35 ciclos
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	94°C	30"	
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	50°C	30"	
RF 273 for	10 µM	72°C	2'	
RF 2358 rev	10 µM			
ADN molde	10 µL			
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 µL			

PCR con cebadores fragmento 2

Reactivo	Concentración f
Buffer PCR 10X	1 X
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u
RF 2781 for	10 µM
RF 4820 rev	10 µM
ADN molde	10 µL
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U
Agua destilada c.s.p	50 µL

Una vez finalizado dicho ciclo, los productos se purificaron de gel con el kit "Nucleospin Gel and PCR clean-up" (Macherey-Nagel) según instrucciones del fabricante y se estimó la concentración para el siguiente paso.

5.1.2.3. RF cloning

Se realizaron 2 rondas de amplificación (Phusion PCR) para clonar los fragmentos 1 y 2 en el pBl265 siguiendo para cada caso la reacción que se detalla en el siguiente cuadro.

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 5X	1 X	98°C	30"	
dNTPs 10mM	0.2 mM c/u	98°C	10"	
Mega cebadores purificados	200 ng	62°C	30"	30 ciclos
ADN molde (pBI265)	40 ng	72°C	5 min	
Phusion polymerase (Finnzymes)	1,6 U	72°C	7 min	
Agua destilada c.s.p	50 µL			

Una vez finalizada cada Phusion-PCR, se corrieron 5 µL en gel de agarosa para verificar el clonaje y se continuó inmediatamente con la digestión del ADN parental (metilado) utilizando la enzima DpnI (NEB). Para ello se agregó, a 17 µL de la amplificación, 1 µL de DpnI (20 U/ µL), 2µL buffer 10X y se incubó por 1h a 37°C, luego se inactivó la enzima durante 20 minutos a 80°C. Se transformaron bacterias *E.Coli* DH5α (NEB), como ya fue descrito anteriormente en el punto 5.1.1.2., utilizando 2 µL de la digestión anterior. La secuencia insertada y el correcto sentido de inserción de los genes se confirmó mediante secuenciación.

En la primer Phusion PCR, el megacebador fue el producto del fragmento 1 (nucleótidos 273 a 2358) y el ADN molde el plásmido pBI265. La clona seleccionada por su correcta secuencia se utilizó como ADN molde para la siguiente reacción de RF clonaje donde el megacebador fue el producto del fragmento 2 (nucleótidos 2781 a 4820). Como resultado final se obtuvo el pBI265 conteniendo la región 273 a 4820 de CPV-2c: denominado pBI265-2c.

5.1.3. Transfección del plásmido pBI265-2c en células CRFK.

Se utilizó Lipofectamina® LTX (Invitrogen) por ser recomendada para transfección de ADN en células eucariotas con una alta performance de expresión de la transfección y baja citotoxicidad para la mayoría de los tipos celulares y formatos de trabajo. Además, el agregado del reactivo PLUS potencia dicha performance. El protocolo de trabajo fue el sugerido por el fabricante.

Antes de comenzar con la transfección, se preparó una placa de 6 pocillos conteniendo 5 x 10⁵ células CRFK por pocillo con MEM + 5 % TPB, 10% SFB, 1% ATB.

Para la transfección se prepararon los siguientes complejos. Se diluyó 2.5 µg de ADN en medio OptiMEM® (Invitrogen) sin suero. Se le adicionó Plus Reagent (Invitrogen) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Por otro lado, se diluyó Lipofectamina en OptiMEM® (Invitrogen) y se adicionó a la mezcla anterior incubando nuevamente 15 minutos. Durante este tiempo se lavaron las células CRFK con medio OptiMEM y se dejaron con ese mismo medio. A

continuación se adicionaron suavemente los complejos y se incubó durante 48 horas en estufa a 37°C con 5% CO₂.

5.1.4 Amplificación del posible clon infeccioso CPV-2c en células CRFK.

Para evaluar si se generó un clon infeccioso con la región codificante de CPV-2c 294MF sustituida en el plásmido pBI265, se inocularon células CRFK recientemente tripsinizadas, en placas de 12 pocillos con 2×10^5 células por pocillo, con el sobrenadante mas las células transfectadas del paso anterior. Cada 4 días, se inoculó 200 µL de sobrenadante en una nueva placa de 6 pocillos, repitiendo esto hasta obtener el cuarto pasaje.

Se realizaron 3 condiciones: 1- control de células incubadas solo con medio, 2- sobrenadante de la transfección del clon infeccioso pBI265, 3- sobrenadante de la transfección con el plásmido pBI265-2c.

Para evaluar la generación de los clones infecciosos de CPV-2c se realizó una reacción de PCR utilizando los cebadores for 1703 /rev3075 detallada en el punto 4.1.4.2 y además un ensayo de inmunofluorescencia detallado en el punto 4.1.9

5.2 RESULTADOS- CLON INFECTIVO

5.2.1. Obtención de clon infeccioso conteniendo el genoma de CPV-2c.

Los extremos en horquilla de CPV hicieron imposible la amplificación del extremo 5' de la variante de campo CPV-2c 294MF y el extremo 3' solo presentaba un nucleótido diferente. Por tanto, se clonó la secuencia codificante de CPV-2c 294MF mas una región post proteína VP2 (nucleótidos 273 a 4820) en el plásmido infeccioso pBI265. Esto se realizó en 2 rondas de clonaje por la metodología de RF cloning.

En la figura 23 A se muestran los productos de las PCR que generaron los megacebadores, observándose las bandas para los tamaños esperados, 2085 para las muestras 1 y 2, y 2039 para las muestras 4 y 5. En la primera reacción de RF cloning se insertó el fragmento 1 en el plásmido pBI265. La muestra 4 de la figura 23B fue la seleccionada para el siguiente paso por presentar idéntica secuencia que la muestra original 294 MF. En la segunda reacción de RF cloning se insertó el segundo fragmento (nucleótidos 2781-4820) en el pBI265 conteniendo el fragmento 1 (nucleótidos 273-2358). La muestra 4 de la figura 23C presentó homología de secuencia con la muestra original por lo cual fue seleccionada para la evaluación de producción de clones infecciosos. El producto obtenido fue denominado **pBI265-2c**

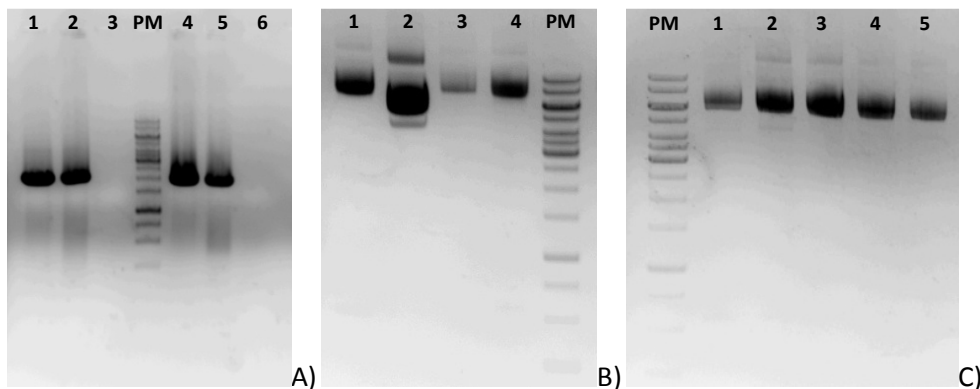


Figura 23. Geles de agarosa. A) Producto de las amplificaciones por RF cloning. Las muestras 1, 2 y 3 corresponden a amplificación con los cebadores RF273f y RF2358r. Las muestras 4, 5 y 6 corresponden a amplificación con los cebadores RF2781f y RF4820r. Las muestras 3 y 6 son controles negativos. B) Resultado de las extracciones de los plásmidos recombinantes de RF cloning 1. C) Resultado de las extracciones de los plásmidos recombinantes de RF cloning 2. El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el 1 Kb de Fermentas.

5.2.2. Amplificación de los clones infecciosos

Luego de transfectar el producto obtenido por RF cloning, pBI265-2c, se realizaron pasajes sucesivos en cultivos celulares con la finalidad de obtener clones infecciosos.

Durante las 4 rondas para intentar amplificar los clones infectivos en células CRFK, el ECP fue evidente en las células tratadas con el plásmido pBI265 (figura 24B), donde se observan células redondeadas y desprendidas, comparando con las células sin tratar (figura 24A). Sin embargo, no se observó ECP cuando se trató las células CRFK con pBI265-2c.

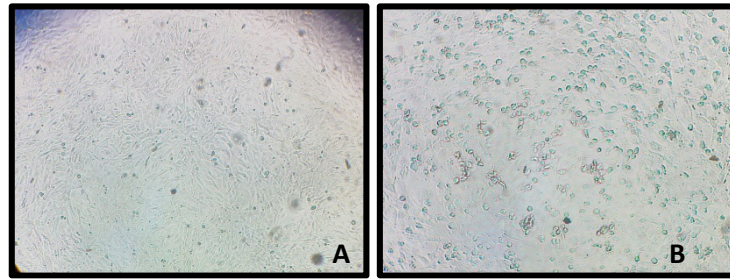


Figura 24. Observación de células tratadas con el clon infeccioso en células CRFK. A) células sin tratar B) células CRFK tratadas con el sobrenadante de la transfección con pBI265 luego de 4 pasajes.

No obstante, en el ensayo de fluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal específico para CPV realizado a las células tratadas se ve señal, aunque tenue, en ambos clones (figura 25E para pBI265 y 25F para pBI265-2c).

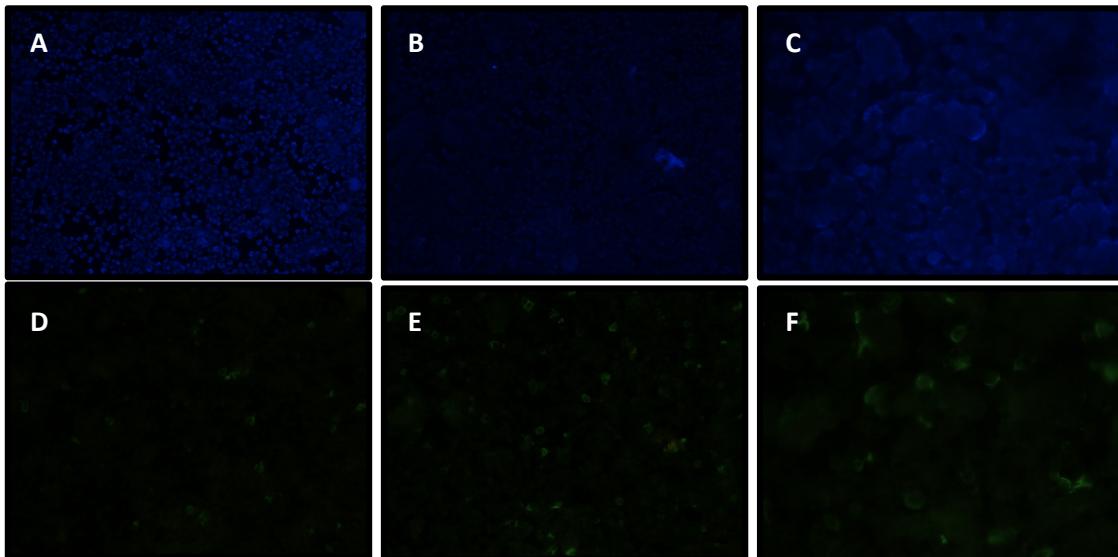


Figura 25. Detección de CPV en células tratadas con clones infecciosos. Inmunofluorescencia de clones infecciosos en células CRFK luego de 4 pasajes. A) células sin transfectar marcadas con DAPI y D marcadas con Ac anti-CPV, B) células transfectadas con pBI265 marcadas con DAPI y E marcadas con Ac anti-CPV, C) células transfectadas con pBI265-2c marcadas con DAPI y F marcadas con Ac anti-CPV.

5.3 DISCUSIÓN-CLON INFECTIVO.

El parvovirus canino (CPV-2) es uno de los principales agentes etiológicos causante de gastroenteritis hemorrágicas severas en perros. Desde su aparición en la década del 70' se han descrito 3 variantes antigénicas: CPV-2a, CPV-2b, y CPV-2c, que actualmente han reemplazado completamente al virus original, el cual todavía es utilizado en la mayoría de las vacunas. Se ha demostrado que hay protección completa entre CPV-2, 2a y 2b, sin embargo, existe controversia sobre si las vacunas existentes hoy en día confieren protección cruzada frente a las infecciones producidas por las cepas de CPV-2c.

Parte de nuestro objetivo fue desarrollar estrategias para luego investigar si existe otro componente en el genoma de CPV-2c que lo hace mas patogénico respecto a las otras variantes, mediante 2 abordajes; uno de ellos fue utilizando plásmidos recombinantes infecciosos que son una herramienta útil para estudiar funciones de los genes virales, y el otro abordaje implicó la utilización de VLPs como forma de presentación de la proteína inmunogénica VP2 el cual se analiza a partir del punto 5.4.

En este trabajo, la construcción del clon infectivo CPV-2c se vio dificultada por la imposibilidad de amplificación del extremo 5'. En su defecto, sustituimos una región de aproximadamente 4550 nucleótidos de la cepa CPV-2c 294MF que abarca la región codificante (proteínas no estructurales y estructurales), en el plásmido infectivo pBI265, utilizando la novedosa tecnología libre de enzimas de restricción, *RF cloning*.

Luego de 4 pasajes en ciego en células CRFK, se observó ECP en las células que habían sido transfectadas con el pBI265 (CPV-2) pero no en pBI265-2c (CPV-2c), sin embargo la fluorescencia directa reveló la presencia de CPV en ambas construcciones. Esto coincide con la bibliografía donde se reportó que de 3 clones infectivos producidos solo 1 generó viriones infecciosos que eran liberados en el sobrenadante de las células transfectadas, sin embargo en los 3 clones se detectaron antígenos específicos del virus por inmunofluorescencia en las células transfectadas (Kariatsumari y cols, 1991). Eso sugirió que los antígenos específicos del virus son traducidos de los mRNA transcriptos a partir de esos 2 plásmidos, a pesar de su inhabilidad de replicar en las células transfectadas. Pese a todo, se realizaron diferentes modificaciones en las condiciones de pasaje del cultivo para intentar levantar el título del clon infectivo CPV-2c pero no fue exitoso.

5.4. MATERIALES Y MÉTODOS- PARTÍCULAS NO REPLICATIVAS, VLPs DE CPV.

La proteína VP2 de CPV es capaz de autoensamblarse y generar cápsides vacías compuestas únicamente por dicha proteína que retienen algunas de las propiedades biológicas del CPV original. Particularmente, nos interesa evaluar la capacidad inmunogénica de las pseudopartículas virales formadas por la principal proteína inmunogénica VP2 y poder comparar la respuesta inmune entre las VLPs compuestas por VP2-2c y VP2-2 producidas en el sistema de expresión basado en Baculovirus.

Para la generación de los Baculovirus recombinantes se utilizó el sistema “Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System” (Invitrogen Inc). Este sistema se basa en la transposición sitio específica entre un vector de transferencia y un bÁcmido receptor dentro de la bacteria modificada DH10Bac[®]. El bÁcmido recombinante aislado de las bacterias se transfecta en la línea celular de insecto *Spodoptera frugiperda* (Sf9), las cuales generan la progenie viral recombinante que luego se seguirá produciendo en esta línea celular.

El sistema estÁ compuesto por un plÁsmido donante llamado pFastBac[™] donde se insertarÁn los genes de interés. Posee una regi3n conocida como mini Tn7 la cual estÁ flanqueada por los sitios Tn7L y Tn7R, que son reconocidos por proteÍnas de transposici3n Tn7 y utilizados para la transposici3n: solo esta regi3n del plÁsmido serÁ transpuesta al Bacmid. La regi3n mini Tn7 contiene un gen de resistencia a la gentamicina, un gen de poliadenilaci3n SV40, el cual aumenta la transcripci3n de ARNm, el promotor de polihedrina y un sitio de clonado mÚltiple, el cual contiene varios sitios de restricci3n. Por fuera de la regi3n mini Tn7, se encuentra un origen de replicaci3n para *E.Coli* y un gen de resistencia a la ampicilina.

Otro componente del sistema Bac-to-Bac[®] es la cepa de *E.Coli* DH10Bac[™]. Estas contienen al Bacmid que posee un gen de resistencia a la kanamicina y una regi3n denominada mini *attTn7* que contiene al gen LacZ. En esta regi3n mini *attTn7* se inserta la regi3n mini Tn7 del pFastBac[™]; cuando esto sucede, el gen LacZ se interrumpe y las colonias crecerÁn de color blanco en presencia de X-Gal e IPTG. Dentro de esta cepa de *E.Coli* tambi3n se encuentra el plÁsmido helper que codifica para proteÍnas Tn7 necesarias para la transposici3n y contiene un gen de resistencia a tetraciclina. El ADN del BÁcmido recombinante es aislado y utilizado para transfectar c3lulas de insecto, lo cual darÁ lugar a la obtenci3n de los baculovirus recombinantes expresando la proteÍna de interés (Figura 26).

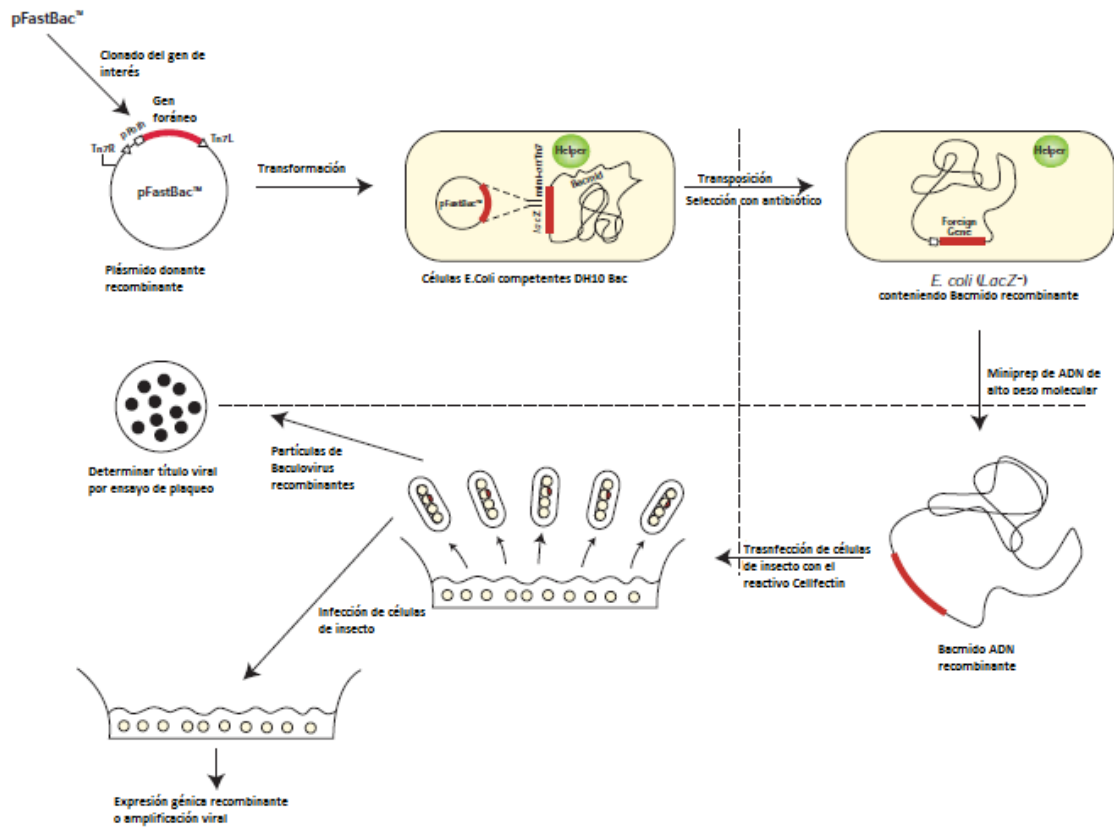


Figura 26. Generación de baculovirus recombinantes y expresión génica con el sistema de expresión Bac-to-Bac®. El gen de interés es clonado en el plásmido donante pFastBac™ y el plásmido recombinante es transformado en células DH10Bac™ competentes que contienen el bacterioma con un sitio blanco mini attTn7 y el plásmido helper. El elemento mini-Tn7 en el plásmido donante pFastBac™ puede transponerse al sitio blanco mini attTn7 en el bacterioma en presencia de proteínas de transposición provistas por el plásmido helper. Las colonias conteniendo los bacteriomas recombinantes son identificadas por la interrupción del gen lacZα. Se preparan minipreps de ADN de alto peso molecular a partir de las colonias de *E.Coli* seleccionadas conteniendo el bacterioma recombinante y este ADN luego es utilizado para transfectar células de insecto.

5.4.1. Construcción de los plásmidos pFastBac recombinantes conteniendo el gen VP2.

Para clonar el gen VP2 en el plásmido de expresión para Baculovirus (pFASTBAC™), se utilizó la metodología “RF cloning” descrita previamente en el punto 5.1.2.3.

El inserto de interés fueron 2 variantes del gen que codifica para la proteína VP2 de CPV: la cepa vacunal Cornell atenuada CPV-2 y la variante de campo CPV-2c 294 MF. El vector de destino fue el plásmido pFastBac™ de Invitrogen. Cada gen queda situado bajo el promotor de polihedrina y entre dos sitios de transposición. La correcta inserción de los genes VP2 de cada cepa y la integridad de la secuencia fueron confirmadas por secuenciación.

5.4.1.1. Amplificación del gen VP2 con cebadores RF clon.

Los cebadores para la amplificación del gen VP2 fueron diseñados en nuestro laboratorio y posteriormente fueron ordenados a IDT (Integrated DNA Technologies, USA) (ver secuencias en la Tabla 11). El cebador directo se solapa en 30 bases con el vector que es complementario al extremo 5' del punto deseado de inserción, seguido por el codón de inicio y 15 bases del extremo 5' del gen de interés. El cebador reverso se aparea con el vector con 17 bases complementarias al extremo 3' del punto de inserción.

Tabla 11. Secuencias de los cebadores para la primer ronda de PCR conteniendo parte de la secuencia de pFastBac y parte de la secuencia del gen VP2.

For 2781 RFclon	
5' - <u>GGA TCC CGG TCC GAA GCG CGC GGA ATT CAA</u> GCA CCA <u>ATG AGT GAT GGA GCA GTT</u> -3'	
pFAST BAC for	INICIO
Rev 4518 RFclon	
5' - <u>GAC TGC AGG CTC TAG ATT CGA AAG CGG CCG</u> CGT ATG <u>TTA ATA TAA TTT TCT AGG TG</u> -3'	
pFAST BAC rev	STOP

A continuación se detalla la primer ronda de PCR utilizando la enzima Taq Polimerasa Platinum® (Invitrogen™) según las recomendaciones del fabricante.

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
MgCl ₂ 50 mM	1.5 mM	94°C	30"	
dNTPs 10 mM	0.2 mM c/u	62°C	30"	35 ciclos
2781 for RF cloning	10 µM	72°C	2'	
4518 rev RF cloning	10 µM			
ADN molde	1 µL	15°C	30 min	
Taq Platinum® (Invitrogen)	1 U			
Agua destilada c.s.p	50 µL			

Los productos de PCR fueron purificados a partir de gel con el kit GE Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (General Electric) y la concentración de ADN fue medida en espectrofotómetro Nanodrop.

En la segunda ronda de amplificación (Phusion-PCR) se utilizó como cebador el producto purificado de la PCR anterior. La reacción se detalla en el siguiente cuadro:

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 5X	1 X	98°C	30"	
dNTPs 10mM	0.2 mM c/u	98°C	10"	
Mega cebadores purificados	200 ng	62°C	30"	30 ciclos
ADN molde (pFASTBAC™)	40 ng	72°C	3 min	
Phusion polymerase (Finnzymes)	1,6 U	72°C	7 min	
Agua destilada c.s.p	50 µL			

Una vez finalizada la Phusion-PCR, se corrieron 5 μL en gel de agarosa para verificar el clonaje y se continuó inmediatamente con la digestión del ADN parental (metilado) utilizando la enzima DpnI. Para ello se agregó, a 17 μL de la amplificación, 1 μL de DpnI (20 U/ μL , NEB), 2 μL buffer 10X y se incubó por 1h a 37°C, luego se inactivó la enzima durante 20 minutos a 80°C.

A continuación, se transformó 25 μL de bacterias *E.Coli* DH5-alfa (NEB) con 2 μL de la digestión anterior como se detalló en el punto 5.1.1.2.

Para corroborar la inserción del gen VP2 se digirieron las miniprep con la enzima Bam HI que tiene un sitio de corte único en pFASTBAC. De todas formas la identidad y correcto sentido de inserción de los genes se confirmó mediante secuenciación.

5.4.2 Construcción de b́acmidos recombinantes conteniendo el gen VP2.

A continuaci3n se transformaron bacterias DH10Bac™ con los pFastBac recombinantes de manera que ocurra la transposici3n sitio específica entre el plásmido donador y el b́acmido conteniendo el genoma de Baculovirus. De acuerdo a las indicaciones del fabricante, se descongelaron las bacterias competentes DH10Bac™ en hielo por 10 minutos y se dispens3 50 μL en un tubo eppendorf. Se agregó 0,5 ng de plásmido donador, se mezcl3 suavemente y se incub3 30 minutos en hielo. Se realiz3 shock térmico a 42°C por 45 segundos y una posterior incubaci3n en hielo por 2 minutos. Se ańadi3 450 μL de medio SOC y se agitó a 225 rpm durante 4 horas a 37°C, tiempo en el que ocurre la transposici3n del gen VP2 del plásmido pFastBac™ al b́acmido que de ser positiva resulta en la interrupci3n del gen lacZ del b́acmido. Finalmente, se sembr3 100 μL de la suspensi3n bacteriana en placas de LB agar conteniendo peptona (0,01 g/mL), extracto de levadura (0,005 g/mL), cloruro de sodio (0,01 g/mL), agar (0,012 g/mL), kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Bluo-gal (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 3 X-gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IPTG (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incub3 por 48 horas a 37°C. Se seleccionaron las colonias lac negativas (crecen de color blanco) y se volvieron a estriar en nuevas placas para verificar el fenotipo incubando overnight a 37°C. Una vez confirmado el fenotipo se picaron colonias y se sembraron en medio LB líquido conteniendo kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y gentamicina (7 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Para el aislamiento del ADN del b́acmido recombinante se llev3 a cabo el protocolo propuesto por el fabricante. Brevemente, se transfiri3 1,5 mL de cultivo a un tubo eppendorf y se centrifug3 a 14.000 rpm por 1 minuto. Se elimin3 el sobrenadante y se resuspendi3 el sedimento en 0,3 mL de Soluci3n I [15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase A]. Se agregó 0.3 ml de soluci3n II (0,2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcl3 suavemente. Se incub3 a temperatura ambiente durante 5 minutos. Seguido a esto se agregó 0,3 mL de acetato de potasio 3M (pH 5.5) mezclando

el tubo suavemente por inversión. Se forma un pequeño precipitado blanco de proteína y ADN genómico de *E.Coli*). Se colocó la muestra en hielo por 10 minutos. A continuación se centrifugó la muestra a 14.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo conteniendo 800 μ L de isopropanol evitando cualquier precipitado blanco. Se mezcló el tubo suavemente por inversión y se incubó en hielo por 10 minutos. Luego se centrifugó la muestra a 14.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se agregó 500 μ L de etanol 70%. Se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente y se disolvió el ADN en 40 μ L de H₂O destilada estéril. El ADN se almacenó a -20°C.

Para verificar que la transposición al báculo fue exitosa se realizó una PCR con los cebadores pUC M13 for y rev. Los mismos están dirigidos contra secuencias a cada lado de los sitios de mini-*att*Tn7 en la región de complementación lac α del báculo. Si la transposición ocurrió el producto de PCR producido por esos cebadores es de 2300 pb más el tamaño de inserto. La reacción de PCR constituye:

Reactivo	Concentración			
Buffer PCR 10X	1 X	94°C	2 min	
dNTPs 10mM	0,2 mM c/u	94°C	30"	
MgCl ₂ 50 mM	1,5 mM	55°C	30"	35 ciclos
cebador pUC M13 for	10 μ M	72°C	5'	
cebador pUC M13 rev	10 μ M	15°C	30 min	
ADN molde	1 μ L			
Taq Platinum	1 U			
Agua destilada c.s.p	50			

5.4.3 Obtención de los baculovirus recombinantes por transfección.

Una vez obtenidos los báculos recombinantes se procedió a construir los Baculovirus recombinantes transfectando la línea celular Sf9 (ATCC CRL-1711). Dichas células fueron cultivadas a una temperatura de 28°C, tanto en monocapa como en suspensión.

Se realizó el protocolo de transfección con lípidos catiónicos (Cellfectin® Invitrogen) propuesto por el fabricante, adaptado para realizarse en botella F25cm². Se prepararon 3 botellas F25cm² con 2 x 10⁶ células Sf9 por cada una, en medio Grace (Invitrogen) completo (conteniendo 10% Suero Fetal Bovino, Invitrogen) y se dejó sedimentar las células durante 1 hora a 28°C. Para cada construcción (VP2-2 y VP2-2c), se prepararon las siguientes soluciones; por un lado 250 μ L de medio Grace (sin ATB y sin suero) + 12,5 μ L de ADN del báculo y por otro lado, 250 μ L de medio Grace (sin suero y sin ATB) + 15 μ L CellFECTIN® II Reagent (Invitrogen). Luego, se

combinaron ambas mezclas y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Mientras se generaron los complejos ADN: lípido, se procedió a lavar las células con medio Grace sin suero. Posteriormente a las mezclas ADN: lípido se le agregaron 2 mL de medio Grace sin suero, se mezclaron y se agregaron a las células en las botellas F25 cm². Las mencionadas botellas se incubaron a 28°C por 5 hs. Transcurrido ese tiempo, se retiró la mezcla ADN: lípido y se agregó 5 mL de Medio Grace con suero. Se incubó a 28°C durante 72 horas, luego de lo cual se cosechó el virus centrifugando el contenido de la botella a 1.500 rpm por 5 minutos y conservando el sobrenadante. Se obtuvieron los baculovirus recombinantes BacVP2-2 y BacVP2-2c del llamado pasaje 0 (p0).

5.4.4 Amplificación de los baculovirus recombinantes.

Para la amplificación de los stocks de baculovirus recombinantes, se infectaron células Sf9 a una multiplicidad de infección (MOI) de entre 0,01 y 0,1. Se realizaron 3 pasajes sucesivos; en F25 cm², F75 cm² y el último en F175 cm². Se sembraron 2 x 10⁶ células por F25 cm², 6 x 10⁶ células por F75 cm² y 1,4 x 10⁷ células por F175 cm² en medio Grace (Invitrogen, Inc) al 10% SFB y ATB. Se dejaron sedimentar las células durante 1 hora a 28°C, se retiró el medio de cultivo y se agregó el inóculo viral. El control de células fue trabajado del mismo modo pero en lugar de inóculo viral se le adicionó medio Grace. Luego de 1 hora de adsorción a 28°C se le agregó medio de infección Grace al 1% SFB mas ATB (4 mL para F25 cm², 12 mL para F75 cm² y 30 mL para F175cm²). Luego de incubar a 28°C durante 72 horas, se centrifugó por 5 min a 1.500 rpm conservando el sobrenadante.

5.4.4.1 Titulación viral.

Para la titulación viral de los baculovirus recombinantes se utilizó una línea Sf9 establemente transformada con el gen de la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, GFP) bajo el control del promotor viral de Poliedrina, de manera tal que la célula se ve verde únicamente si está infectada. Dichas células fueron gentilmente cedidas por la Dra. Andrea Peralta de INTA-Castelar, Argentina. Brevemente, se agregaron 300 µL de diluciones desde 10⁻³ a 10⁻⁹ de los stocks virales a 2,7 mL de células Sf9 a una densidad de 2,5 x10⁵ células/mL para la pre-adsorción del virus a las células. Luego, 200 µL de cada una de estas suspensiones fueron colocados en 12 pocillos (una fila) de una placa de 96 pocillos tratada para cultivos celulares, mientras que en la fila restante se colocaron células sin infectar (control negativo). La placa se

incubó por 5 días en cámara húmeda a 28°C y se contaron pocillos infectados por visualización al microscopio de focos fluorescentes de color verde. El título viral se calculó por el método de Reed y Muench (Reed & Muench, 1938).

5.4.5 Producción y purificación de VLPs de CPV.

La producción de las VLPs se hizo infectando células Sf9, cultivadas en suspensión para obtener mayor volumen, e infectadas a una alta MOI tal como indica la literatura para producción de proteínas virales en general (Invitrogen, 2015). Para esto se realizaron infecciones en volúmenes de 60 y 500 mL de células Sf9 a una densidad de 0.5×10^6 células/mL con una MOI de 5-10 pfu/mL. Se incubó a 28°C, 110 rpm de agitación durante 3 días.

Para la purificación de las VLPs se cosecharon las células infectadas y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. El pellet celular se lisó con un shock hipotónico de bicarbonato de sodio 25 mM en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante (fracción soluble) se precipitó con 20% de sulfato de amonio saturado. Se agregó gota a gota a temperatura ambiente y posteriormente se dejó en hielo 30 minutos. Se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió con PBS en un volumen 1:10 del volumen inicial. Se realizó una diálisis O.N. a 4°C contra PBS para eliminar el sulfato de amonio. Esta etapa se hizo en colaboración con el laboratorio del Dr. Oscar Taboga de INTA-Castelar, Argentina.

5.4.6 Detección de la proteína recombinante VP2.

5.4.6.1 Inmunofluorescencia

Para detectar la expresión de la proteína VP2 por inmunofluorescencia se infectaron células Sf9 con los Baculovirus Bac-VP2-2 y Bac-VP2-2c y se dejó como control mock, células Sf9 sin infectar. La MOI utilizada fue de 0,01 partículas virales por célula. A los 3 días post infección se colectaron los sobrenadantes, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se lavaron con PBS centrifugando del mismo modo. El pellet celular fue resuspendido en 50 µL de PBS y colocado en portaobjetos. Una vez que las células se secaron, fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron permeabilizadas con tritón X-100 durante 5 minutos e incubadas con una dilución 1:50 del suero de conejo anti-CPV (cedido por el Dr. Colin Parrish, USA) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Luego de lavar con PBS,

las placas fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor® 546 (Invitrogen) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Luego de 3 lavados más con PBS, las placas fueron examinadas bajo microscopio de epifluorescencia.

5.4.6.2. Microscopía electrónica de transmisión

La formación de VLPs fue evaluada mediante el análisis por microscopía electrónica de transmisión de las muestras tratadas con bicarbonato y extraídas con sulfato de amonio como se describe en el ítem 5.2.5. Se incubó 15 µL de la muestra en una grilla de cobre de 200 mesh con film de Formvar y carbono por 2 minutos, luego se retiró el exceso y se incubó por 2 min con 15 µL de Acetato de Uranilo diluido al 2% en H₂O. Las muestras fueron examinadas en un microscopio electrónico JEOL-JEM 1010, operado a 100 kV. Las fotos fueron tomadas con una cámara digital Hamamatsu C-4742-95.

5.4.6.3 Western Blot

La expresión de la proteína VP2 fue evaluada por Western Blot, para esto se utilizaron geles desnaturizantes de poliacrilamida de concentración 12%.

Las muestras, células infectadas con los baculovirus recombinantes, fueron resuspendidas en cracking buffer 1x (Tris-HCl pH 6,8 62,5 mM, SDS 2,5 %, azul de bromofenol 0,002 %, β-mercaptoetanol 5 %, glicerol 10 %) y calentadas 5 minutos a 100°C antes de sembrar. Los geles se corrieron a voltaje constante en buffer Tris-Glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1 %). Al finalizar la corrida, los geles se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa (0,2 µm de poro, Thermo Fisher Scientific) en buffer de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20 %) en cubas de transferencia Bio-Rad a corriente constante de 200 mA por 90 minutos, siguiendo las indicaciones del fabricante.

Para la realización de ensayos de Western Blot, se bloquearon las membranas de nitrocelulosa con una solución de bloqueo de leche descremada al 5 % en buffer TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, Tween20® 0,1 %) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se incubaron las membranas con el anticuerpo policlonal anti-CPV (Cedido por el Dr. Colin Parrish), hecho en conejo, diluido 1:5000 en leche descremada al 3 % en TBS-Tween, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se lavaron las membranas con TBS-Tween, 3 veces por 10 minutos. Se incubaron con dilución 1:10000 del anticuerpo secundario, anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, (Invitrogen), en leche descremada al 3 % en TBS-Tween,

por 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Al finalizar, se lavaron las membranas con TBS-Tween 3 veces por 10 minutos. Se realizó entonces un último lavado de 5 minutos con buffer BREFA (buffer de revelado de fosfatasa alcalina) (Tris-HCl 100 mM pH 9, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM), se agregaron 5 ml de solución de revelado (5 mL de BREFA, 33 µL NBT 50 mg/mL en dimetilformamida 70 % y 16,5 µL de BCIP 50 mg/mL en dimetilformamida 100 %, Promega) y se incubó protegido de la luz hasta observar bandas. Al finalizar, se inactivó la reacción por lavado de las membranas con agua.

5.4.6.4 Test de actividad hemoaglutinante

El test de hemoaglutinación se realizó a temperatura ambiente usando eritrocitos de cerdo al 1% en PBS. Se realizaron diluciones seriadas en base 2 de los sobrenadantes de células Sf9 infectadas con los Baculovirus recombinantes BacVP2-2 y BacVP2-2c, con PBS en un volumen final de 50 µL en placa de 96 pocillos con fondo en U. Posteriormente se agregó 50 µL de la solución de glóbulos rojos al 1% y se incubó la placa a 4°C durante 1 hora. Como control de aglutinación de los glóbulos rojos se sembró un pocillo sin células infectadas, solo PBS y dilución al 1% de glóbulos rojos. El título de HA se determinó como la mayor dilución de la muestra que presenta hemoaglutinación.

5.4.7. Evaluación de la capacidad antigénica de las VLPs de CPV-2 y CPV-2c.

Con el fin de evaluar la inmunogenicidad de las VLPs expresadas en el sistema baculovirus se inmunizaron ratones hembra de la cepa BALB/c. Estos experimentos se realizaron en la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo. La manipulación de los animales fue realizada por los integrantes de la unidad previa aprobación del protocolo por la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) de la institución.

Las dosis vacunales fueron preparadas a partir de una solución antigénica acuosa conteniendo las VLPs (20 µg/ratón) y se le agregó el 1% del volumen final de la vacuna, de Tween20® a temperatura ambiente. Una vez disuelto, se emulsificó sobre igual volumen de adyuvante incompleto de Freund, adicionando gota a gota de la solución acuosa sobre el adyuvante en vortex y una vez completado se vortexeó por 10 minutos más. Las vacunas fueron suministradas dentro de las 2 horas de su preparación.

Se establecieron 3 grupos como se muestra en la tabla 12: grupo 1, solución salina (es el grupo control); grupo 2, VLPs de CPV-2 purificadas; y grupo 3, VLPs de CPV-2c purificadas. Cada

grupo contó con 6 ratones hembra de la cepa BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad. La ruta de inoculación elegida fue la intraperitoneal y la dosis fue aplicada en un volumen de 100 μ L por animal los días 0 y 21. Todos los animales fueron sangrados los días 0, 21 y 36 para estudios serológicos. La figura 27 detalla el esquema de vacunación y sangrado realizado.

Tabla 12. Diseño experimental para ensayo en ratones con VLPs de CPV.

GRUPO	n	ANTÍGENO	DOSIS
1	6	PBS	-
2	6	VLPs CPV-2	20 μ g
3	6	VLPs CPV-2c	20 μ g

Se realizó la extracción de sangre por vía submandibular, se dejó coagular durante 3-4 hs a temperatura ambiente, se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos, se separó el suero y se guardó a -20°C para el análisis de la respuesta inmune por seroneutralización.

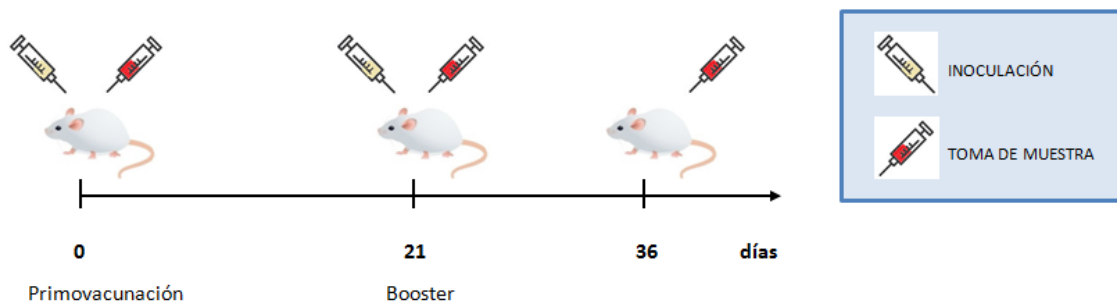


Figura 27. Esquema de la inmunización de ratones con las vacunas recombinantes expresando la proteína VP2 de CPV. La jeringa amarilla indica la inoculación con la vacuna recombinante. La jeringa roja indica la extracción de sangre para análisis serológicos.

La actividad neutralizante de las muestras de sueros de ratones individuales contra la cepa CPV vacunal fue evaluada por ensayo de neutralización viral *in vitro*. En primer lugar todos los sueros fueron inactivados a 56°C durante 30 minutos. El ensayo se realizó en placas de cultivos de 96 pocillos combinando diluciones seriadas (base 2) de los sueros, comenzando en 1/8, en medio de cultivo MEM sin suero, con una cantidad igual de suspensión viral de CPV tipo 2 conteniendo 150DICT₅₀. La mezcla suero-virus se incubó durante 1 h a 37°C, 5%CO₂, luego de lo cual se le adicionó 10.000 células CRFK/pocillo. Finalmente los cultivos fueron incubados por 14 días a 37°C, 5% CO₂ hasta observar neutralización del efecto citopático o realizar test de revelado. La CPV-2 fue proporcionada amablemente por Antonio Coira, asesor independiente, Argentina.

Debido a que el efecto citopático del parvovirus canino no es muy fácil de evidenciar, el ensayo fue revelado mediante Hemoaglutinación. Para ello, se transfirieron 50 μ L de cada pocillo de la placa de seroneutralización a una placa de fondo en "V" y se le agregó 50 μ L de glóbulos rojos de cerdo al 0,8% con seroalbúmina bovina al 0.1%. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 hs y se registraron como positivos los datos de aquellos pocillos donde el botón de glóbulos rojos cae en forma de lágrima.

El título de anticuerpos seroneutralizantes se determinó como el recíproco de la mayor dilución de suero que neutralizó completamente el suero (ausencia de actividad hemoaglutinante).

Paralelamente utilizamos otra técnica confirmatoria rápida denominada SAT, test de aglutinación en portaobjetos (Marulappa & Kapil, 2009) que consiste en colocar en un pocillo 20 μ L del sobrenadante de la seroneutralización con 20 μ L de glóbulos rojos al 2,5% y 2% de SFB, mas 10 μ L de PBS. Se mezclan suavemente ambas soluciones en círculos durante 30 segundos y se observa al microscopio. Cuando hay presencia de virus se observan acúmulos de glóbulos rojos, mientras que en ausencia de virus se observan los glóbulos rojos individuales.

5.5 RESULTADOS - VLPs

5.5.1. Obtención de partículas no replicativas, VLPs, basadas en la proteína VP2 de CPV.

La secuencia de clonado de los genes VP2-2 y VP2-2c en los respectivos plásmidos donantes pFASTBAC se realizó en 2 pasos, utilizando la metodología libre de enzimas de restricción "RF cloning" explicada en detalle en Materiales y Métodos. Primero se amplificó el gen VP2 con cebadores que tienen secuencias que reconocerán el plásmido donante en la próxima reacción, denominándose al producto de esta PCR megacebador. Figura 28.

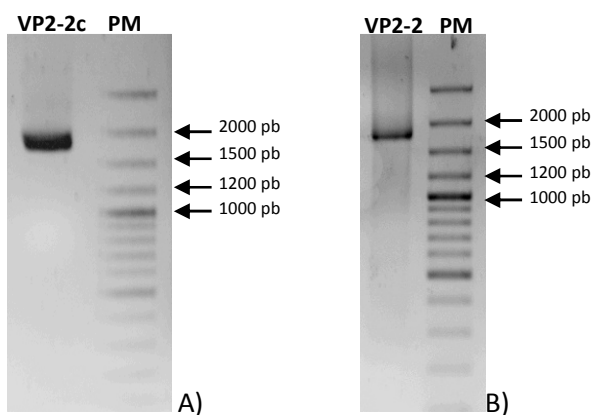


Figura 28. Gel de agarosa mostrando los megacebadores. En (A) se observa el producto de PCR de 1700 pb correspondiente al gen VP2-2c. En (B) se observa el producto de PCR de 1700 pb correspondiente al gen VP2-2. El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue el 100 pb plus de Fermentas.

Una vez purificados los productos de PCR, se estimó su concentración y se realizó la segunda PCR (Phusion PCR) utilizando el producto de la anterior como megacebador. En la figura 29 se muestra la banda obtenida

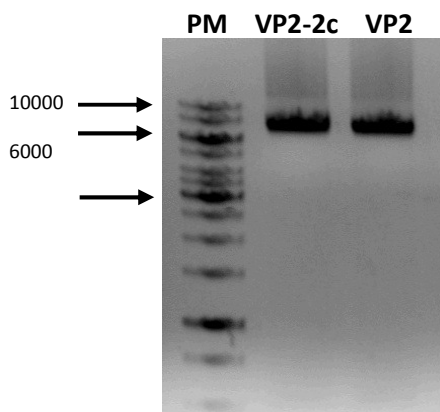


Figura 29. Gel de agarosa mostrando los productos de la segunda PCR. El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue 1 Kb Fermentas

Como se detalló anteriormente, el ADN parental que es parte de los productos de la segunda PCR se digirió con la enzima DpnI quedándonos con el plásmido donante conteniendo

nuestro inserto de interés. Los productos obtenidos en este punto se denominaron plásmidos recombinantes **pFASTBAC-VP2-2** y **pFASTBAC-VP2-2c**.

Para verificar si el gen de interés VP2 se encuentra dentro del plásmido recombinante se realizó una digestión con la enzima Bam HI que presenta un sitio de corte único en pFASTBAC. Como muestra la figura 30, el gen se insertó correctamente en las muestras de los carriles 1, 4, 6, 7, 8, 9 y 10 dado que la banda presenta mayor tamaño respecto al plásmido pFASTBAC sin inserto (carril 11).

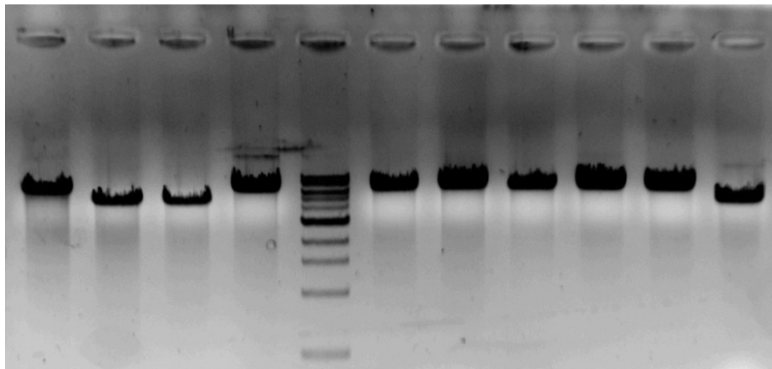
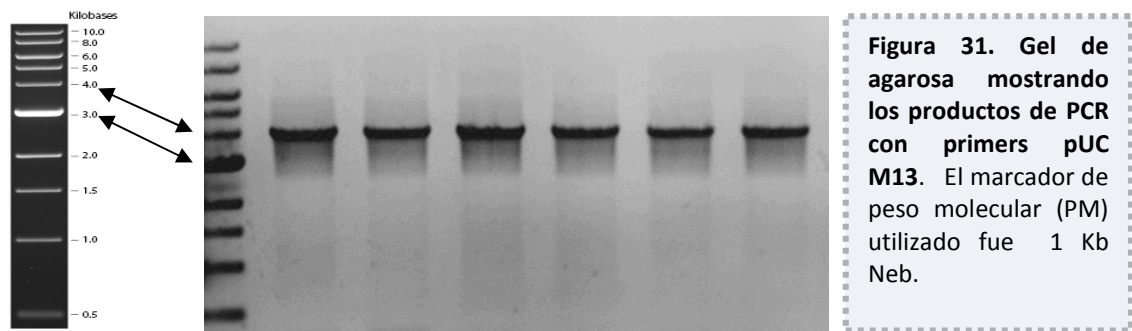


Figura 30. Gel de agarosa mostrando las digestiones con la enzima BamHI. En el carril 11 se observa el plásmido sin inserto. El marcador de peso molecular (PM) utilizado fue 1 kb Fermentas.

Una vez confirmado por secuenciación que los genes se ubican en la posición y sentido adecuado en los pFASTBAC recombinantes correspondientes, se continuó con la transposición específica de sitio entre dicho plásmido y el báculo que contiene el genoma de Baculovirus lo cual tiene lugar adentro de las bacterias DH10Bac. Dado que las bacterias DH10Bac contienen el gen lac Z, cuando este es interrumpido por la transposición del gen desde el plásmido pFASTBAC, las colonias son de color blanco. Las colonias que no sufrieron transposición y por tanto son negativas para mi objeto de estudio, quedan de color azul.

Luego del aislamiento del ADN del báculo se corroboró la ocurrencia de la reacción mediante una PCR directamente de la miniprep utilizando los cebadores universales pUC/M13 for y rev. Si el gen en estudio está presente el producto de PCR debe de ser de alrededor de 4100 pb (2300 corresponden al gen + 1800 pb del plásmido). La figura 31 muestra el resultado de dicha PCR donde se observa que efectivamente el gen se encuentra dentro del báculo por el tamaño aproximado de 4100 pb.



Al igual que luego de cada etapa, se confirmó mediante secuenciación la correcta inserción del gen VP2 en ambos bácmidos **BacVP2-2** y **BacVP2-2c**.

El análisis comparativo de las secuencias de VP2 de CPV-2c 294MF y CPV-2 Cornell atenuada reveló que existen otras diferencias aminoacídicas entre ellas además de las tradicionalmente reportadas.

Los cambios aminoacídicos Met87Leu, Ile101Thr, Ser297Ala, Asp305Tyr, Asn375Asp y Asn426Glu marcados con 1 asterisco en la tabla 13 ya han sido reportados anteriormente como se muestra también en la tabla 1 de la introducción (Steinel y cols, 2000; Parrish y cols, 1991).

Los cambios Arg271Lys y Asp300Gly como se mencionó en la discusión del capítulo I fueron reportados en un mutante de CPV que sufrió más de 100 pasajes en cultivos (Parrish & Carmichael, 1986). Sin embargo, entre diferencias aminoacídicas Ala44Thr, Asn134Ser, Ile301Thr, Ile316Val, las ultimas 2 serian las más preocupantes por encontrarse en el loop 3 y 4 de VP2 (ver figura 4).

Tabla 13. Diferencias aminoacídicas entre las VP2 presentes en las VLPs CPV-2 y CPV-2c.

PROTEÍNA VP2												
Nucleótidos.	130-132	259-261	301-303	400-402	811-813	889-891	898-900	901-903	913-915	946-948	1123-1125	1276-1278
Aminoácidos	44	87	101	134	271	297	300	301	305	316	375	426
Cornell atenuada	GCT (Ala)	ATG (Met)	ATT (Ile)	AAT (Asn)	AGA (Arg)	TCT (Ser)	GAT (Asp)	ATT (Ile)	GAT (Asp)	ATA (Ile)	AAT (Asn)	AAT (Asn)
CPV-2c 294MF	A.. (Thr)	T.. (Leu)	.C. (Thr)	.G. (Ser)	.A. (Lys)	G.. (Ala)	.G. (Gly)	.C. (Thr)	T.. (Tyr)	G.. (Val)	G.. (Asp)	G.A (Glu)

El ADN de los bácmidos recombinantes fue utilizado para transfectar células Sf9 denominándose a este "pasaje 0". Posteriormente se realizaron pasajes 1 y 2 a baja moi para obtener stock viral, siendo el pasaje 3 el que se realizó a alta moi (entre 5 y 10 pfu/célula) para la obtención de proteínas. Se realizaron varias replicas de los pasajes 2 y 3 necesarios para poner a punto el método de purificación de las proteínas.

En la tabla a continuación se indican los títulos obtenidos en los pasajes (Tabla 14). El pasaje 1 fue realizado sin conocer el título del p0, y se inoculó 1 mL para una botella F25cm². El título del pasaje 1 se obtuvo extrapolando el resultado con un plásmido conteniendo el gen GFP, dado que hasta ese entonces no contábamos con otro método de titulación. A partir de los pasajes 2 ya obtuvimos las células provenientes de INTA por lo cual los títulos eran más exactos. Los pasajes 3 no fueron titulados porque se utilizaron inmediatamente para la purificación de las VLPs.

Tabla 14. Producciones de Baculovirus recombinantes

	Bac CPV/VP2-2	Bac CPV/VP2-2c	Volumen
Pasaje 1	6 x 10 ⁶ pfu/mL	6 x 10 ⁶ pfu/mL	5 mL
Pasaje 2	8.67 x 10 ⁶ pfu/mL	1.26 x 10 ⁷ pfu/mL	15 mL
Pasaje 2 bis	3.45 x 10 ⁷ pfu/mL	1.45 x 10 ⁷ pfu/mL	30 mL

5.5.2. Análisis de la expresión de la proteína VP2

5.5.2.1 Inmunofluorescencia

La expresión de la proteína VP2 de CPV en las VLPs obtenidas a partir de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes BacVP2-2 y BacVP2-2c, fue confirmada mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo policlonal anti-CPV y un anticuerpo secundario Alexa 546.

Como se muestra en la figura 32 la fluorescencia específica de CPV se observa en las células infectadas (a y b), de color rojo, mientras que no se observa fluorescencia específica de CPV en las células no infectadas (c).

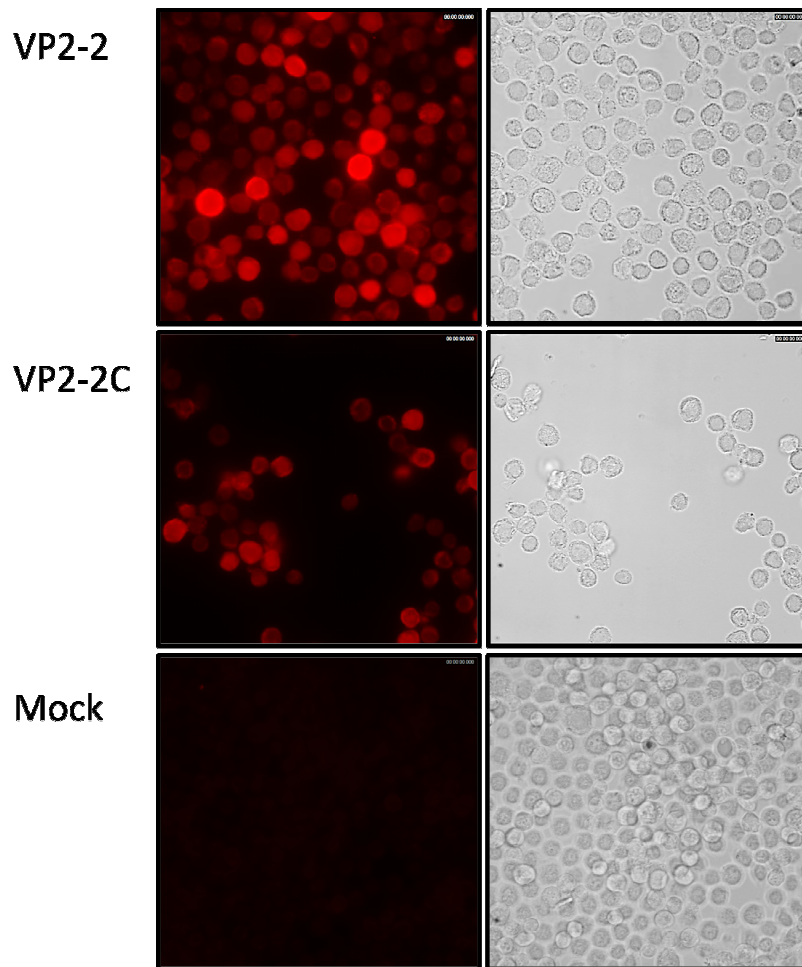


Figura 32. Ensayo de Inmunofluorescencia de la proteína VP2 expresada en células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes Bac CPV/VP2-2, Bac CPV/VP2-2c y células Sf9 sin infectar.

5.5.2.2. Microscopía electrónica

La capacidad de la proteína VP2 del parvovirus canino de autoensamblarse en cápsides vacías fue confirmada mediante microscopía electrónica luego de una tinción negativa con acetato de uranilo. En las figura 33 se pueden visualizar estructuras de morfología y tamaño aproximados a 26-30 nm, similar al de las partículas naturales de parvovirus, para ambas VLPs.

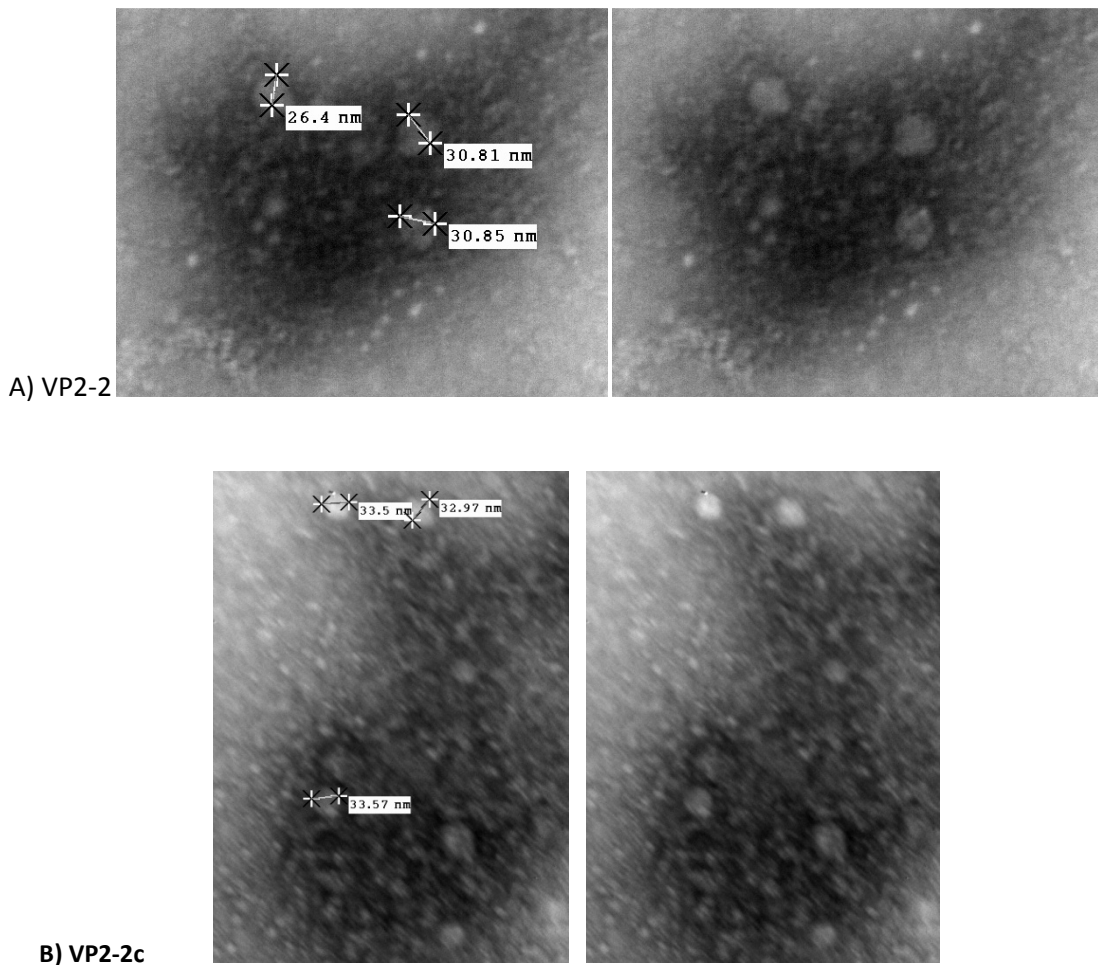


Figura 33. Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs de Parvovirus Canino obtenidas de la expresión en los respectivos baculovirus recombinantes Bac CPV/VP2-2 (a) y Bac CPV/VP2-2c (b)

5.5.2.3. Western Blot

La expresión de la proteína VP2 del parvovirus canino también fue confirmada mediante SDS-PAGE (Fig. 34A) y Western Blot (Fig. 34B) a partir de células infectadas con los baculovirus recombinantes y de las VLPs purificadas. En la figura 34 puede apreciarse la banda esperada de aproximadamente 67 kDa tanto para células infectadas (carriles 2 y 4) como para VLPs purificadas (carriles 1 y 3) de VP2-2 y VP2-2c. Además, en los carriles 1 y 3 de la figura 34A puede apreciarse el enriquecimiento de los extractos con la proteína VP2 tras el tratamiento con NH_4SO_4 y posterior diálisis de las VLPs, no observándose en estos casos degradación de proteínas.

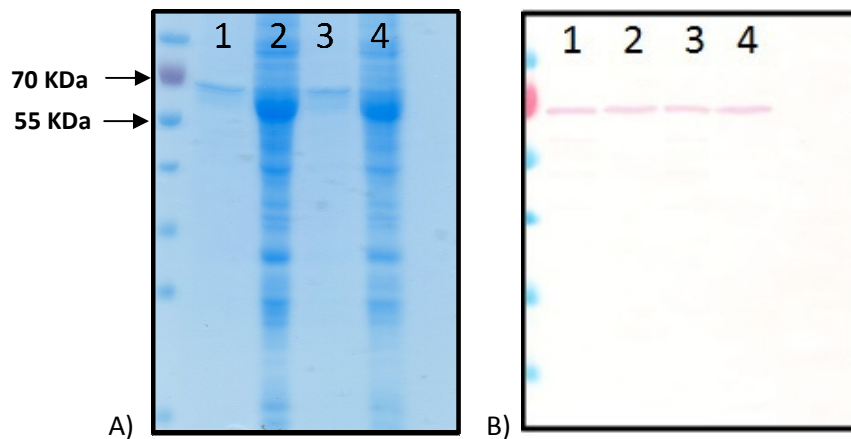


Figura 34. Análisis por SDS-PAGE (A) y Western Blot (B) de células infectadas con los baculovirus recombinantes Bac CPV/VP2-2 (carril 2) y Bac CPV/VP2-2c (carril 4) y VLPs purificadas (carril 1 para VP2-2 y carril 3 para VP2-2c). El marcador de peso molecular utilizado fue PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 a 180 kDa) (Thermo Fisher Scientific).

En el Western Blot (Figura 34B) se observa únicamente la proteína VP2 en el tamaño esperado de 67 kDa demostrando la reactividad específica de la proteína VP2 expresada a partir de los baculovirus recombinantes y de las VLPs purificadas.

5.5.2.4 Actividad hemoaglutinante de las VLPs

Se determinó la actividad hemoaglutinante de las producciones purificadas de VLPs utilizando eritrocitos de cerdo al 1% en PBS como muestra la figura 35. Para esto se realizaron diluciones en base 2 partiendo de stocks puros de las VLPs de concentración 3.45 μ g las VLPs CPV/VP2-2 y 6 μ g las VLPs CPV/VP2-2c. La actividad hemoaglutinante para las VLPs CPV/VP2-2 resultó en 1/128, mientras que para las VLPs CPV/VP2-2c resultó en 1/256. Por tanto, podemos concluir que la variante 2c presenta casi la misma actividad hemoaglutinante que la 2 dado que la técnica comienza en el doble de concentración de 2c respecto a 2.

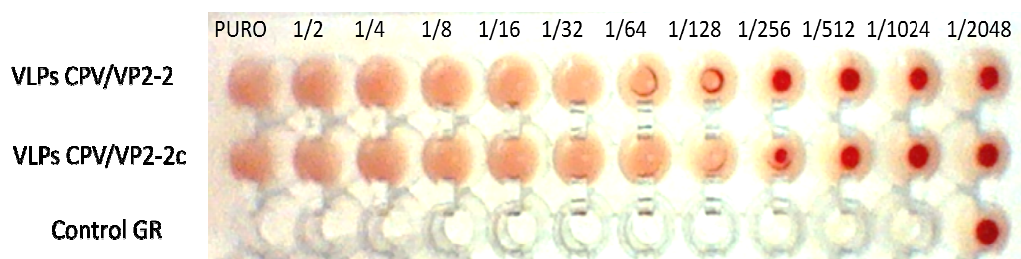


Figura 35. Actividad hemoaglutinante de las VLPs de CPV utilizando glóbulos rojos de cerdos al 1%. En el último pocillo de abajo a la derecha se muestra el control de no aglutinación de eritrocitos.

5.5.3. Evaluación de la respuesta inmune generada por las VLPs.

Se evaluó la respuesta inmune humoral específica contra parvovirus canino generada por las VLPs CPV/VP2-2 y CPV/VP2-2c en ratones de la cepa BALB/c inmunizados con 20 µg de cada producción purificada y un control sin virus. Se tomaron muestras de suero a los 0, 21 y 36 días post vacunación para la detección de anticuerpos específicos mediante la técnica de seroneutralización viral (SN). En dicha técnica se utilizó una cepa del tipo CPV-2 para neutralizar a los anticuerpos presentes en los sueros de los ratones.

Debido a que el ECP de parvovirus canino no es muy claro, el resultado de la SN fue confirmado por la técnica de hemoaglutinación (HA) utilizando eritrocitos de cerdos, y en algunos casos la HA se confirmó mediante la técnica de aglutinación en portaobjetos (SAT) descrita en materiales y métodos. En las diluciones de suero que no fueron capaces de neutralizar la cepa de desafío CPV-2 se observaron grandes agregados de aglutinación (fig. 36A), en cambio cuando los anticuerpos presentes en el suero neutralizaron a CPV-2, se observó los glóbulos rojos simples diseminados de manera homogénea en el pocillo (fig. 36B).

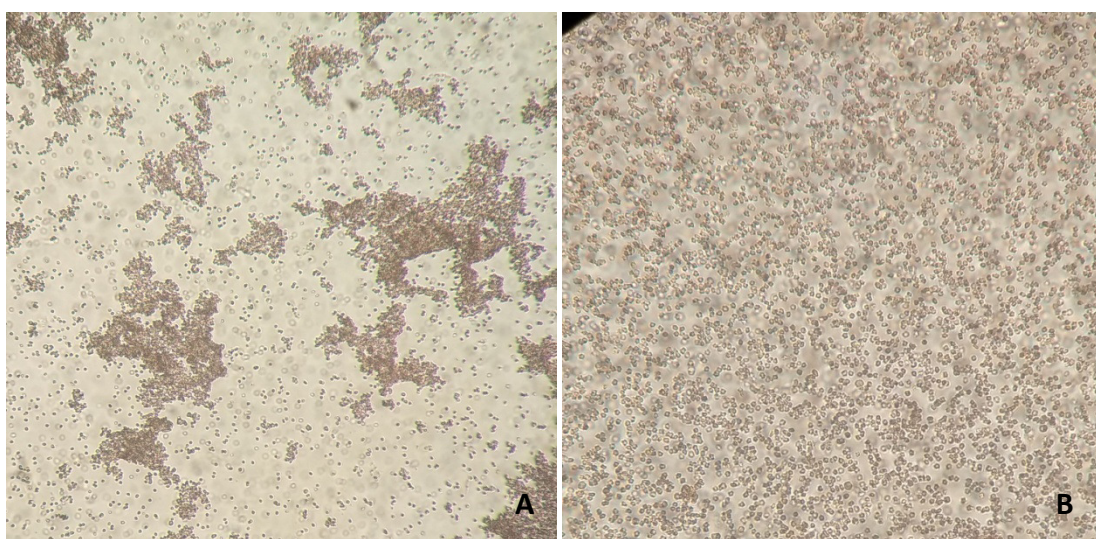


Figura 36. Test de aglutinación en portaobjetos del sobrenadante de la seroneutralización. A. Glóbulos rojos aglutinados por la presencia de CPV lo cual denota ausencia de anticuerpos neutralizantes en el suero. **B.** Glóbulos rojos sin aglutinar que denotan ausencia de CPV lo cual indica que éste fue neutralizado por los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inmunizados con las VLPs.

Las diluciones de suero evaluadas en el ensayo de seroneutralización fueron desde 1/8 hasta 1/65536. Todos los animales inmunizados con las VLPs CPV/VP2-2 y con las VLPs CPV/VP2-

2c mostraron seroconversión, mientras que el grupo control negativo permaneció seronegativo durante toda la experiencia. Luego de la segunda inmunización se observó un incremento en el nivel de anticuerpos seroneutralizantes mayor en el grupo inoculado con las VLPs CPV/VP2-2 títulos de hasta 1/16384, respecto al grupo inmunizado con las VLPs CPV/VP2-2c, títulos de hasta 1/2048. Cabe recordar que la cepa de desafío utilizada para este ensayo fue del tipo CPV-2. Los títulos se presentan en la gráfica de la figura 37 como la media para cada grupo y en cada tiempo de sangrado, con sus respectivas desviaciones estándar. En todos los casos las diferencias no fueron significativas.

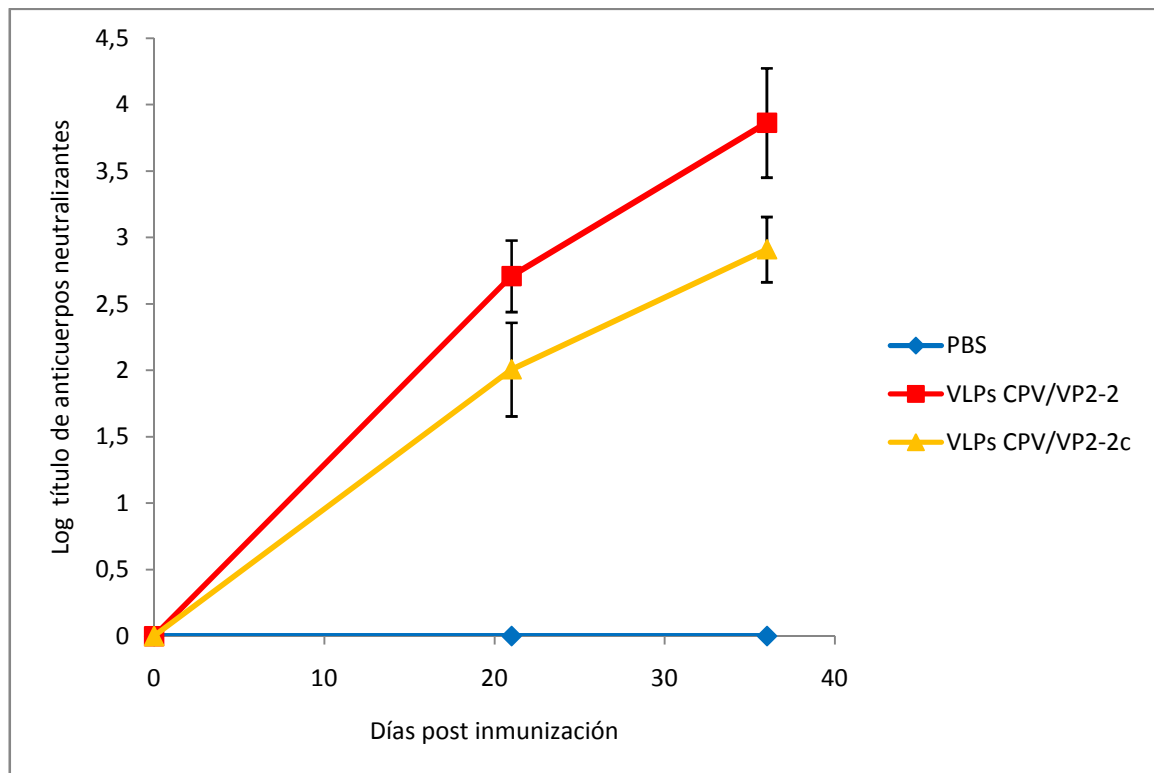


Figura 37. Títulos de anticuerpos neutralizantes determinada por seroneutralización y revelada por HA en ratones inmunizados con VLPs. El título fue calculado como la media para cada grupo y en cada tiempo de sangrado.

5.6. DISCUSION- VLPs

El otro abordaje para alcanzar el objetivo 3.3 fue mediante la generación de VLPs de CPV en el sistema de expresión Baculovirus y dado que los clones infectivos no se pudieron resolver enfocamos los análisis de lleno en las VLPs.

El sistema de expresión de Baculovirus ha sido ampliamente utilizado para expresar proteínas heterólogas provenientes ya sea de organismos eucariotas, procariotas y virus (Liu y cols, 2013). Particularmente, se ha visto que ha sido de los más empleados para la producción de VLPs en células de insecto (Van Oers y cols, 2015). Estas partículas no replicativas, VLPs, han sido generadas y utilizadas como candidatos vacunales para una variedad de virus debido a su habilidad de inducir respuesta inmune humoral y celular (Sedlik y cols, 1997; Woo y cols, 2006). En concreto, se ha demostrado que la proteína VP2 de CPV, la proteína mayoritaria del virión, es capaz de formar dichas VLPs reteniendo las propiedades biológicas del CPV original (Saliki y cols, 1992; Yuan & Parrish, 2001).

En este trabajo de tesis, se obtuvieron VLPs de parvovirus canino a través de la expresión de 2 proteínas recombinantes, VP2-2 y VP2-2c, utilizando como plataforma de expresión el sistema baculovirus. El clonaje de ambos genes en los respectivos plásmidos recombinantes se realizó utilizando una metodología novedosa libre de enzimas de restricción, no vista antes en publicaciones referidas a VLPs de CPV.

Mediante microscopía electrónica se demostró que la proteína VP2 de CPV es capaz de autoensamblarse para formar VLPs evidenciado por la presencia de partículas de tamaño (aproximadamente 26 nm) y morfología similares a la partícula de parvovirus nativa. Asimismo, se demostró su correcta expresión mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo policlonal anti-CPV, a partir de células Sf9 infectadas con los Baculovirus recombinantes y de las VLPs purificadas. Del mismo modo, se demostró que las proteínas VP2 expresadas a partir de ambos baculovirus recombinantes son muy similares a la proteína nativa confirmado por su reactividad específica en Western Blot. Si bien para esta técnica se utilizó un anticuerpo policlonal anti-CPV, únicamente se detectó la expresión de la proteína VP2 como era de esperar, no observándose productos de degradación.

La actividad hemoaglutinante presentada por ambas VLPs, confirmó aun más que son similares a las VLPs nativas y que retienen sus características de unión al receptor intactas. La hemoaglutinación de eritrocitos de cerdos fue reportada como una propiedad de los aislados salvajes de parvovirus canino y de las VLPs de VP2, siendo en general un buen marcador de formación de partículas (Hurtado y cols, 1996). De hecho, un estudio demostró el rol esencial del

la región del hoyuelo en la unión a eritrocitos realizando diferentes mutaciones en el mismo (Tresnan y cols, 1995).

Considerando que el nivel de anticuerpos neutralizantes se correlaciona principalmente con la protección de los animales vacunados contra las infecciones por CPV, evaluamos los títulos de anticuerpos neutralizantes de los ratones inmunizados con las VLPs CPV/VP2-2 y las VLPs CPV/VP2-2c. Obtuvimos altos títulos de anticuerpos neutralizantes en los animales inmunizados con ambas VLPs, los cuales aumentaron luego de que se administró un refuerzo a los 21 días post-infección. Los títulos alcanzados el día 36 post inmunización fueron de 1/16384 en las VLPs CPV/VP2-2 y de 1/2048 en las VLPs CPV/VP2-2c. Estos resultados indicaron que los anticuerpos generados fueron capaces de neutralizar de modo más satisfactorio a la cepa homóloga CPV-2, que fue la cepa de desafío utilizada en el ensayo.

Nuestros resultados coinciden con otros trabajos reportados donde se observa que la respuesta inmune a las VLPs de CPV aumenta luego de la administración de un refuerzo a los 21 dpi, sin embargo obtuvimos títulos de anticuerpos seroneutralizantes 3 veces inferiores a los títulos alcanzados por Nan y cols, (Nan y cols, 2018), donde expresaron las VLPs de CPV en *E.Coli*. Este grupo al igual que nosotros produjo las VLPs con CPV de una variante, en este caso la CPV-2a, y realizó la SN con la cepa CPV, sin embargo diferimos en el modelo animal utilizado, en su caso cobayos y en la dosis de proteína administrada, 50 µg respecto a los 20 µg utilizados en esta tesis. Además ellos utilizaron un adyuvante en su formulación de la línea Seppic, conocidos por ser buenos potenciadores de la respuesta inmune, mientras que nosotros utilizamos el adyuvante incompleto de Freund.

Por otra parte, nuestros títulos de anticuerpos seroneutralizantes resultaron 1 logaritmo superior cuando los comparamos con los trabajos de Xu y cols (Xu y cols, 2014) y Feng y cols (Feng y cols, 2014). En el trabajo de Xu, inmunizaron los ratones con igual dosis que nosotros enfrentando en la seroneutralización los anticuerpos obtenidos de una VLP CPV-2a a la cepa CPV-2a. En el estudio realizado por Feng y cols, la proteína VP2 de CPV se expresó utilizando, la misma estrategia que nosotros, el sistema baculovirus y ensamblado de VLPs en células de insecto y pupas. La inmunogenicidad de las VLPs fue investigada inmunizando ratones con 70 µg de proteína y un refuerzo con la misma concentración 2 semanas después, o sea, cada dosis fue 3,5 veces superior a la nuestra. Por tanto, podemos decir que nuestra estrategia resultó mejor porque obtuvimos 1 log mas de anticuerpos seroneutralizantes con una dosis 3,5 veces inferior.

En nuestro caso, cuando se enfrentó la cepa CPV-2 a los sueros de los animales vacunados, el título de anticuerpos fue 8 veces mayor en los ratones inoculados con las VLPs CPV/VP2-2 respecto a las VLPs CPV/VP2-2c. Esto también fue visto por Pratelli y cols (Pratelli y cols, 2001),

donde los cachorros inoculados con CPV-2 presentaron títulos de anticuerpos neutralizantes 30 veces mayor para el virus homólogo (CPV-2) que para el virus heterólogo (CPV-2b). Spibey y sus colaboradores también coinciden con estos resultados. En su trabajo vacunaron perros Beagle con una vacuna conteniendo la cepa CPV-2, y realizaron el ensayo de neutralización viral antes del desafío (4 semanas post vacunación). Los títulos de anticuerpos seroneutralizantes obtenidos fueron al menos 13 veces mayor cuando se utilizó la cepa CPV-2 que la cepa CPV-2c. Wilson y cols, (Wilson y cols, 2014), realizaron un estudio amplio donde vacunaron cachorros Beagle con una vacuna multivalente conteniendo CPV-2b y evaluaron perros con y sin anticuerpos maternos contra CPV. Encontraron que la vacuna multivalente lleva a la producción de respuestas serológicas que reacciona de forma cruzada con CPV-2a y 2c y en menor grado con la CPV-2 histórica. Vieron cierto retraso en la inducción de respuesta de anticuerpos en el grupo de cachorros con anticuerpos maternos positivos para CPV al inicio del estudio, respecto a los que no presentaron anticuerpos maternos. Sin embargo, los resultados del desafío indican que los títulos de anticuerpos vistos en los perros vacunados, independientemente de los niveles iniciales de anticuerpos maternos, fueron protectores. En conjunto, los resultados indicaron que existe reactividad cruzada entre las variantes 2a, 2b y 2c, sin embargo los resultados muestran una distancia antigénica mayor con la CPV-2 lo que se refleja en los niveles de respuesta inmune humoral contra esta. De estos datos se desprende la necesidad de actualizar las vacunas compuestas por CPV-2 que hoy continúan en el mercado, porque el CPV-2 de campo ya no existe y por la protección disminuida frente a las nuevas variantes (Pratelli y cols, 2001). Todos los estudios coinciden en una cercana relación entre las nuevas variantes y la posible divergencia en respuesta serológica respecto a la CPV-2 histórica, lo cual coincide con las diferencias aminoacídicas entre ellas.

Si bien en nuestros resultados encontramos una mayor respuesta de anticuerpos seroneutralizantes contra al virus homólogo CPV-2 que respecto a la variante CPV-2c, sería recomendable profundizar en este resultado realizando más ensayos para poder ser mas concluyentes. Es primordial evaluar los anticuerpos seroneutralizantes generados por las VLPs-CPV/VP2-2c enfrentándolos a la cepa de igual subtipo, así como evaluar la respuesta cruzada entre cepa CPV-2c y anticuerpos generados por las VLPs CPV/VP2-2. Por otra parte, para comparar mejor estos resultados con los trabajos publicados, tendríamos que realizarlos en la especie destino, ya que la mayoría los realizaron en cachorros y en esos casos juegan otros factores como los anticuerpos maternos.

Se suma a la diferencia en el comportamiento antigénico de las VLPs que la secuencia aminoacídica de las respectivas VP2 difieren en 12 aminoácidos (Tabla 13), algunos de los cuales

ya han sido reportados, sin embargo hay otros que no. Por lo tanto, la propuesta de construir un clon infectivo para evaluar mutaciones en CPV relacionadas con las propiedades antigénicas no se pudo abordar por los motivos expuestos anteriormente, pero de cierta forma la diferencia en los anticuerpos generados por las VLPs respecto a la cepa desafío CPV-2 parecerían indicar que las mutaciones influyen en la forma de presentación de la partícula viral.

Si bien quedan muchos estudios por hacer, podemos decir que las VLPs de CPV generadas con el sistema Bac to Bac se autoensamblaron correctamente, presentando igual forma y tamaño que la partícula viral nativa. Asimismo, la inmunoreactividad en Western Blot y la actividad hemoaglutinante infieren que se encuentra intacta la propiedad de unión al receptor. Además cuando son administradas en ratones producen una efectiva respuesta inmune protectora, por lo cual podemos pensar que estamos frente a un posible candidato vacunal para el parvovirus canino.

5.7. CONCLUSIONES

- No fue posible producir los clones infectivos mediante las estrategias abordadas.
- Se demostró de manera exitosa la expresión de la proteína VP2 de CPV utilizando el sistema de expresión Baculovirus.
- Las VLPs obtenidas mostraron una correcta expresión al ser evaluadas por inmunofluorescencia, su forma y tamaño fue comprobada por microscopia electrónica y la inmunoreactividad se demostró por Western Blot.
- Las VLPs mostraron actividad hemoaglutinante cuando se incubaron con eritrocitos de cerdo indicando que retiene la propiedad de unión al receptor.
- Las VLPs indujeron un alto título de anticuerpos neutralizantes siendo 8 veces mayor para las VLPs CPV-2 cuando se enfrentó a la cepa homóloga que para las VLPs CPV-2c frente a la cepa heteróloga (CPV-2).

6. PERSPECTIVAS

El objetivo principal de esta tesis fue investigar propiedades biológicas del parvovirus canino analizando genomas y a través de herramientas como la generación y expresión de clones infectivos y de cápsides virales como son las VLPs.

Se logró analizar el 90% de los genomas de las cepas CPV-2 vacunales atenuada y salvaje y de la cepa de campo 294MF perteneciente a la última variante de CPV detectada a nivel mundial, correspondiente al subtipo CPV-2c. La información obtenida analizando estos genomas remarcó la gran variabilidad de CPV, reafirmando la literatura al respecto.

Mediante el uso de VLPs se pudo confirmar la producción de la partícula viral a partir de la proteína VP2 y obtener información acerca de la antigenicidad de las mismas. Se corroboró la importancia de la proteína VP2 de CPV y su capacidad de montar una respuesta inmune específica, enfatizando los antecedentes existentes en este tema.

Sería importante avanzar en el análisis del extremo 5', así como montar los clones infectivos para llegar a abordar con más detalles otras mutaciones que probablemente existan y puedan ser relevantes conjuntamente con la proteína VP2.

En cuanto a las propiedades antigénicas de la cápside de VP2, sería importante realizar los ensayos de seroneutralización empleando una cepa de CPV-2c para poder evaluar la respuesta cruzada de los anticuerpos generados por las VLPs en el modelo ratón. En este punto y considerando una perspectiva más de largo plazo, sería importante realizar este estudio en la especie destino y evaluar cómo se mantiene en el tiempo la respuesta de anticuerpos. Comparándola además con una vacuna comercial para demostrar su verdadera diferencia en lo que refiere a respuesta inmune. Se ha propuesto que la inmunidad generada por las VLPs es de mayor duración y es uno de los atractivos para su uso como candidato vacunal.

7. REFERENCIAS

Agbandje M, McKenna R, Rossmann MG, Strassheim ML, Parrish CR. 1993. "Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 16(2): 155–171. doi: 10.1002/prot.340160204.

Agbandje M, Parrish CR, Rossmann MG. 1995. "The structure of parvoviruses." *Seminars in Virology*. 6(5): 299–309. doi: 10.1006/smvy.1995.0036.

Aldez J, García Díaz J, Calleros L, Sosa K, Iraola G, Marandino A, Hernández M, Panzera Y, Pérez R. 2013. "High local genetic diversity of canine parvovirus from Ecuador." *Veterinary Microbiology*. 166(1–2): 214–219. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.012.

Allison AB, Harbison CE, Pagan I, Stucker KM, Kaelber JT, Brown JD, Ruder MG, Keel MK, Dubovi EJ, Holmes EC, Parrish CR. 2012. "Role of Multiple Hosts in the Cross-Species Transmission and Emergence of a Pandemic Parvovirus." *Journal of Virology*. 86(2):865–872. doi: 10.1128/JVI.06187-11.

Allison AB, Kohler DJ, Fox KA, Brown JD, Gerhold RW, Shearn-Bochsler VI, Dubovi EJ, Parrish CR, Holmes EC. 2013. "Frequent Cross-Species Transmission of Parvoviruses among Diverse Carnivore Hosts." *Journal of Virology*. 87(4):2342–2347. doi: 10.1128/JVI.02428-12.

Amrani N, Desario C, Kadiri A, Cavalli A, Berrada J, Zro K, Sebbar G, Colaianni ML, Parisi A, Elia G, Buonavoglia C, Malik J, Decaro N. 2016. "Molecular epidemiology of canine parvovirus in Morocco." *Infection, Genetics and Evolution*. 41: 201–206. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.005.

Appel MJ, Scott FW, Carmichael LE. 1979. "Isolation and immunisation studies of a canine parvovirus from dogs with haemorrhagic enteritis." *The Veterinary Record*. 105(8): 156–9. doi: 10.1136/vr.105.8.156.

Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. 1993. "The influence of antigen organization on B cell responsiveness." *Science*. 262 (5138): 1448-1451. doi: 10.1126/science.8248784.

Bachmann MF & Zinkernagel RM. 1997. "Neutralizing antiviral B cell responses" *Annual Review of Immunology*. 15:235-270. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.235.

Battilani M, Scagliarini A, Tisato E, Turilli C, Jacoboni I, Casadio R, Prospero S. 2001. "Analysis of canine parvovirus sequences from wolves and dogs isolated in Italy." *Journal of General Virology*. 82(7): 1555–1560. doi:10.1099/0022-1317-82-7-1555.

Battilani M, Ciulli S, Tisato E, Prospero S. 2002 "Genetic analysis of canine parvovirus isolates (CPV-2) from dogs in Italy." *Virus Research*. 83(1–2): 149–157. doi: 10.1016/S0168-1702(01)00431-2.

Blanc A, Negro C, Berois M, Reolon E, Arbiza J. 2011. "Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay". *Ciencia Rural* 41:1436-1440. doi:10.1590/S0103-84782011005000098

Bond SR & Naus CC. 2012. "RF-Cloning.org: An online tool for the design of restriction-free cloning projects." *Nucleic Acids Research*. 40(W1). doi: 10.1093/nar/gks396.

- Brown CS, Van Lent JW, Vlak JM, Spaan WJ. 1991. "Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins." *Journal of Virology*. 65(5):2702-2706.
- Buonavoglia D, Cavalli A, Pratelli A, Martella V, Greco G, Tempesta M, Buonavoglia C. 2000. "Antigenic analysis of canine parvovirus strains isolated initially." *New Microbiologica*. 23(1): 93–96.
- Buonavoglia C, Martella V, Tratelli A. 2001. "Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy." *Journal of General Virology*. 82(12): 3021–3025. doi: 10.1099/0022-1317-82-12-3021.
- Burtonboy S, Charlier P, Hertoghs J, Lobmann M, Wiseman A, Woods S. 1991. "Performance of high titre attenuated canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibody." *The Veterinary Record*. 128(16): 377–381. doi: 10.1136/vr.128.16.377.
- Carman PS & Povey RC. 1985. "Pathogenesis of canine parvovirus-2 in dogs: haematology, serology and virus recovery." *Research in Veterinary Science*. 38(2): 134–40.
- Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RV. 1983. "A modified live canine parvovirus vaccine. II. Immune response." *The Cornell Veterinarian*. 73(1): 13–29.
- Carmichael LE, Schlafer DH, Hashimoto A. 1994. "Minute Virus of Canines (MVC, Canine Parvovirus Type-1): Pathogenicity for Pups and Seroprevalence Estimate" *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 6(2): 165–174. doi: 10.1177/104063879400600206.
- Cavalli A, Martella V, Desario C, Camero M, Bellacicco AL, De Palo P, Decaro N, Elia G, Buonavoglia C. 2008. "Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants." *Clinical and Vaccine Immunology*. 15(3): 534–539. doi: 10.1128/CVI.00444-07.
- Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT. 1999. "Induction of autoantibodies to mouse CCR5 with recombinant papillomavirus particles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(5): 2373-2378. doi: 10.1073/pnas.96.5.2373.
- Chang SF, Sgro JY, Parrish CR. 1992. "Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties." *Journal of Virology*. 66(12): 6858–6867.
- Chapman MS & Rossmann MG. 1993. "Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses." *Virology*. 194(2): 491-508. doi: 10.1006/viro.1993.1288.
- Chen X, Xie Z, Zhao Z, Jiang S, Zhao H, Zhu Y, Zhang X. 2011. "Genetic diversity of parvovirus isolates from dogs and wild animals in China." *Journal of Wildlife Diseases*. 47(4): 1036–1039. doi: 10.7589/0090-3558-47.4.1036
- Chinchkar S, Mohana Subramanian RB, Hanumantha Rao N, Rangarajan PN, Thiagarajan D, Srinivasan VA. 2006. "Analysis of VP2 gene sequences of canine parvovirus isolates in India." *Archives of Virology*. 151(9) 1881–1887. doi: 10.1007/s00705-006-0753-8.
- Cortes E, san Martin C, Langevel J, Meloen R, Dalsgaard K, Vela C, Casal I. 1993. "Topographical analysis of canine parvovirus virions and recombinant VP2 capsids." *Journal of General Virology*. 74(9): 2005–2010. doi: 10.1099/0022-1317-74-9-2005.

Cotmore SF & Tattersall P. 2007. "Parvoviral Host Range and Cell Entry Mechanisms." *Advances in Virus Research*. (70): 183–232. doi: 10.1016/S0065-3527(07)70005-2.

Cotmore SF, Agbandje-McKenna M, Chiorini JA, Mukha DV, Pintel DJ, Qiu J, Soderlund-Venermo M, Tattersall P, Tijssen P, Gatherer D, Davison AJ. 2014. "The family Parvoviridae." *Archives of Virology*. 159(5): 1239–1247. doi: 10.1007/s00705-013-1914-1.

Crisci E, Bárcena J, Montoya M. 2012. "Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections." *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 148(3-4): 211–225. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.04.026.

Csárgola A, Varga S, Lorincz M, Tuboly T. 2014. "Analysis of the full-length VP2 protein of canine parvoviruses circulating in Hungary." *Archives of Virology*. 159(9):2441-2444. doi: 10.1007/s00705-014-2068-5.

Day MJ, Horzinek MC, Schultz RD, Squires RA. 2010. "WSAVA guidelines for the vaccination of dogs and cats." *J Small Anim Pract*. 57(1):E1-E45. doi: 10.1111/jsap.2_12431.

de Almeida Curi NH, Mendes Coelho C, de Campos Cordeiro M, Vaz Magni EM, Lima Sábado MA, Soriano Araujo A, Portela Lobato ZI, Costa Santos JL, Andrade Santos H, Mara Ragozo AA, Pereira de Souza SL. 2012. "Pathogens of Wild Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in Brazil." *Journal of Wildlife Diseases*. 48(4): 1052-1056. doi: 10.7589/2011-10-304.

de Almeida Curi NH, Soriano Araujo A, Souza Campos F, Portela Lobato ZI, Gennari S, Vianna Marvulo MF, Ramos Sila JC, Talamoni SA. 2010. "Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: Disease threats for canid conservation." *Biodiversity and Conservation*. 19(12): 3513–3524. doi: 10.1007/s10531-010-9911-0.

Decaro N, Desario C, Campolo M, Cavalli A, Ricci D, Martella V, Tempesta M, Buonavoglia C. 2004. "Evaluation of lactogenic immunity to canine parvovirus in pups." *New Microbiologica*. 27(4): 375–379.

Decaro N, Desario C, Campolo M, Elia G, Martella V, Ricci D, Lorusso E, Buonavoglia C. 2005a. "Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 17:133–138. doi: 10.1177/104063870501700206.

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

Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, Buonavoglia C. 2005c. "Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection." *Biologicals*. 33(4):261–267. doi: 10.1016/j.biologicals.2005.06.004.

Decaro N, Martella V, Desario C, Bellacicco AL, Camero M, Manna L, d'aloja D, Buonavoglia C. 2006. "First detection of canine parvovirus type 2c in pups with haemorrhagic enteritis in Spain." *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*.

53(10):468–472. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00974.x.

Decaro N, Desario C, Addie DD, Martella V, Vieira MJ, Elia G, Zicola A, Davis C, Thompson G, Thiry E, Truyen U, Buonavoglia C. 2007. “Molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe.” *Emerg Infect Dis*, 13(8):1222–1224. doi: 10.3201/eid1308.070505.

Decaro N, Desario C, Elia G, Martella V, Mari V, Lavazza A, Nardi M, Buonavoglia C. 2008a. “Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c.” *New Microbiologica*, 31(1): 125–130.

Decaro N, Desario C, Miccolupo A, Campolo M, Parisi A, Martella V, Amorisco F, Lucente MS, Lavazza A, Buonavoglia C. 2008b. “Genetic analysis of feline panleukopenia viruses from cats with gastroenteritis.” *Journal of General Virology*. 89(9):2290–2298. doi: 10.1099/vir.0.2008/001503-0.

Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C. 2009a. “Genetic analysis of canine parvovirus type 2c.” *Virology*. 385(1):5–10. doi: 10.1016/j.virol.2008.12.016.

Decaro N, Cirone F, Desario C, Elia G, Lorusso E, Colaianni ML, Martella V, Buonavoglia C. 2009b. Severe parvovirus in a 12-year-old dog that had been repeatedly vaccinated. *Veterinary Record*. 164:593-595. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.164.19.593>.

Decaro N, Buonavoglia D, Desario C, Amorisco F, Colaianni ML, Parisi A, Terio V, Elia G, Lucente MS, Cavalli A, Martella V, Buonavoglia C. 2010. “Characterisation of canine parvovirus strains isolated from cats with feline panleukopenia.” *Research in Veterinary Science*. 89(2): 275–278. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.03.001.

Decaro N & Buonavoglia C. 2012. “Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c” *Veterinary Microbiology*. 155(1):1–12. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.007.

De la Torre D, Mafla E, Puga B, Erazo L, Astolfi-Ferreira C, Ferreira AP. 2018. “Molecular characterization of canine parvovirus variants (CPV-2a, CPV-2b, and CPV-2c) based on the VP2 gene in affected domestic dogs in Ecuador.” *Veterinary World*. 11(4):480-487. doi: 10.14202/vetworld.2018.480-487.

de Oliveira PSB, Cargnelutti J, Masuda E, Figuera RA, Kommers GD, da Silva MC, Weiblen R, Flores EF. 2018. “Epidemiological, clinical and pathological features of canine parvovirus 2c infection in dogs from southern Brazil.” *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 38(1):113-118. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5122.

Dogonyaro BB, Bosman AM, Sibeko KP, Venter EH, van Vuuren M. 2013. “Genetic analysis of the VP2-encoding gene of canine parvovirus strains from Africa.” *Veterinary Microbiology*. 165(3–4): 460–465. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.04.022.

Duarte MD, Henriques AM, Barros SC, Fagulha T, Mendonça P, Carvalho P, Monteiro M, Fevereiro M, Basto MP, Rosalino LM, Barros T, Bandeira V, Fonseca C, Cunha MV. 2013. “Snapshot of Viral Infections in Wild Carnivores Reveals Ubiquity of Parvovirus and Susceptibility of Egyptian Mongoose to Feline Panleukopenia Virus.” *PLoS ONE*. 8(3):e59399 doi: 10.1371/journal.pone.0059399.

- Eleraky NZ, Potgieter LND, Kennedy MA. 2002. "Virucidal efficacy of four new disinfectants." *Journal of the American Animal Hospital Association*. 38(3):231-234. doi: 10.5326/0380231.
- Elia G, Desario C, Pezzoni G, Camero M, Brocchi E, Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. 2012. "Recombinant ELISA using baculovirus-expressed VP2 for detection of antibodies against canine parvovirus." *Journal of Virological Methods*. 184(1-2):98-102. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.025.
- Faz M, Martínez JS, Gómez LB, Quijano-Hernández I, Fajardo R, Del Ángel-Caraza J. 2018. "Origin and genetic diversity of canine parvovirus 2c circulating in Mexico." *Archives of Virology*. 164(2):371-379. doi:10.1007/s00705-018-4072-7.
- Fehr T, Skrastina D, Pumpens P, Zinkernagel RM. 1998. "T cell-independent type I antibody response against B cell epitopes expressed repetitively on recombinant virus particles." *PNAS*. 95(16):9477-9481. doi: 10.1073/pnas.95.16.9477.
- Feng H, Hu GQ, Wang HL, Liang M, Liang H, Guo H, Zhao P, Yang YJ, Zheng XX, Zhang ZF, Zhao YK, Gao YW, Yang ST, Xia XZ. 2014. "Canine parvovirus VP2 protein expressed in silkworm pupae self-assembles into virus-like particles with high immunogenicity." *PLoS ONE*. 9(1):e79575. doi: 10.1371/journal.pone.0079575.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2001. *Fields Virology*, 4th Edition, Fields Virology.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM. 2013. *Fields Virology*, 6th Edition, Fields Virology. doi: 10.1093/cid/ciu346.
- Filipov C, Decaro N, Desario C, Amorisco F, Sciarretta R, Buonavoglia C. 2011. "Canine Parvovirus Epidemiology in Bulgaria." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23(1): 152-154. doi: 10.1177/104063871102300129.
- Filipov C, Desario C, Patouchas O, Eftimov P, Gruichev G, Manov V, Filipov G, Buonavoglia C, Decaro N. 2016. "A Ten-Year Molecular Survey on Parvoviruses Infecting Carnivores in Bulgaria." *Transboundary and emerging diseases*. 63(4):460-464. doi: 10.1111/tbed.12285.
- Filoni C, Catão-Dias JL, Bay G, Durigon EL, Jorge RS, Lutz H, Hofmann-Lehmann R. 2006. "First Evidence of Feline Herpesvirus, Calicivirus, Parvovirus, and Ehrlichia Exposure in Brazilian Free-ranging Felids." *Journal of Wildlife Diseases*. 42(2):470-477. doi: 10.7589/0090-3558-42.2.470.
- French TJ & Roy, P. 1990. "Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV." *Journal of Virology*. 64(4):1530-1536.
- Furtado MM, Hayashi EM, Allendorf SD, Coelho CJ, de Almeida Jácomo AT, Megid J, Ramos Filho JD, Silveira L, Tôrres NM, Ferreira Neto JS. 2016. "Exposure of Free-Ranging Wild Carnivores and Domestic Dogs to Canine Distemper Virus and Parvovirus in the Cerrado of Central Brazil." *EcoHealth*. 13(3):549-557. doi: 10.1007/s10393-016-1146-4.
- Gallo Calderón M, Romanutti C, D' Antuono A, Keller L, Mattion N, La Torre J. 2011. "Evolution of Canine Parvovirus in Argentina between years 2003 and 2010: CPV2c has become the predominant variant affecting the domestic dog population." *Virus Research*. 157(1): 106-110. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.015.

- Gallo Calderón M, Wilda M, Boado L, Keller L, Malirat V, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. 2012. "Study of canine parvovirus evolution: Comparative analysis of full-length VP2 gene sequences from Argentina and international field strains." *Virus Genes*. 44(1):32–39. doi: 10.1007/s11262-011-0659-8.
- Gallo Calderón M, Romanutti C, Wilda M, D' Antuono A, Keller L, Giacomodonato MN, Mattion N, La Torre J. 2015. "Resurgence of canine parvovirus 2a strain in the domestic dog population from Argentina." *Journal of Virological Methods*. 222: 145–149. doi: 10.1016/j.jviromet.2015.06.012.
- Garcea RL & Gissmann L. 2004. "Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules." *Current Opinion in Biotechnology*. 15(6):513-517. doi: 10.1016/j.copbio.2004.10.002.
- Geng Y, Guo D, Li C, Wang E, Wei S, Wang Z, Yao S, Zhao X, Su M, Wang X, Wang J, Wu R, Feng L, Sun D. 2015. "Co-circulation of the rare CPV-2c with unique Gln370Arg substitution, new CPV-2b with unique Thr440Ala substitution, and new CPV-2α with high prevalence and variation in Heilongjiang Province, Northeast China." *PLoS ONE*. 10(9). doi: 10.1371/journal.pone.0137288.
- Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecedrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM. 2001. "High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants." *FEBS Letters*. 488(1–2):13–17. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02405-4.
- Gil F, Reytor E, Pérez-Filgueira DM, Escribano JM. 2007. "Multimerization of peptide antigens for production of stable immunogens in transgenic plants." *Journal of Biotechnology*. 128(3):512-518. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.11.001.
- Gjeltema J, Murphy H, Rivera S. 2015. "Clinical Canine Parvovirus Type 2C Infection in a Group of Asian Small-Clawed Otters (*Aonyx Cinerea*)." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 46(1): 120–123. doi: 10.1638/2014-0090R1.1.
- Glickman LT, Domanski LM, Patronek GJ, Visintainer F. 1985. "Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis." *J Am Vet Med Assoc*, 187(6):589–594.
- Goddard A & Leisewitz AL. 2010. "Canine Parvovirus." *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 40(6): 1041–1053. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.07.007.
- Godsall SA, Clegg SR, Stavisky JH, Radford AD, Pinchbeck G. 2010. "Epidemiology of canine parvovirus and coronavirus in dogs presented with severe diarrhoea to PDSA PetAid hospitals." *The Veterinary Record*. 167(6):196–201. doi: 10.1136/vr.c3095.
- Grecco S, Iraola G, Decaro N, Alfieri A, Alfieri A, Gallo Calderón M, da Silva AP, Name D, Aldaz J, Calleros L, Marandino A, Tomás G, Maya L, Francia L, Panzera Y, Pérez R. 2018. "Inter- and intracontinental migrations and local differentiation have shaped the contemporary epidemiological landscape of canine parvovirus in South America." *Virus Evolution*. 4(1). doi: 10.1093/ve/vey011.
- Greenwood NM, Chalmers WS, Baxendale W, Thompson H. 1995. "Comparison of isolates of canine parvovirus by restriction enzyme analysis, and vaccine efficacy against field strains." *The Veterinary Record*. 136(3): 63–67.

- Guo L, Yang SL, Chen SJ, Zhang Z, Wang C, Hou R, Ren Y, Wen X, Cao S, Guo W, Hao Z, Quan Z, Zhang M, Yan QG. 2013. "Identification of canine parvovirus with the Q370R point mutation in the VP2 gene from a giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)." *Virology Journal*. 10(1): 163. doi: 10.1186/1743-422X-10-163.
- Haffestein S, Bowman VD, Sun T, Nelson CD, Palermo LM, Chipman PR, Battisti AJ, Parrish CR, Rossmann MG. 2009. "Structural comparison of different antibodies interacting with Parvovirus Capsids" *Journal of Virology*. 83(11):5556-5566. doi:10.1128/JVI.02532-08.
- Hall T. 1999 "BioEdit Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP/Vista/7." *Nucleic Acids Symposium Series*. doi: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.
- Han SC, Guo HC, Sun SQ, Shu L, Wei YQ, Sun DH, Cao SZ, Peng GN, Liu XT. 2015. "Full-length genomic characterizations of two canine parvoviruses prevalent in Northwest China." *Archives of Microbiology*. 197(4):621-626. doi: 10.1007/s00203-015-1093-4.
- Hernández-Blanco B. & Catala-López, F. 2015. "Are licensed canine parvovirus (CPV2 and CPV2b) vaccines able to elicit protection against CPV2c subtype in puppies?: A systematic review of controlled clinical trials." *Veterinary Microbiology*. 180(1-2):1-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.027.
- Hirt B. (1967) "Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures." *Journal of Molecular Biology*. 26(2):365-369. doi: 10.1016/0022-2836(67)90307-5.
- Hoelzer K, Shackelton LA, Holmes EC, Parrish CR. 2008a. "Within-Host Genetic Diversity of Endemic and Emerging Parvoviruses of Dogs and Cats." *Journal of Virology*. 82(22): 11096-11105. doi: 10.1128/JVI.01003-08.
- Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR, Holmes EC. 2008b. "Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses." *The Journal of General Virology*. 89(Pt 9): 2280-2289. doi: 10.1099/vir.0.2008/002055-0.
- Hoelzer K & Parrish CR. 2010. "The emergence of parvoviruses of carnivores." *Veterinary Research*. 41(6): 39. doi: 10.1051/vetres/2010011.
- Hong C, Decaro N, Desario C, Tanner P, Pardo MC, Sanchez S, Buonavoglia C, Saliki JT. 2007. "Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 19(5): 535-539. doi: 10.1177/104063870701900512.
- Hoque M, Shimizu N, Ishizu Ki, Yajima H, Arisaka F, Suzuki K, Watanabe H, Handa H. 1999. "Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus." *Biochemical and biophysical research communications*. 266(2):371-376. doi: 10.1006/bbrc.1999.1831.
- Horiuchi M. & Shinagawa M. 1993. "Construction of an infectious DNA clone of the Y 1 strain of canine parvovirus and characterization of the virus derived from the clone." *Archives of Virology*. 130(3-4):227-236. doi: 10.1007/BF01309656.
- Houston DM, Ribble CS, Head LL. 1996. "Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991)." *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(4):542-546.
- Hueffer K, Parker JS, Weichert WS, Geisel RE, Sgro JY, Parrish CR. 2003. "The natural host range

shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor." *Journal of Virology*. 77(3):1718-1726.

Hueffer K. & Parrish CR. 2003. "Parvovirus host range, cell tropism and evolution." *Current Opinion in Microbiology*. 6(4): 392–398. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00083-3.

Hurtado A, Rueda P, Nowicky J, Sarraseca J, Casal JI. 1996. "Identification of domains in Canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles." *Journal of Virology*. 70(8): 5422–5429.

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*. 278(1): 13–19. doi: 10.1006/viro.2000.0653.

Invitrogen. 2015. "Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System." Manual. doi: 10.1016/j.marpol.2010.05.007.

Jakel V, Cussler K, Hanschmann KM, Truyen U, König M, Kamphuis E, Duchow K. 2012. "Vaccination against Feline Panleukopenia: implications from a field study in kittens." *BMC Veterinary Research*. doi: 10.1186/1746-6148-8-62.

Jennings GT. & Bachmann MF. 2008. "The coming of age of virus-like particle vaccines." *Biological Chemistry*. 389(5):521-536. doi: 10.1515/BC.2008.064.

Jeoung SY, Ahn SJ & Kim D. 2008. "Genetic analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Korea." *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(7):719–722. doi: 10.1292/jvms.70.719.

Jin H, Xia X, Liu B, Fu Y, Chen X, Wang H, Xia Z. 2016. "High-yield production of canine parvovirus virus-like particles in a baculovirus expression system." *Archives of Virology*. 161(3): 705–710. doi: 10.1007/s00705-015-2719-1.

Johnson JE. & Chiu W. 2000. "Structures of virus and virus-like particles." *Current Opinion in Structural Biology*. 10(2):229-235. doi: 10.1016/S0959-440X(00)00073-7.

Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Shimada T, Young NS. 1991. "Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(11):4646-4650. doi: 10.1073/pnas.88.11.4646.

Kang BK, Song DS, Lee CS, Jung KI, Park SJ, Kim EM, Park BK. 2008. "Prevalence and genetic characterization of canine parvoviruses in Korea." *Virus Genes*. 36(1):127–133. doi: 10.1007/s11262-007-0189-6.

Kapil S, Cooper E, Lamm C, Murray B, Rezabek G, Johnston L 3rd, Campbell G, Johnson B. 2007. "Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in north American dogs in 2006 and 2007." *Journal of Clinical Microbiology*. 45(12):4044–4047. doi: 10.1128/JCM.01300-07.

Kapiya J, Nalubamba KS, Kaimoyo E, Changula K, Chidumayo N, Saasa N, Simuunza MC, Takada A, Mweene AS, Chitanga S, Simulundu E. 2018. "First genetic detection and characterization of canine parvovirus from diarrheic dogs in Zambia." *Archives of Virology*. 164(1):303-307. doi: 10.1007/s00705-018-4068-3.

Kariatsumari T, Horiuchi M, Hama E, Yaguchi K, Ishiguro N, Goto H, Shinagawa M. 1991. "Construction and nucleotide sequence analysis of an infectious DNA clone of the autonomous parvovirus, mink enteritis virus" *Journal of General Virology*. 72(Pt 4):867-875. doi: 10.1099/0022-1317-72-4-867.

Koptopoulos G, Papadopoulos O, Papanastasopoulou M, Cornwell HJ. 1986. "Presence of antibody cross-reacting with canine parvovirus in the sera of dogs from Greece." *The Veterinary Record*. 118(12):332-333.

Kouskoff V, Lacaud G, Nemazee D. 2000. "T cell-independent rescue of B lymphocytes from peripheral immune tolerance." *Science*. 287(5462):2501-2503. doi: 10.1126/science.287.5462.2501.

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. "MEGA7 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7 . 0 for Bigger Datasets Brief communication" *Molecular biology and evolution*. 33(7):1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.

Langeveld JP, Casal JI, Osterhaus AD, Cortés E, de Swart R, Vela C, Dalsgaard K, Puijk WC, Schaaper WM, Melen RH. 1994. "First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs." *Journal of Virology*. 68(7): 4506-4513.

Larson LJ. & Schultz RD. 2008. "Do two current canine parvovirus type 2 and 2b vaccines provide protection against the new type 2c variant?" *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine*. 9(2): 94-101.

Laurila J. 2007. "PML-nuclear body dynamics in canine parvovirus infection". Thesis. https://jyx.jyu.fi/bitstream/handle/123456789/11513/URN_NBN_fi_jyu-2007424.pdf

Lin C, Chien CH, Chiou MT, Chueh LL, Hung MY, Hsu HS. 2014. "Genetic characterization of type 2a canine parvoviruses from Taiwan reveals the emergence of an Ile324 mutation in VP2." *Virology Journal*. 11: 39. doi: 10.1186/1743-422X-11-39.

Ling M, Norris JM, Kelman M, Ward MP. 2012. "Risk factors for death from canine parvoviral-related disease in Australia." *Veterinary Microbiology*. 158(3-4):280-290. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.02.034.

Liu F, Wu X, Li L, Liu Z, Wang Z. 2013. "Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges." *Protein Expression and Purification*. 90(2):104-116. doi: 10.1016/j.pep.2013.05.009.

López de Turiso JA, Cortés E, Martínez C, Ruiz de Ybáñez R, Simarro I, Vela C, Casal I. 1992. "Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs." *Journal of Virology*. 66(5):2748-2753.

Martella V, Cavalli A, Pratelli A, Bozzo G, Camero M, Buonavoglia D, Narcisi D, Tempesta M, Buonavoglia C. 2004. "A Canine Parvovirus Mutant Is Spreading in Italy." *Journal of Clinical Microbiology*. 42(3): 1333-1336. doi: 10.1128/JCM.42.3.1333-1336.2004.

Martella V, Cavalli A, Decaro N, Elia G, Desario C, Campolo M, Bozzo G, Tarsitano E, Buonavoglia C. 2005. "Immunogenicity of an intranasally administered modified live canine parvovirus type 2b vaccine in pups with maternally derived antibodies." *Clinical and diagnostic laboratory*

immunology. 12(10):1243–1245. doi: 10.1128/CDLI.12.10.1243-1245.2005.

Marulappa SY. & Kapil S. 2009. "Simple tests for rapid detection of canine parvovirus antigen and canine parvovirus-specific antibodies." *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(1):127–131. doi: 10.1128/CVI.00304-08.

Maya L, Calleros L, Francia L, Hernández M, Iraola G, Panzera Y, Sosa K, Pérez R. 2013. "Phylogenetics analysis of canine parvovirus in Uruguay: Evidence of two successive invasions by different variants." *Archives of Virology*. 158(6):1133–1141. doi: 10.1007/s00705-012-1591-5.

McKenna R, Olson NH, Chipman PR, Baker TS, Booth TF, Christensen J, Aasted B, Fox JM, Bloom ME, Wolfenbarger JB, Agbandje-McKenna M. 1999. "Three-dimensional structure of Aleutian mink disease parvovirus: implications for disease pathogenicity." *Journal of Virology*. 73(8): 6882–6891.

Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Slauson DO. 1984. "Experimental viral myocarditis: parvoviral infection of neonatal pups." *Veterinary Pathology*. 21(1984):509–515. doi: 10.1177/030098588402100510.

Miller CL. & Pintel DJ. 2002. "Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells". *Journal of Virology*. 76(7):3257–3266. doi: 10.1128/JVI.76.7.3257-3266.2002

Mira F, Dowgier G, Purpari G, Vicari D, Di Bella S, Macaluso G, Gucciardi F, Randazzo V, Decaro N, Guercio A. 2018. "Molecular typing of a novel canine parvovirus type 2a mutant circulating in Italy." *Infection, Genetics and Evolution*. 61:67-73. doi: 10.1016/j.meegid.2018.03.010.

Miranda C, Parrish CR, Thompson G. 2016a. "Epidemiological evolution of canine parvovirus in the Portuguese domestic dog population." *Veterinary Microbiology*. 183:37–42. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.11.037.

Miranda C. & Thompson G. 2016b. "Canine parvovirus: The worldwide occurrence of antigenic variants." *Journal of General Virology*. 97(9):2043–2057. doi: 10.1099/jgv.0.000540.

Mittal M, Chakravarti S, Mohapatra JK, Chug PK, Dubey R, Upmanuy V, Narwal PS, Kumar A, Churamani CP, Kanwar NS. 2014. "Molecular typing of canine parvovirus strains circulating from 2008 to 2012 in an organized kennel in India reveals the possibility of vaccination failure" *Infection, Genetics and Evolution*, 23:1–6. doi: 10.1016/j.meegid.2014.01.015.

Mochizuki M, Horiuchi M, Hiragi H, San Gabriel MC, Yasuda N, Uno T. 1996. "Isolation of canine parvovirus from a cat manifesting clinical signs of feline panleukopenia." *Journal of Clinical Microbiology*. 34(9):2101–2105.

Mukhopadhyay HK, Matta SL, Amsaveni S, Antony PX, Thanislass J, Pillai RM. 2014. "Phylogenetic analysis of canine parvovirus partial VP2 gene in India." *Virus Genes*. 48(1):89–95. doi: 10.1007/s11262-013-1000-5.

Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ. 2003. "Immunization with hepatitis C virus-like particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection." *Proc Natl Acad Sci USA*. 100(11):6753–6758. doi: 10.1073/pnas.1131929100.

Naeger LK, Cater J, Pintel DJ. 1990. "The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus

minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner." *Journal of Virology*. 64(12): 6166–6175.

Nakamura M, Tohya Y, Miyazawa T, Mochizuki M, Phung HT, Nguyen NH, Huynh LM, Nguyen LT, Nguyen PN, Nguyen PV, Nguyen NP, Akashi H. 2004. "A novel antigenic variant of Canine parvovirus from a Vietnamese dog." *Archives of Virology*. 149(11):2261–2269. doi: 10.1007/s00705-004-0367-y.

Nan L, Liu Y, Ji P, Feng H, Chen C, Wang J, Liu D, Cui Y, Wang Y, Li Y, Zhou E, Zhang G. 2018. "Trigger factor assisted self-assembly of canine parvovirus VP2 protein into virus-like particles in *Escherichia coli* with high immunogenicity." *Virology Journal*. 15(1):103. doi: 10.1186/s12985-018-1013-8.

Nandi S & Kumar M. 2010. "Canine parvovirus: Current perspective." *Indian Journal of Virology*. 21(1):31–44. doi: 10.1007/s13337-010-0007-y.

Nandi S, Chidri S, Kumar M, Chauhan RS. 2010. "Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India." *Research in Veterinary Science*. 88(1):169–171. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.018.

Nandi S, Kumar M, Mahapatra, Ravishankar C. 2013. "Emergence of canine parvovirus - 2 variants and its impact on vaccination." *World Applied Sciences Journal*. 23(10):1366-1376. doi: 10.5829/idosi.wasj.2013.23.10.1823.

Ntafis V, Xylouri E, Kalli I, Desario C, Mari V, Decaro N, Buonavoglia C. 2010. "Characterization of Canine parvovirus 2 variants circulating in Greece." *Journal of veterinary diagnostic investigation official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc*. 22(5): 737–740. doi: 10.1177/104063871002200512.

Ohneiser SA, Hills SF, Cave NJ, Passmore D, Dunowska M. 2015. "Canine parvoviruses in New Zealand form a monophyletic group distinct from the viruses circulating in other parts of the world." *Veterinary Microbiology*. 178(3–4):190–200. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.017.

Palermo LM, Hafenstein SL, Parrish CR. 2006. "Purified feline and canine transferrin receptors reveal complex interactions with the capsids of canine and feline parvoviruses that correspond to their host ranges." *Journal of Virology*. 80(17):8482–8492. doi: 10.1128/JVI.00683-06.

Paliard X, Liu Y, Wagner R, Wolf H, Baenziger J, Walker CM. 2000. "Priming of Strong, Broad, and Long-Lived HIV Type 1 p55^{gag}-Specific CD8⁺ Cytotoxic T Cells after Administration of a Virus-Like Particle Vaccine in Rhesus Macaques." *AIDS Research and Human Retroviruses*. 16(3):273-282. doi: 10.1089/088922200309368.

Paradiso PR, Rhode SL, Singer II. 1982. "Canine parvovirus: A biochemical and ultrastructural characterization." *Journal of General Virology*. 62(1):113–125. doi: 10.1099/0022-1317-62-1-113.

Parker JS & Parrish CR. 2000. "Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking." *Journal of Virology*. 74(4):1919–1930. doi: 10.1128/JVI.74.4.1919-1930.2000.

Parker JS, Murphy WJ, Wang D, O'Brien SJ, Parrish CR. 2001. "Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells." *Journal of Virology*.

75(8):3896–3902. doi: 10.1128/JVI.75.8.3896-3902.2001.

Parrish CR & Carmichael LE. 1986. "Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus." *Virology*. 148(1):121–132. doi: 10.1016/0042-6822(86)90408-3

Parrish CR, Aquadro CF, Carmichael LE. 1988a. "Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses." *Virology*. 166(2): 293–307. doi: 10.1016/0042-6822(88)90500-4.

Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, Evermann JF, Senda M, Carmichael LE. 1988b. "The global spread and replacement of canine parvovirus strains." *Journal of General Virology*. 69(5):1111–1116. doi: 10.1099/0022-1317-69-5-1111.

Parrish CR. 1991. "Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones." *Virology*. 183(1): 195–205. doi: 10.1016/0042-6822(91)90132-U.

Parrish CR, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammed HO. 1991. "Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus." *Journal of Virology*. 65(12):6544–6552.

Parrish CR. (1995) "3 Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus." *Bailliere's Clinical Haematology*. 8(1):57–71. doi: 10.1016/S0950-3536(05)80232-X.

Parrish CR. 1999. "Host range relationships and the evolution of canine parvovirus." in *Veterinary Microbiology*. 29–40. doi: 10.1016/S0378-1135(99)00084-X.

Pedroza-Roldan C, Páez-Magallan V, Charles-Niño C. 2015. "Genotyping of Canine parvovirus in western Mexico." *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* 27(1):107–111. doi: 10.1177/1040638714559969.

Pereira, CA, Monezi TA, Mehnert DU, D'Angelo M, Durigon EL. 2000. "Molecular characterization of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay." *Veterinary Microbiology*. 75(2):127–133. doi: 10.1016/S0378-1135(00)00214-5.

Pereira CA, Leal ES, Durigon EL. 2007. "Selective regimen shift and demographic growth increase associated with the emergence of high-fitness variants of canine parvovirus." *Infection, Genetics and Evolution*. 7(3):399–409. doi: 10.1016/j.meegid.2006.03.007.

Pérez R, Francia L, Romero V, Maya L, López I, Hernández M. 2007. "First detection of canine parvovirus type 2c in South America." *Veterinary Microbiology*. 124(1–2):147–152. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.04.028.

Pérez R, Bianchi P, Calleros L, Francia L, Hernández M, Maya L, Panzera Y, Sosa K, Zoller S. 2012. "Recent spreading of a divergent canine parvovirus type 2a (CPV-2a) strain in a CPV-2c homogenous population." *Veterinary Microbiology*. 155(2–4):214–219. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.017.

Pérez RP, Calleros L, Marandino A, Sarute N, Iraola G, Grecco S, Blanc H, Vignuzzi M, Isakov

- O, Shomron N, Carrau L, Hernández M, Francia L, Sosa K, Tomás G, Panzera Y. 2014. "Phylogenetic and genome-wide deep-sequencing analyses of Canine parvovirus reveal co-infection with field variants and emergence of a recent recombinant strain." *PloS ONE*. 9(11):e111779. doi: 10.1371/journal.pone.0111779.
- Phromnoi S, Sirinarumitr K, Sirinarumitr T. 2010. "Sequence analysis of VP2 gene of canine parvovirus isolates in Thailand." *Virus Genes*. 41(1):23–29. doi: 10.1007/s11262-010-0475-6.
- Pinto LD, Streck AF, Gonçalves KR, Souza CK, Corbellini ÂO, Corbellini LG, Canal CW. 2012. "Typing of canine parvovirus strains circulating in Brazil between 2008 and 2010." *Virus Research*. 165(1):29–33. doi: 10.1016/j.virusres.2012.01.001.
- Plana-Duran J, Bastons M, Rodriguez MJ, Climent I, Cortés E, Vela C, Casal I. 1996. "Oral immunization of rabbits with VP60 particles confers protection against rabbit hemorrhagic disease." *Archives of Virology*. 141(8):1423-1436. doi: 10.1007/BF01718245.
- Plummer EM & Manchester M. 2011. "Viral nanoparticles and virus-like particles: Platforms for contemporary vaccine design." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. doi: 10.1002/wnan.119.
- Pollock RV & Carmichael LE. 1982. "Maternally derived immunity to canine parvovirus infection: transfer, decline, and interference with vaccination." *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 180(1):37–42.
- Pollock RV & Carmichael LE. 1983a. "Use of modified live feline panleukopenia virus vaccine to immunize dogs against canine parvovirus." *American Journal of Veterinary Research*. 44(2):169–175.
- Pollock RV & Carmichael LE. 1983b. "Canine viral enteritis." *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*. doi: 10.1016/S0195-5616(83)50059-4.
- Pratelli A, Cavalli A, Martella V, Tempesta M, Decaro N. 2001. "Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody responses in pups after inoculation with CPV2 or CPV2b modified live virus vaccine." *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8(3):612–615. doi: 10.1128/CDLI.8.3.612-615.2001.
- Prittie J. (2004) "Canine parvoviral enteritis: A review of diagnosis, management, and prevention." *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. doi: 10.1111/j.1534-6935.2004.04020.x.
- Qin Q, Loeffler IK, Li M, Tian K, Wei F. 2007. "Sequence analysis of a canine parvovirus isolated from a red panda (*Ailurus fulgens*) in China." *Virus Genes*. 34(3):299–302. doi: 10.1007/s11262-006-0023-6.
- Reed AP, Jones EV, Miller TJ. 1988. "Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus." *Journal of Virology*. 62(1):266–276.
- Reed LJ & Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938;27:493–497.
- Rhode SL. 1985. "Nucleotide sequence of the coat protein gene of canine parvovirus." *Journal of Virology*. 54(2):630–3.

- Ros C, Gerber M, Kempf C. 2006. "Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity." *Journal of Virology*. 80(24):12017–12024. doi: 10.1128/JVI.01435-06.
- Rose RC. 1993. "Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles." *Journal of Virology*.
- Rossmann MG. 1989. "The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance." *Journal of Biological Chemistry*. 14587–14590.
- Rossmann MG & Palmenberg AC. 1988. "Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses." *Virology*. 164(2):373–382. doi: 10.1016/0042-6822(88)90550-8.
- Rueda P, Fominaya J, Langeveld JP, Brusckhe C, Vela C, Casal JI. 2000. "Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles." *Vaccine*. 19(7-8):726-734. doi: 10.1016/S0264-410X(00)00259-0.
- Sabara M, Parker M, Aha P, Cosco C, Gibbons E, Parsons S, Babiuk LA. 1991. "Assembly of double-shelled rotaviruslike particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins." *Journal of Virology*. 65(12):6994-6997.
- Sahna KC, Gencay A, Atalay O. 2008. "Viral aetiology of diarrhoea in puppies from a same shelter in Turkey: presence of mixed infections." *Revue de Médecine Vétérinaire*. 159(6):345–347.
- Saliki JT, Mizak B, Flore HP, Gettig RR, Burand JP, Carmichael LE, Wood HA, Parrish CR. 1992. "Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: Use in analysis of viral properties and immunization of dogs." *Journal of General Virology*. 73(2):369–374. doi: 10.1099/0022-1317-73-2-369.
- Santos N, Almendra C, Tavares L. 2009. "Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal." *Journal of Wildlife Diseases*. 45(1): 221–226. doi: 10.7589/0090-3558-45.1.221.
- Santra L, Rajmani RS, Kumar GV, Saxena S, Dhara SK, Kumar A, Sahoo AP, Singh LV, Desai GS, Chaturvedi U, Kumar S, Tiwari AK. 2014. "Non-Structural protein 1 (NS1) gene of Canine Parvovirus-2 regresses chemically induced skin tumors in Wistar rats." *Research in Veterinary Science*. 97(2):292–296. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.07.024.
- Saxena L, Chaturvedi U, Saxena S, Kumar GR, Sahoo AP, Kumar S, Doley J, Rajmani RS, Singh PK, Kumar R, Tiwari AK. 2011. "Characterization and in vitro expression of non-structural 1 protein of canine parvovirus (CPV-2) in mammalian cell line" *Indian Journal of Experimental Biology*. 49(9):654–659.
- Schirmbeck R, Bohm W, Reimann J. 1996. "Virus-like particles induce MHC class I-restricted T-cell responses. Lessons learned from the hepatitis B small surface antigen." *Intervirology*. 39(1-2):111-9. doi: 10.1159/000150482.
- Schultz RD. 2006. "Duration of immunity for canine and feline vaccines: A review." *Veterinary Microbiology*. 117(1):75-79. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.013.

- Schunck B, Kraft W, Truyen U. 1995. "A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces." *Journal of Virological Methods*. 55(3): 427–433. doi: 10.1016/0166-0934(95)00069-3.
- Scott FW. 1980. "Virucidal disinfectants and feline viruses." *American Journal of Veterinary Research*. 41(3):410-414.
- Scott FW, Csiza CK, Gillespie JH. 1970. "Maternally derived immunity to feline panleukopenia." *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 156(4):439-453.
- Sedlik C, Sarraseca J, Rueda P, Leclerc C, Casal I. 1995. "Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particles." *Journal of General Virology*. 76 (Pt 9):2361-2368. doi: 10.1099/0022-1317-76-9-2361.
- Sedlik C, Saron M, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. 1997. "Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: A novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells." *Immunology*. 94(14):7503-7508. doi: 10.1073/pnas.94.14.7503.
- Senda M, Parrish CR, Harasawa R, Gamoh K, Muramatsu M, Hirayama N, Itoh O. 1995. "Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines." *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1):110–113.
- Shackelton LA, Parrish CR, Truyen U, Holmes EC. 2005. "High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102(2):379–384. doi: 10.1073/pnas.0406765102.
- Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P. 1985. "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae." *Intervirology*. 23:61–73. doi: 10.1159/000149587.
- Silva SP, Silva LNPP, Rodrigues EDL, Cardoso JF, Tavares FN, Souza WM, Santos CMP, Martins FMS, Jesus IS, Brito TC, Moura TPC, Nunes MRT, Casseb LMN, Silva Filho E, Casseb AR. 2017. "Full-length genomic and molecular characterization of Canine parvovirus in dogs from north of Brazil." *Genetics and Molecular Research*. 16(3). doi: 10.4238/gmr16039719.
- Sime TA, Powell LL, Schildt JC, Olson EJ. 2015. "Parvoviral myocarditis in a 5-week-old Dachshund." *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 25(6):765–769. doi: 10.1111/vec.12347.
- Simpson AA, Chandrasekar V, Hébert B, Sullivan GM, Rossmann MG, Parrish C. 2000. "Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses." *Journal of Molecular Biology*. 300(3):597-610. doi: 10.1006/jmbi.2000.3868.
- Soma T, Taharaguchi S, Ohinata T, Ishii H, Hara M. 2013. "Analysis of the VP2 protein gene of canine parvovirus strains from affected dogs in Japan." *Research in Veterinary Science*. 94(2):368–371. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.09.013.
- Spibey N, Greenwood NM, Sutton D, Chalmers WS, Tarpey I. 2008. "Canine parvovirus type 2 vaccine protects against virulent challenge with type 2c virus." *Veterinary Microbiology*. 128(1–2): 48–55. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.09.015.

Steinel A, Venter EH, Van Vuuren M, Parrish CR, Truyen U. 1998. "Antigenic and genetic analysis of canine parvoviruses in southern Africa." *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 65(4):239–242.

Steinel A, Munson L, van Vuuren M, Truyen U. 2000. "Genetic characterization of feline parvovirus sequences from various carnivores." *Journal of General Virology*. 81(2):345–350. doi: 10.1099/0022-1317-81-2-345.

Steinel A, Parrish CR, Bloom ME, Truyen U. 2001. "Parvovirus infections in wild carnivores." *Journal of Wildlife Diseases*. 37(3):594–607. doi: 10.7589/0090-3558-37.3.594.

Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR. 1994. "Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid." *Virology*. 198(1): 175–184. doi: 10.1006/viro.1994.1020.

Suikkanen S, Sääjärvi K, Hirsimäki J, Vällilehto O, Reunanen H, Vihinen-Ranta M, Vuento M. 2002. "Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus." *Journal of Virology*. 76(9):4401–4411. doi: 10.1128/JVI.76.9.4401-4411.2002.

Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, Vällilehto O, Lindholm L, Vuento M, Vihinen-Ranta M. 2003a. "Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus." *Journal of Virology*. 77(19):10270–10279. doi: 10.1128/JVI.77.19.10270.

Suikkanen S, Antila, M, Jaatinen A, Vihinen-Ranta M, Vuento M. 2003b. "Release of canine parvovirus from endocytic vesicles." *Virology*. 316(2):267–280. doi: 10.1016/j.virol.2003.08.031.

Thomsen DR, Roof LL, Homa FL. 1994. "Assembly of herpes simplex virus (HSV) intermediate capsids in insect cells infected with recombinant baculoviruses expressing HSV capsid proteins." *Journal of Virology*. 68(4):2442-2457.

Tissot AC, Renhofa R, Schmitz N, Cielens I, Meijerink E, Ose V, Jennings GT, Saudan P, Pumpens P, Bachmann MF. 2010. "Versatile virus-like particle carrier for epitope based vaccines" *PLoS ONE*. 5(3):e9809. doi: 10.1371/journal.pone.0009809.

Touihri L, Bouzid I, Daoud R, Desario C, El Goulli AF, Decaro N, Ghorbel A, Buonavoglia C, Bahloul C. 2009. "Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia." *Virus Genes*, 38(2):249–258. doi: 10.1007/s11262-008-0314-1.

Tresnan DB, Southard L, Weichert W, Sgro JY, Parrish CR. 1995. "Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid." *Virology*, 211(1):123–132. doi: 10.1006/viro.1995.1385.

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." *Journal of virology*, 66(9):5399–5408.

Truyen U, Agbandje M, Parrish CR. 1994. "Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus." *Virology*, 200(2):494–503. doi: 10.1006/viro.1994.1212.

Truyen U, Gruenberg A, Chang SF, Obermaier B, Veijalainen P, Parrish CR. 1995. "Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo." *Journal of Virology*.

69(8):4702–4710. doi: 10.1006/viro.1996.0021.

Truyen U. (1996) “Evolution of canine parvovirus: loss and gain of the feline host.” *Tierärztliche Praxis*. 24:316–318. doi: 10.1006/viro.1996.0021.

Truyen U, Evermann JF, Vieler E, Parrish CR. 1996. “Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range.” *Virology*. 215(0021):186–189. doi: 10.1006/viro.1996.0021.

Truyen U. 2006. “Evolution of canine parvovirus - a need for new vaccines?.” *Veterinary Microbiology*. 117: 9–13. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.003.

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.” *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11(7):538-546. doi: 10.1016/j.jfms.2009.05.002.

Truyen U & Parrish CR. (2013) “Feline panleukopenia virus: Its interesting evolution and current problems in immunoprophylaxis against a serious pathogen.” *Veterinary Microbiology*. 165(1-2):29-32. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.02.005.

Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW. 1991. “The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications.” *Science*, 251(5000);1456–1464. doi: 10.2307/2875821.

Tu M, Liu F, Chen S, Wang M, Cheng A. 2015. “Role of capsid proteins in parvoviruses infection.” *Virology journal*, 12(1):114. doi: 10.1186/s12985-015-0344-y.

Urakawa T, Ferguson M, Minor PD, Cooper J, Sullivan M, Almond JW, Bishop DH. 1989. “Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector.” *Journal of General Virology*. 70 (Pt 6):1453-1463. doi: 10.1099/0022-1317-70-6-1453.

Van Oers MM, Pijlman GP, Vlak JM. 2015. “Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: From dark horse to mainstream technology.” *Journal of General Virology*. doi: 10.1099/vir.0.067108-0.

Vicente T, Roldão A, Peixoto C, Carrondo MJ, Alves PM. 2011. “Large-scale production and purification of VLP-based vaccines” *Journal of Invertebrate Pathology*. Suppl:S42-48. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.004.

Vihinen-Ranta M, Kakkola L, Kalela A, Vilja P, Vuento M. 1997. “Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins.” *European Journal of Biochemistry*, 250(2):389–94.

Vihinen-Ranta M, Yuan W, Parrish CR. 2000. “Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport.” *Journal of Virology*. 74(10):4853–4859. doi: 10.1128/JVI.74.10.4853-4859.2000.Updated.

Vihinen-Ranta M, Wang D, Weichert WS, Parrish CR. 2002. “The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection.” *Journal of Virology*. 76(4):1884–1891. doi: 10.1128/JVI.76.4.1884.

- Wang HC, Chen WD, Lin SL, Chan JP, Wong ML. 2005. "Phylogenetic analysis of canine parvovirus VP2 gene in Taiwan." *Virus Genes*. 31(2):171-174. doi: 10.1007/s11262-005-1791-0.
- Wang J, Lin P, Zhao H, Cheng Y, Jiang Z, Zhu H, Wu H, Cheng S. 2016. "Continuing evolution of canine parvovirus in China: Isolation of novel variants with an Ala5Gly mutation in the VP2 protein." *Infection, Genetics and Evolution*. 38:73–78. doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.009.
- Wilson S, Illambas J, Siedek E, Stirling C, Thomas A, Plevová E, Sture G, Salt J. 2014. "Vaccination of dogs with canine parvovirus type 2b (CPV-2b) induces neutralising antibody responses to CPV-2a and CPV-2c." *Vaccine*. 32(42):5420–5424. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.102.
- Woo WP, Doan T, Herd KA, Netter HJ, Tindle RW. 2006. "Hepatitis B surface antigen vector delivers protective cytotoxic T-lymphocyte responses to disease-relevant foreign epitopes." *Journal of Virology*. 80(8):3975-3984. doi: 10.1128/JVI.80.8.3975-3984.2006.
- Woodroffe R, Prager KC, Munson L, Conrad PA, Dubovi EJ, Mazet JA. 2012. "Contact with domestic dogs increases pathogen exposure in endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*)." *PLoS ONE*. 7(1). doi: 10.1371/journal.pone.0030099.
- Wu H & Rossmann MG. 1993. "The canine parvovirus empty capsid structure." *Journal of Molecular Biology*. 231–244. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1993.1502>.
- Xu J, Guo HC, Wei YQ, Dong H, Han SC, Ao D, Sun DH, Wang HM, Cao SZ, Sun SQ. 2014. "Self-assembly of virus-like particles of canine parvovirus capsid protein expressed from *Escherichia coli* and application as virus-like particle vaccine." *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(8):3529–3538. doi: 10.1007/s00253-013-5485-6.
- Xu J, Guo HC, Wei YQ, Shu L, Wang J, Li JS, Cao SZ, Sun SQ. 2015. "Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus Isolates from Sichuan and Gansu Provinces of China in 2011." *Transboundary and Emerging Diseases*. 62(1):91–95. doi: 10.1111/tbed.12078.
- Yi L, Tong M, Cheng Y, Song W, Cheng S. 2016. "Phylogenetic Analysis of Canine Parvovirus VP2 Gene in China." *Transboundary and Emerging Diseases*. 63(2):e262–e269. doi: 10.1111/tbed.12268.
- Yoon SH, Jeong W, Kim HJ, An DJ. 2009. "Molecular insights into the phylogeny of canine parvovirus 2 (CPV-2) with emphasis on Korean isolates: A Bayesian approach." *Archives of Virology*. 154(8):1353–1360. doi: 10.1007/s00705-009-0444-3.
- Yuan W & Parrish CR. 2001. "Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells." *Virology*. 279: 546–557. doi: 10.1006/viro.2000.0734.
- Yule TD, Roth MB, Dreier K, Johnson AF, Palmer-Densmore M, Simmons K, Fanton R. 1997. "Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease." *Vaccine*. 15(6):720–729. doi: 10.1016/S0264-410X(96)00232-0.
- Zhang R, Yang S, Zhang W, Zhang T, Xie Z, Feng H, Wang S, Xia X. 2010. "Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China." *Virus Genes*. 40(3):397–402. doi: 10.1007/s11262-010-0466-7.
- Zhao H, Wang J, Jiang Y, Cheng Y, Lin P, Zhu H, Han G, Yi L, Zhang S, Guo L, Cheng S. 2015. "Typing

of Canine Parvovirus Strains Circulating in North-East China.” *Transboundary and Emerging Diseases*. 64(2):495-503. doi: 10.1111/tbed.12390.

Zhong Z, Liang L, Zhao J, Xu X, Cao X, Liu X, Zhou Z, Ren Z, Shen L, Geng Y, Gu X, Peng G. 2014. “First isolation of new canine parvovirus 2a from Tibetan Mastiff and global analysis of the full-length VP2 gene of canine parvoviruses 2 in China.” *International Journal of Molecular Sciences*. 15(7): 12166–12187. doi: 10.3390/ijms150712166.

Zhou P, Zeng W, Zhang X, Li S. 2017. “The genetic evolution of canine parvovirus - a new perspective.” *PLoS ONE*. 12. doi: 10.1371/journal.pone.0175035.

8. ANEXOS

ANEXO 1

Ciência Rural, Santa Maria, Online

ISSN 0103-8478

Isolation and characterization of canine parvovirus type 2c circulating in Uruguay

Isolamento e caracterização da cepa tipo 2c do parvovírus canino circulante no Uruguai

Andrea Blanc Pintos¹ Cecilia Beatriz Negro Larrama^{II} Eduardo Enrique Keolon Baratta^{II}
Mabel Beatriz Berois Barthe^I Juan Ramón Arbiza Rodonz^{1*}

ABSTRACT

This research reports the first CPV-2c isolation in cell culture (canine fibroma cell line A-72) in Uruguay. The isolates were obtained from 13 rectal swabs of Uruguayan dogs with parvovirus. Samples were submitted to PCR with two sets of primers, restriction fragment length polymorphism (RFLP), partial sequencing of the gene encoding for VP2 capsid protein and phylogenetic characterization. The strain isolated was confirmed as CPV-2c. These results contribute to a better knowledge of CPV strains circulating in Uruguay and promote an evaluation of the efficacy of heterologous vaccines used to protect against the circulating strains.

Key words: canine parvovirus, CPV-2c, vaccinated dogs.

RESUMO

Este trabalho relata o primeiro isolamento do CPV-2c em cultura de células (linhagem celular de fibroma canino A-72), no Uruguai. Os isolados foram obtidos a partir de 13 swabs retais de cães uruguaios com parvovirose. As amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com dois pares de primers, polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), sequenciamento parcial do gene que codifica a proteína capsidial VP2 e caracterização filogenética. A cepa isolada foi confirmada como CPV-2c. Os resultados contribuem para um melhor conhecimento das cepas do CPV circulantes no Uruguai e incitam uma maior investigação sobre a eficácia das vacinas produzidas com cepas heterólogas utilizadas atualmente para proteger contra cepas circulantes.

Palavras-chave: Parvovirose canina, CPV-2c, cães vacinados.

Canine parvovirus (CPV-2) is the most significant viral cause of canine enteritis over the age of 2 months and was first isolated in 1978 as an emerging pathogen (APPEL et al., 1979). It rapidly spread worldwide, causing an enteric and myocardial disease in dogs (APPEL et al., 1979). Few years after its emergence CPV-2 was completely replaced by two new antigenic variants designated as CPV-2a and CPV-2b (PARRISH et al., 1985; 1988). The original virus is the strain included in most vaccine formulations and is no longer been observed over canine population. These new variants differ from the original type CPV-2 by amino acid changes affecting the capsid protein and by their extended host range, which includes dogs and cats (DECARO et al., 2005a).

A third variant, CPV-2c, was discovered in 2000 in Italy. This is a mutant of CPV-2b which involved the substitution Aspartate (Asp) 426 Glutamate (Glu) occurring in a main neutralizing epitope of the capsid (BUONAVOGLIA et al., 2001). Since its has been identified, CPV-2c has been spread over local canine population and has also been found in other European countries (DECARO et al., 2007), in Asia (NAKAMURA et al., 2004; NANDI et al., 2009), in Africa (TOUIHRI et al., 2009) and in the America; USA (HONG et al., 2007; KAPIL et al., 2007), Argentina (CALDERON et al., 2009), Brazil (CASTRO et al., 2010) and Uruguay (PEREZ et al., 2007).

¹Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica, Igua 4225, Montevideo, Uruguay. E-mail: jarbiza@fcien.edu.uy

*Autor para correspondência.

^{II}Laboratorios Santa Elena, Millán 4175, Montevideo, Uruguay.

The CPV variants differ in amino acid changes occurring at residue 426 of the capsid protein, with types CPV-2a, CPV-2b, CPV-2c displaying amino acids Asparagine (Asn), Asp and Glu, respectively (BUONAVOGLIA et al., 2001).

Most commercial vaccines formulations contain only the original attenuated strain CPV-2. There is a discordance about the cross protection that these vaccines provides against the new variants. Only one study reports the complete protection by the original CPV type 2 based vaccines against challenge with any of the CPV circulating strains (SPIBEY et al., 2008). However, there are several researches that reports vaccine failure when the challenge virus is the CPV type 2c (DECARO et al., 2007; PEREZ et al., 2007; DECARO et al., 2008; CALDERON et al., 2009). It is important to note that most current cases of canine parvovirus are related to the virulent strain CPV-2c in Argentina (CALDERON et al., 2009), Uruguay (PEREZ et al., 2007) and Brazil (STRECK et al., 2009). All these cases take place mainly in previously immunized animals whose vaccination probably failed, and CPV-2c strain would not be neutralized by vaccine strain CPV-2. It is imperative to consider whether puppies are adequately protected by actual vaccines or if it is necessary to incorporate the new variant CPV-2c to vaccine formulation as proposed by some authors (CAVALLI et al., 2008; DECARO et al., 2008).

Despite CPV-2c was detected causing recent cases of canine parvovirus in South America by molecular characterization (PEREZ et al., 2007; CALDERON et al., 2009; STRECK et al., 2009), the viable infectious particle was not isolated yet. The present study reports the first isolation in cell culture of a CPV-2c strain in Uruguay.

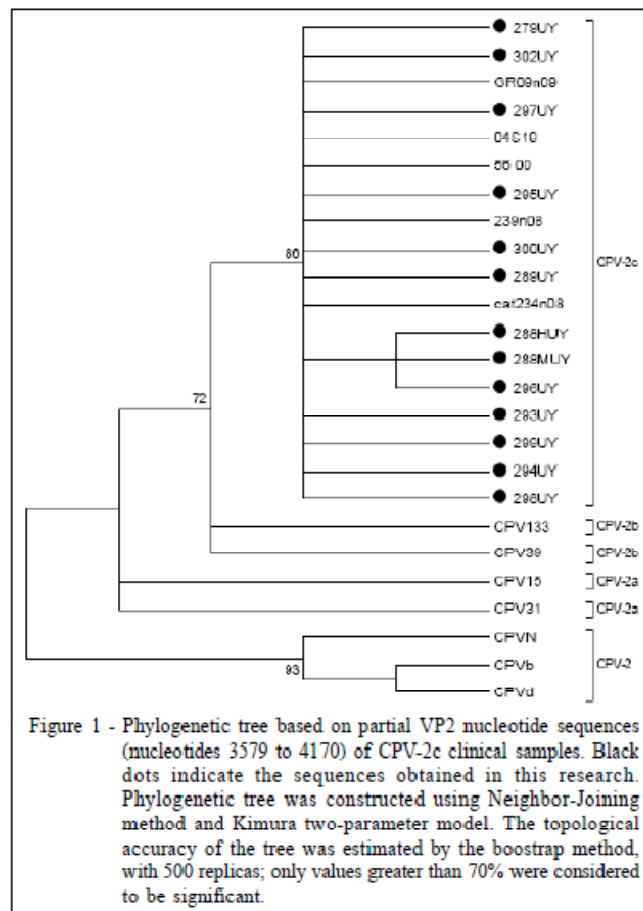
Thirteen rectal swab samples from the city Canelones (Uruguay) were submitted to the laboratory for diagnostic purposes in 2009. All clinical samples were taken from vaccinated animals with different attenuated commercial vaccines obtained from commercial claims. All samples obtained from vaccinated domestic dogs with typical clinical signs of parvovirus resulted positive for a CPV commercial diagnostic kit (SensPERT CPV Test Kit, VetAll Laboratories, Korea).

For DNA extraction the samples were suspended in phosphate buffer saline (PBS) and clarified at 1500xg for 10 minutes. DNA preparation was carried out by the fast-boil method described previously (DECARO et al., 2005b). For all samples two different regions of CPV VP2 gene were amplified by PCR using two sets of primers, 555for/555rev (5'-CAGGAAGATATCCAGAAGGA-3'/5'-GGTGCTAGTTGATATGTAATAACA-3') and Hfor/Hrev (5'-CAGGTGATGAATTTGCTACA-3'/5'-CATTTGGATAAACTGGTGGT-3') (BUONAVOGLIA et al., 2001). The products obtained with the 555for/555rev

set of primers were digested with MboII enzyme, whose restriction site is unique to the Glu-426 mutants (BUONAVOGLIA et al., 2001). Once the restriction fragment length polymorphism (RFLP) yielded positive results compatible with CPV-2c, the products obtained with the Hfor/Hrev primers were sequenced automatically in both directions by the dideoxy-mediated chain termination method (Macrogen Inc, Korea). Nucleotide sequences generated in this study were submitted to GenBank database (accession numbers HQ632782-HQ632794). Alignments and sequence analysis were performed using Bioedit Sequence Alignment Editor version 7.0.8.0 (HALL, 1999). Phylogenetic analyses were carried out with Mega4 software (TAMURA et al., 2007). Phylogenetic tree was constructed using Neighbor-Joining method and Kimura two-parameter model. For sequence comparison, the nucleotide sequences of CPV-2 (CPVb, M38245; CPV-N, M19296; CPV-d, M23255), CPV-2a (CPV31, M24000 and CPV15, M24003), CPV-2b (CPV3, M74849 and CPV133, M74852) and CPV-2c (cat234/08, GU362935; GR09/09, GQ865519; 239/08, FJ005251; 04S19, DQ025988; 56/00, FJ222821) were retrieved from GenBank.

For virus isolation, samples were suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and clarified at 2000xg for 10 minutes. The clear supernatants were filtered through a 220nm pore size filter and inoculated onto freshly trypsinized A-72 cells (canine fibroma cell line) grown in D-MEM containing 5% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, USA). The inoculated cells were incubated under the presence of 5% CO₂ at 37°C during 3 to 4 days until the occurrence of cytopathic effect (CPE), typically of round and detached cells. After two passages, CPV presence was confirmed firstly by a direct immunofluorescence assay (IF) using an anti-CPV mouse monoclonal antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate (VMRD, Pullman, USA), and the nucleus were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), and secondly by PCR using the primers 555for/555rev as described previously (BUONAVOGLIA et al., 2001).

All the fecal samples analyzed in this research were collected from commercial claim vaccinated dogs. A first PCR with the primers 555for/555rev was carried out in which the band of 583bp was obtained. The PCR products were digested with MboII enzyme and all samples presented an RFLP compatible with CPV-2c strains. To confirm these results, a second PCR based on the primers Hfor/Hrev was carried out and the obtained fragment of 629bp was sequenced. The sequences of the thirteen samples confirmed that all of them were CPV-2c presenting the GAA codon corresponding to a Glu at position 426 of VP2 protein. Residue 426 is placed in a major antigenic site over the three-fold spike of the capsid and this change differentiates CPV-2c from CPV-2b (Asp) and CPV-2a (Asn). Moreover, the phylogenetic analysis based on this fragment (Figure 1)



confirms that our samples are grouped with other CPV-2c strains. According to the hypothesis of evolutionary origin of CPV the phylogenetic tree revealed that CPV-2c was more related to CPV-2b, then to 2a and more distant to CPV-2, which is contained in the vaccine. All samples analyzed in this research presented 100% amino acid identity based on the translated nucleotide sequence.

In an attempt to isolate CPV-2c variant in A-72 cell line two blind passages were made to all samples. Only 294/UY sample presented a clear CPE after second passage compared with non infected cells (Figure 2A-B). The A-72 cell line is widely used for CPV growth in cell culture (BUONAVOGLIA et al., 2001; DECARO et al., 2005b; CAVALLI et al., 2008; DECARO et al., 2008;). In this case, this cell line was susceptible to variant 294/UY and the mutation at amino acid 426 didn't interfere with viral replication. The isolation of CPV-2c allows the obtainment of viable infectious particle and so, the realization of tests which depend on the viable agent, such as neutralization and cross protection assays. CPV-2c presence was confirmed by IF obtaining the typical image with the bright signal in the nucleus and

briefly distributed in the cytoplasm (Figure 2C-F). Moreover, CPV-2c was confirmed by PCR with primers 555for/555rev and successive RFLP obtaining the typical CPV-2c polymorphism (data not shown). The sequences obtained directly from clinical sample and after two passages in cell culture were identical. Successive passages of this strain were done obtaining regularly the characteristic CPE. Four samples that didn't show CPE were positive by IF and PCR (data not shown); probably the virus might be present in low titer and in successive passages could be seen CPE. The last eight samples didn't show CPE and were negative for IF and PCR.

In conclusion, all samples analyzed in this study correspond to the new variant CPV-2c currently circulating around the world. It was previously reported that this is the predominant variant in Uruguay (PEREZ et al., 2007), Argentina (CALDERON et al., 2009) and Brazil (STRECK et al., 2009; CASTRO et al., 2010). To our knowledge the isolation in cell culture of CPV-2c strain was not described in the neighboring countries, therefore this research is the first report in Uruguay and in the region about CPV-2c isolation in A-72 canine cell line.

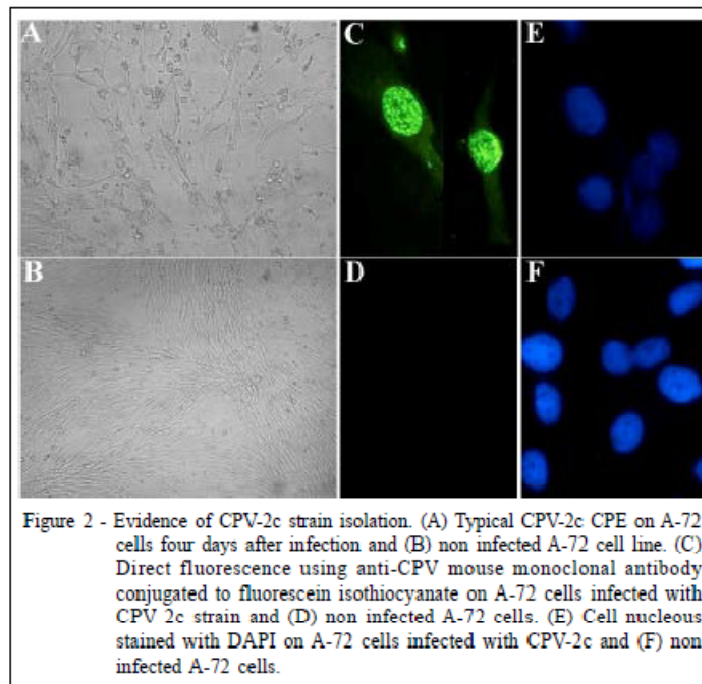


Figure 2 - Evidence of CPV-2c strain isolation. (A) Typical CPV-2c CPE on A-72 cells four days after infection and (B) non infected A-72 cell line. (C) Direct fluorescence using anti-CPV mouse monoclonal antibody conjugated to fluorescein isothiocyanate on A-72 cells infected with CPV 2c strain and (D) non infected A-72 cells. (E) Cell nucleus stained with DAPI on A-72 cells infected with CPV-2c and (F) non infected A-72 cells.

This isolate will allow further experiments including the evaluation of the level of neutralization and cross protection against this new variant induced by the vaccines used currently.

ACKNOWLEDGEMENTS

The researchers thank Dr. Ana Ankich for giving the ability to collect clinical samples. They also thanks to ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) and PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas).

Andrea Blanc y Cecilia Beatriz Negro Larrama contributed equally to this work.

REFERENCES

- APPEL, M.J. et al. Isolation and immunisation studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Veterinary Record*, v.105, p.156-159, 1979.
- BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*, v.82, p.3021-3025, 2001. Available from: <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/content/full/82/12/3021>>. Accessed: Feb 3, 2011.
- CALDERON, M.G. et al. Molecular characterization of canine parvovirus strains in Argentina: Detection of the pathogenic variant CPV2c in vaccinated dogs. *Journal of Virological Methods*, v.159, p.141-145, 2009. Available from: <<http://pubget.com/paper/19490967>>. doi:10.1016/j.jviromet.2009.03.013
- CASTRO, T.X. et al. Partial VP2 sequencing of canine parvovirus (CPV) strains circulating in the state of Rio de Janeiro, Brazil: detection of the new variant CPV-2c. *Brazilian Journal of*

Microbiology, v.41,p.1093-1098, 2010. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v41n4/31.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011. doi: 10.1590/S1517-83822010000400031.

CAVALLI, A. et al. Evaluation of the antigenic relationships among canine parvovirus type 2 variants. *Clinical and Vaccine Immunology*, v.15, p.534-539, 2008. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2268271/pdf/0444-07.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011. doi: 10.1128/CVI.00444-07.

DECARO, N. et al. The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, p.1222-1224, 2007. Available from: <<http://www.cdc.gov/eid/content/13/8/pdfs/1222.pdf>>. Accessed: Feb 5, 2011. doi: 10.3201/eid1308.070505.

DECARO, N. et al. Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.17, p.133-138, 2005a. Available from: <<http://jvdi.org/cgi/reprint/17/2/133.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011.

DECARO, N. et al. Evidence for immunisation failure in vaccinated adult dogs infected with canine parvovirus type 2c. *New Microbiologica*, v.31, p.125-130, 2008. Available from: <http://www.microbiologica.net/mb/pdf/2008/1/0386_16.pdf>. Accessed: Feb 7, 2011.

DECARO, N. et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Veterinary Microbiology*, v.105, p.19-28, 2005b. Available from: <http://www.researchgate.net/publication/8123119_A_realtime_PCR_assay_for_rapid_detection_and_quantitation>

- _of_canine_parvovirus_type_2_in_the_feces_of_dogs>. doi:10.1016/j.vetmic.2004.09.018.
- HALL, T.A. **BioEdit**: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41:95-98, 1999. Available from: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2105-9-154.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011. doi:10.1186/1471-2105-9-154.
- HONG, C. et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the United States. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, p.535-539, 2007. Available from: <<http://www.jvdi.org/cgi/reprint/19/5/535>>. Accessed: Feb 7, 2011.
- KAPIL, S. et al. Canine parvovirus types 2c and 2b circulating in North American dogs in 2006 and 2007. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.4044-4047, 2007. Available from: <<http://jcm.asm.org/cgi/reprint/JCM.01300-07v1>>. Accessed: Feb 5, 2011. doi:10.1128/JCM.01300-07.
- NAKAMURA, M. et al. A novel antigenic variant of canine parvovirus from a Vietnamese dog. *Archives of Virology*, v.149, p.2261-2269, 2004. Available from: <<http://www.springerlink.com/content/npt7c7f3b4meuxgj/fulltext.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011. doi: 10.1007/s00705-004-0367-y.
- NANDI, S. et al. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Research in Veterinary Science*, v.88, p.169-171, 2009.
- PARRISH, C.R. et al. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology*, v.69, p.1111-1116, 1988. Available from: <<http://vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/69/5/1111>>. Accessed: Feb 5, 2011. doi: 10.1099/0022-1317-69-5-1111.
- PARRISH, C.R. et al. Natural variation of canine parvovirus. *Science*, v.230, p.1046-1048, 1985. Available from: <<http://www.sciencemag.org/content/230/4729/1046.full.pdf>>. Accessed: Feb 7, 2011. doi:10.1126/science.4059921.
- PEREZ, R. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in South America. *Veterinary Microbiology*, v.124, p.147-152, 2007.
- SPIBEY, N. et al. Canine parvovirus type 2 protects against virulent challenge with type 2c virus. *Veterinary Microbiology*, v.128, p.48-55, 2008.
- STRECK, A. et al. First detection of canine parvovirus type 2c in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.40, p.465-469, 2009. Available from: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v40n3/v40n3a08.pdf>>. Accessed: Feb 5, 2011. doi: 10.1590/S1517-83822009000300008.
- TAMURA K, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, p.1596-1599, 2007. Available from: <<http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/8/1596.full.pdf+html>>. Accessed: Feb 5, 2011. doi: 10.1093/molbev/msm092.
- TOUIHRI, L. et al. Molecular characterization of canine parvovirus-2 variants circulating in Tunisia. *Virus Genes*, v.38, p.249-258, 2009. Available from: <<http://www.mendeley.com/research/molecular-characterization-of-canine-parvovirus2-variants-circulating-in-tunisia/>>. doi: 10.1007/s11262-008-0314-1.

ANEXO 2-Tabla comparativa de secuencias aminoacídicas de NS de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank

NS1/2	11	25	26	28	60	72	73	74	81	113	187	231	350	351	358	360	361	426	492	500	523	544	545	573	596	597	602	616	620	621	630	639	642
294 MF	Met	Ala	Phe	Phe	Ile	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Ile	Ser	Asp	Lys	Asp	Ala	Asn	Ala	Ile	Arg	Asp	Tyr	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Asp	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr
CU21	Val	Asn	Phe	Val	Pro	.	.
CU24	Val	Asn	Phe	Val	Pro	.	Lys	.
5 MGL	Val	Asn	Phe	Val	Pro	.	.	.
UY346	Asn
UY349	Ala
UY326
UY318	Asn
UY261	Asn
UY242	Asn	Asn
UY190	Asn	X
UY152	Asn
UY101	Asn
UY95	Asn
UY55	Asn
UY52	Asn
UY47	Ile	Asn
UY12	Asn	.	Thr
UY375	Asn
UY269	Asn
UY196	Asn
UY181	Asn
UY21	Asn
E32	Asn	Asn	Phe	.	.	.	Pro
E26	Asn	Asn	Phe	.	.	.	Pro
E13	Asn	Asn	Phe	.	.	.	pro
ARG71	Asn	Ser
ARG68	Asn
ARG66	Asn	X
LW	Lys	Pro	.	.	.	Lys	Lys	Lys	Asn
UFMT	Ser
UY370c	Asn
UY368
UY354

ANEXO 2- Continuación de tabla comparativa de secuencias aminoacídicas de NS de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank

NS1/2	11	25	26	28	60	72	73	74	81	113	187	231	350	351	358	360	361	426	492	500	523	544	545	573	596	597	602	616	620	621	630	639	642	
UY317	Pro
CPV IZSSI	Asn
UY307
UY258
UY247	Ile	Asn
UY235	Val	.	.	Asn	Pro	.	.	.	Lys
UY187
UY185	Asn
UY173	Asn
UY169	Asn
UY135	.	.	Leu	Ile	Asn
UY120	Asp	.	.	.	Asn
UY82
UY72	Asn
E48	Asn
E4	Asn
E31	Asn
E29	Asn
E28	Asn
E23	Asn
E16	Asn
E10	Asn
E1	Val	.	.	Asn	.	Thr
PY1	Asn
BRA04/13	Ser
BRA01/12	Ser
BRA02/14	Ser
BRA01/14	Ser
BRA04/10	Asn
BRA03/10	Ser
BRA02/10	Ser
BRA01/10	Asn
ARG35	Asn
ARG33	Ser

ANEXO 2- Continuación de tabla comparativa de secuencias aminoacídicas de NS de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank

NS1/2	11	25	26	28	60	72	73	74	81	113	187	231	350	351	358	360	361	426	492	500	523	544	545	573	596	597	602	616	620	621	630	639	642		
ARG32	Asn
ARG26
189-02	Asn	
288-01	Asn	
114-05	Asn	
188-07	Asn	
244-04	Asn	Val	
283-06	Asn	
347-03	Asn	
57-10	Asn	
368-12-17	Asn	
485-09	
202-09	Asn	
INCOG	Asn	
FH	Lys	P	.	.	.	Lys	Lys	Lys	Asn		
HB	Lys	P	.	.	.	Lys	Lys	Lys	Asn		

ANEXO 3-Tabla comparativa de secuencias aminoacídicas de VP1 de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank

VP1	15	16	25	31	33	34	69	72	133	136	140	148	149	155
294 MF	Leu	Val	Val	Cys	Phe	Ile	Ala	Ala	Thr	Thr	Lys	Asn	Leu	Ala
CU21	.	.	Ile	Tyr	.	Val
CU24	T
5 MGL	.	.	Ile	Tyr	.	Val	T
UY346
UY349	.	.	.	Tyr
UY326
UY318
UY261
UY242
UY190
UY152
UY101
UY95	Thr
UY55
UY52	Ala
UY47	Ser	Ala
UY12	.	Ile
UY375
UY269
UY196
UY181
UY21
E32	.	.	Ile
E26	.	.	Ile
E13	.	.	Ile
ARG71
ARG68
ARG66
LW
UFMT
UY370c
UY368
UY354
UY317
CPV IZSSI	Arg
UY307
UY258
UY247
UY235
UY187
UY185
UY173
UY169
UY135
UY120	Asp	.	.	.
UY82
UY72	Thr
E48
E4	Ser
E31
E29
E28

ANEXO 3- Continuación de tabla comparativa de secuencias aminoacídicas de VP1 de la cepa CPV-2c 294MF y secuencias CPV-2c de GenBank

VP1	15	16	25	31	33	34	69	72	133	136	140	148	149	155
E23
E16
E10
E1
PY1
BRA04/13
BRA01/12
BRA02/14
BRA01/14
BRA04/10
BRA03/10
BRA02/10
BRA01/10
ARG35
ARG33
ARG32
ARG26
189-02
288-01
114-05
188-07
244-04
283-06
347-03
57-10
368-12-17
485-09	.	.	Ile
202-09	Ile	.	.	Phe	Thr	.
INCOG	.	.	.	Tyr	.	Val
FH
HB